



HAL
open science

La tolérance du tournesol aux maladies

Patrick P. Vincourt, F. F. As Sadi, Felicity F. Vear, Amandine A. Bordat,
Denis D. Tourvieille de Labrouhe, Laurence Godiard

► To cite this version:

Patrick P. Vincourt, F. F. As Sadi, Felicity F. Vear, Amandine A. Bordat, Denis D. Tourvieille de Labrouhe, et al.. La tolérance du tournesol aux maladies. *Innovations Agronomiques*, 2011, 14, pp.109-121. hal-00964150

HAL Id: hal-00964150

<https://hal.science/hal-00964150>

Submitted on 29 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

La tolérance du tournesol aux maladies

Vincourt P.¹, As Sadi F.¹, Vear F.², Bordat A.¹, Tourvieille D.², Godiard L.¹

(1) UMR 441-2594 (INRA-CNRS), BP 52627, Chemin de Borde Rouge - Auzeville, 31326 Castanet Tolosan France

(2) UMR1095 GDEC Génétique Diversité et Ecophysiologie des Céréales, INRA Site de Crouël, 234 avenue du Brézet, 63100 Clermont-Ferrand

Correspondance : patrick.vincourt@toulouse.inra.fr

Résumé

La culture du tournesol est confrontée aux attaques de différents bioagresseurs. En France, il s'agit essentiellement du mildiou *Plasmopara halstedii*, du sclérotinia *Sclerotinia sclerotiorum*, du phomopsis *Diaporthe helianthi*, et du phoma *Phoma macdonaldii* dont les attaques au collet entraînent le dessèchement précoce. Les efforts de recherche et de sélection ont permis de conserver à cette culture son statut respectueux de l'environnement. Cependant, les dialogues moléculaires entre la plante et ces différents pathogènes et qui aboutissent à l'immunité ou à la sensibilité, ainsi que sa variabilité génétique, sont encore largement inconnus. Après une revue des principaux résultats récents concernant l'interaction entre le tournesol et ces pathogènes, nous soulevons deux questions d'intérêt pour la poursuite de ces recherches : celle de la répartition des rôles et de la hiérarchisation des questions de recherche d'une part, et d'autre part celle du regard à porter sur les réseaux de gènes que révèle l'analyse du transcriptome grâce aux nouvelles technologies de séquençage.

Mots-clés : *Helianthus annuus*, résistance, sclerotinia, phomopsis, phoma, effecteur, pathogénicité

Abstract: Sunflower tolerance to diseases

The sunflower crop is subjected to several diseases, among of which Downy Mildew, Sclerotinia, Phomopsis and premature death caused by *Phoma macdonaldii* are the most important in France today. The research and breeding efforts during the past fifty years have been efficient enough to ensure an "environmentally safe" status to this cultivation. However, little is known about the molecular talk which leads to immunity or susceptibility between the plant and the pathogens as well as about its genetic variability. After a review of the main recent results on the these sunflower*microorganisms interactions, we are discussing on two questions of interest for the research perspectives: How to establish the research priorities? How to decipher the genes networks revealed by transcriptome analysis with a greater involvement of the genetic variability thanks to the development of the new sequencing technologies?

Keywords: *Helianthus annuus*, resistance, disease, sclerotinia, phomopsis, phoma, effector, pathogenicity

Introduction

Depuis le début de sa phase d'expansion mondiale, la culture du tournesol a été confrontée aux attaques de différents bioagresseurs : le mildiou *Plasmopara halstedii*, le sclérotinia *Sclerotinia sclerotiorum*, le phomopsis *Diaporthe helianthi*, le phoma *Phoma macdonaldii*, pour ne parler que des pathologies les plus présentes en France à ce jour. En réponse à ces difficultés, les sélectionneurs publics et privés ont apporté des solutions génétiques. Dans l'économie globale de l'amélioration

variétale de cette plante, il est parfois considéré que les efforts consacrés à ces objectifs l'ont été aux dépens de l'amélioration de la productivité en huile.

En réalité, l'analyse du progrès génétique réalisé au cours des trente premières années qui ont suivi le développement de la culture (Vear et Muller, 2011) montre qu'une part importante du progrès de productivité observé - il est vrai en conditions environnementales relativement favorables - est associée à une dynamique d'adaptation du tournesol à son environnement biotique. On peut noter par ailleurs que la culture du tournesol bénéficie, du fait même de ces efforts, d'un positionnement très favorable vis-à-vis des contraintes environnementales, traduites par exemple par le plan national Ecophyto2018. Les travaux d'amélioration génétique pour la tolérance aux maladies méritent donc certainement d'être poursuivis. Notre objectif au cours de ce colloque n'est pas de dresser un inventaire exhaustif des résultats obtenus dans le monde sur la tolérance du tournesol aux maladies - ce thème peut à lui seul être l'objet d'un symposium, comme cela a été le cas à Krasnodar en 2010. Dans un premier temps, nous pointerons les résultats majeurs susceptibles selon nous de constituer un socle pour la progression des travaux. Dans un deuxième temps, nous relèverons quelques questions de nature scientifique ou organisationnelle qui nous semblent pertinentes par rapport à l'objectif de favoriser le développement d'une filière « tournesol » rentable tout en maintenant à la culture son statut respectueux de l'environnement. Nous avons volontairement exclu de notre propos le cas de l'espèce parasite *Orobanche cumana*, malgré son intérêt scientifique et son importance économique pour les pays du Sud et de l'Est de l'Europe, du fait que le risque de développement de cette pathologie en France ne semble pas avéré.

1. Panorama synthétique des connaissances et résultats

1.1 Le mildiou : plusieurs démarches engagées pour renforcer la durabilité de la résistance variétale

Historiquement, c'est l'identification d'une source de résistance complète au mildiou et à déterminisme génétique simple qui a permis, conjointement à la découverte de la stérilité mâle cytoplasmique et de la restauration de fertilité, le développement très rapide des surfaces de tournesol dans le monde à partir du début des années 1970. Les deux espèces - l'hôte et l'endoparasite obligatoire *Plasmopara halstedii* (oomycète) - sont originaires du continent nord-américain où elles poursuivent leur coévolution (Viranyi, 2002). Des résistances de type « gène pour gène », codées par les gènes *PI*, ont été trouvées au sein d'écotypes sauvages et transférées au matériel cultivé, mais elles ont été progressivement contournées en France, à partir de 1988, et l'introgression de nouveaux gènes de ce type a mobilisé l'énergie des sélectionneurs au cours des vingt dernières années. Plus récemment, les travaux se sont orientés vers l'objectif de solutions plus durables, tant en recherchant de nouveaux types de mécanismes au sein de la variabilité génétique du tournesol, qu'en appréhendant la dynamique de l'évolution des populations du pathogène soumis aux pressions de sélection conférée par tel ou tel assemblage de mécanismes.

1.1.1 Une grille de lecture des races de mildiou

Si la plupart des auteurs fait référence, en ce qui concerne les gènes *PI*, à un mécanisme de type « gène pour gène », on est encore loin de disposer d'une grille d'interprétation mettant en relation les gènes de résistance de l'espèce cultivée et les gènes d'aviorulence du pathogène. Une liste de génotypes discriminants de tournesol, composée de 3 séries de 3 lignées, permet de typer une souche inconnue par rapport à des races déjà identifiées. La nomenclature de ces races y est définie sous la forme d'un code à 3 chiffres en fonction de leur profil de résistance sur chacune des 3 séries (Tableau 1) Si le principe de ce codage est maintenant agréé au sein de la communauté, en revanche, la liste des hôtes différentiels n'a pas encore fait l'objet d'une standardisation (Tourvieille *et al.*, 2000). Il est vraisemblable qu'une telle standardisation ne pourra se mettre en place sur des bases solides que le jour où le « patron » génétique de la plante hôte et celui du pathogène seront réellement connus.

Tableau 1 : Hôtes différentiels utilisés par l'équipe INRA de Clermont-Ferrand. Pour chaque série de trois hôtes, chacun des 8 profils théoriquement possibles est codé de 0 (profil « RRR ») à 7 (profil « SSS »). En prenant en compte l'ensemble des trois séries, c'est donc un code du type « 304 » = SSR-RRR-RRS qui est produit.

		Races de <i>P. halstedii</i>													
		100	300	304	307	314	717	334	700	703	704	710	714	707	730
hôtes différentiels	D1 Ha304	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	D2 Rha265	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	D3 Rha274	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
	D4 PMI3 ^{PMH}	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S
	D5 PM-17	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S
	D6 803-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	D7 Har4	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R
	D8 QHP1 ^{PMH}	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R
	D9 Ha335 ^{PMH}	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R

1.1.2 Les gènes de résistance de type « race spécifique » (PI) sont portés par des régions génomiques complexes riches en gènes NBS-LRR

Trois clusters majeurs de gènes ont été particulièrement analysés (figure 1) :

- Sur le groupe de liaison 8, le cluster « *PI6* » a été analysé par Bouzidi *et al.* (2002). Deux zones distinctes y avaient été identifiées, l'une portant les gènes de résistances aux races 100 et 300 (gènes *PI1* et *PI2*), l'autre portant les gènes de résistances aux races 700, 703 et 710 (*PI6*). Différents marqueurs ont été cartographiés sur ce cluster ; ils dérivent tous de séquences de la sous-famille « TIR » des «NBS-LRR», à laquelle appartiennent de nombreux gènes de résistance chez les dicotylédones. Les protéines NBS-LRR sont aptes, au travers de leur domaine très polymorphe « LRR », à reconnaître ou à interagir directement avec les protéines effectrices de pathogénicité d'une grande variété de bioagresseurs (De Young et Innes, 2006).
- Sur le groupe de liaison 13, le cluster « *PI5-PI8* » a été analysé par Radwan *et al.* (2003), Radwan *et al.* (2004) et Bachlava *et al.* (2011) Ces auteurs ont montré que ce cluster est composé de séquences RGA de la sous-famille « Non-TIR » des NBS-LRR».
- Un allèle de résistance conférant la résistances aux races 300, 700, 730, 770, en provenance de l'écotype Arg1575-2 de *Helianthus argophyllus*, et valorisé au travers de la création de la lignée RHA419, a été localisé sur le groupe de liaison 1 (Dussle *et al.*, 2004 ; Wieckhorst *et al.*, 2010).

Cependant, à ce jour, aucun des gènes *PI* n'a été formellement identifié par sa séquence.

1.1.3 Une résistance quantitative

Lorsque de nouvelles races virulentes sont apparues, des différences quantitatives de sensibilité entre variétés cultivées ont été mises en évidence. L'équipe de l'INRA de Clermont-Ferrand a donc entrepris un large criblage de ressources génétiques (820 lignées de type cultivé, 73 populations, 59 lignées d'introgression d'écotypes sauvages du genre *Helianthus*) ne présentant pas *a priori* de gènes de résistance vis à vis des races présentes, dans différentes conditions expérimentales pluriannuelles et en plein champ. Des différences significatives entre lignées, en valeur propre et en aptitude générale à la combinaison, ont été mises en évidence (Vear *et al.*, 2008 ; Tourvieille *et al.*, 2008).

Une population de lignées recombinantes entre deux lignées divergentes pour ce caractère (XRQ « résistant » et PSC8, « sensible ») étant disponible, il a été possible de cartographier deux zones génomiques (QTL) à effets forts, sur les groupes de liaison 10 et 8 (Vear *et al.*, 2008). Ces positions ne correspondent pas aux clusters de résistance spécifique cartographiés à ce jour, mais on ne peut pas exclure que d'autres clusters correspondant à d'autres sources de résistance « race spécifique » en cours d'analyse, co-localisent avec ces zones.

La cartographie fine du QTL « QRM1 » (QTL de Résistance au Mildiou) identifié sur le groupe de liaison 10 a été entreprise en vue de son clonage positionnel à partir du début de l'année 2008 au sein de l'équipe « Tournesol » du LIPM et en collaboration avec l'équipe de Clermont-Ferrand et le CNRGV. Nous visons par ce projet à savoir s'il s'agit d'un mécanisme original, intervenant seul ou en interaction avec les gènes *PI*. Cet objectif n'est pas atteint à ce jour. Il se heurte d'une part à la complexité du génome du Tournesol, qui présente de larges fractions d'éléments répétés qui freinent la progression de la carte physique, et surtout peut-être au fait qu'aucun dispositif en conditions contrôlées n'a été à ce jour entièrement validé pour caractériser de façon fiable cette résistance quantitative.

Néanmoins, à partir d'un protocole indirect d'évaluation élaboré par D. Tourvieille – infection secondaire réalisée par une aspersion de spores sur des plantules âgées de 15 jours – nous avons pu, dans deux expériences indépendantes, préciser la position de QRM1 (Figure 1)

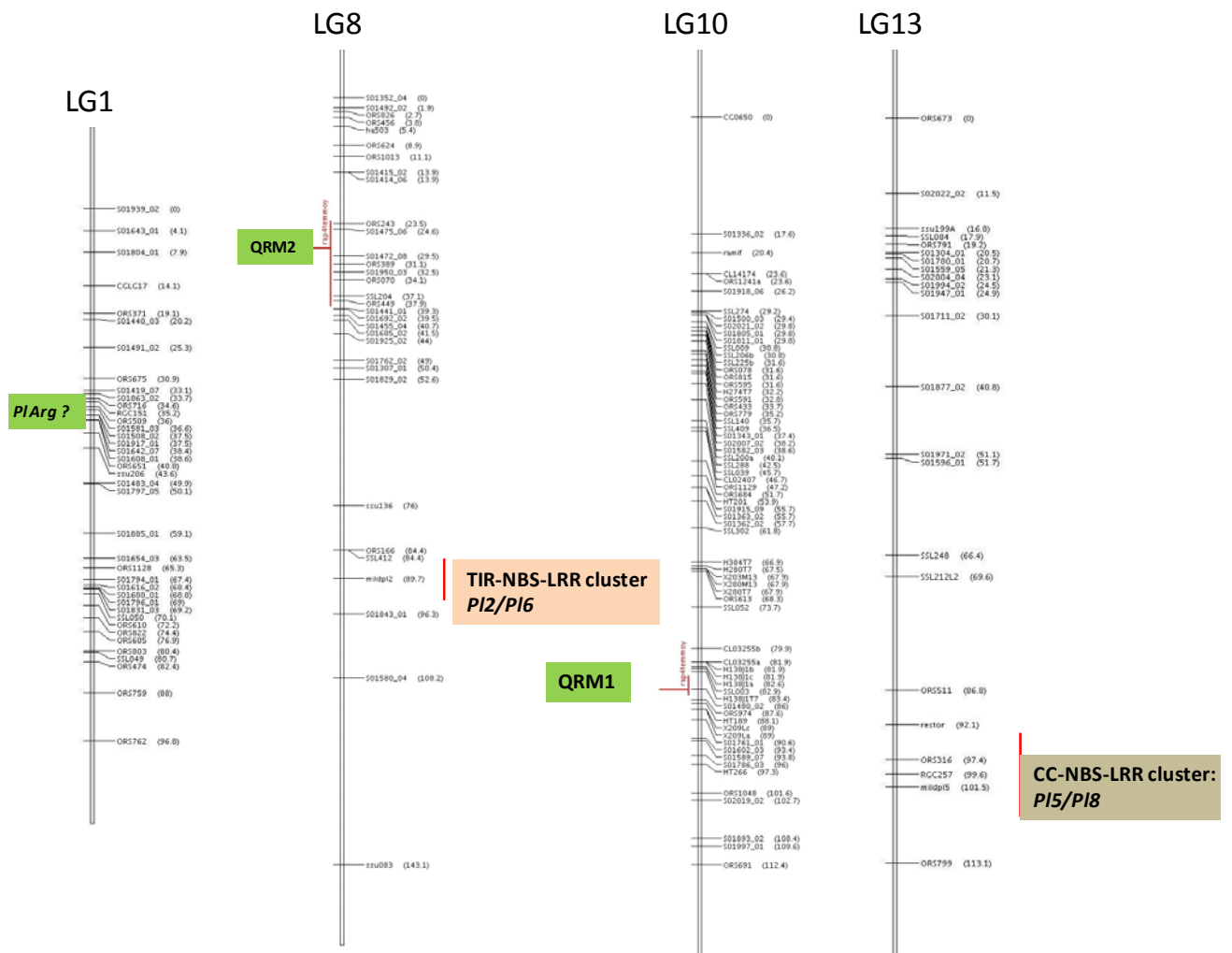


Figure 1 : Localisation sur la carte génétique du tournesol des principaux facteurs de résistances au mildiou *Plasmopara halstedii* connus à ce jour

1.1.4 De nouveaux (?) gènes « en réserve »

Au cours des dix dernières années, les équipes INRA de Clermont-Ferrand (F. Vear) et de Montpellier (H. Serieys) se sont attachées à identifier de nouvelles sources de résistance à la race 710, qui était alors la plus virulente, en particulier dans des formes sauvages de *Helianthus annuus* ou des lignées d'introgession impliquant d'autres espèces du genre *Helianthus* (*H.resinosus*, *H.tomentosus*, *H.decapetalus*, *H.strumosus*).

Une dizaine de sources a été mise en évidence. Cependant, pour statuer sur leur niveau d'originalité, des moyens significatifs devraient être encore mobilisés, en particulier s'il s'avérait que les gènes correspondant appartenait aux larges clusters déjà cartographiés. Deux de ces sources (MTP361 et MTP829) ont été diffusées aux entreprises semencières.

1.1.5 Des connaissances et des outils pour modéliser une solution durable:

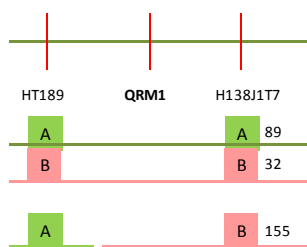
Variabilité génétique du pathogène

La première façon de rendre compte de la variabilité du pathogène est de la confronter à une gamme de génotypes de tournesol ; mais ceci ne permet pas de tracer l'évolution des races dans le temps, donc d'analyser comment cette variabilité se modèle en réponse à la sélection exercée par les gènes de résistance de l'hôte. L'arrivée des outils de caractérisation moléculaire a permis d'apporter quelques éclairages sur cette question. Par ailleurs, la notion de « race » reste très phénotypique, et dans la perspective de comprendre l'évolution conjointe des gènes de résistance de l'hôte et des gènes d'avirulence du pathogène, il serait souhaitable de disposer d'outils pour suivre indépendamment l'évolution du patrimoine général du pathogène, qui influence son agressivité, et celle de l'arsenal de ses outils spécifiques de dialogue avec l'hôte.

A partir d'une collection de 124 EST de *P. halstedii*, un polymorphisme SNP a été mis en évidence par Giresse *et al* (2007) dans 12 EST au sein d'un ensemble de 32 isolats (24 français et 8 russes). Les groupes « français » et « russes » sont bien distingués, et le groupe français présente une assez forte hétérogénéité. A cette forte diversité est associé un niveau d'hétérozygotie faible, ce qui indiquerait que *P. halstedii* est fortement autogame. Ce travail sera prochainement étendu à une collection plus importante d'isolats (Equipe de F. Delmotte, INRA Bordeaux).

RIL	Marqueurs ordonnés dans la zone du QTL (QRM1)									Marqueurs aux gènes <i>Pi</i>			Phénotype (résistance)	
	HT266	X209L4c	HT189	H138J1a	H138J1c	HuCL03255a	SSL003	ORS613	SSL302	LG08_ORS389	LG13_ORS316	LG13_ORS630	Axe1 experience2	Axe1 experience1
7	B	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	-1.1	-0.7
20	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-0.2	-0.3
32	B	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	B	-0.9	-0.7
84	A	B	B	B	B	B	B	A	A	B	B	B	-1.1	-0.9
89	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	0.8	0.7
90	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	0.8	0.7
134	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	0.2	-0.2
137	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	0.1	0.1
143	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	0.7	0.7
145	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	0.6	0.8
151	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	1.0	1.2
153	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	0.8	1.3
155	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	-0.5	-0.5

[B]



[C]

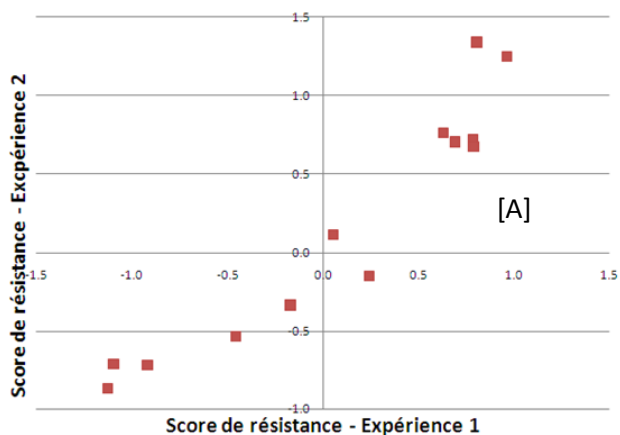


Figure 2 : Cartographie fine de la zone QRM1 impliquée dans une résistance quantitative au mildiou. La répétabilité des données phénotypiques (A) et les données de génotypage (B) permettent de positionner QRM1 entre les marqueurs HT189 et H138J1_T7

Dans la perspective de disposer à terme d'un outil de caractérisation de la pathogénicité des races de mildiou, nous avons cherché à développer des ressources génomiques sur *P. halstedii*, ce qui n'est pas aisé du fait qu'il s'agit d'un parasite obligatoire. Nous avons successivement obtenu des séquences exprimées dans des plantules de tournesol infectées, grâce à un filtre *in silico* basé sur des scores d'homologies de séquences avec des collections de séquences de plantes, et d'oomycètes (As Sadi *et al*, soumis, <http://www.heliagene.org/HP>), puis, en collaboration avec F. Delmotte (INRA Bordeaux) et P. Mestre (INRA Colmar), des séquences exprimées par des spores en cours de germination. Nous avons procédé en ce début d'année au séquençage du génome entier de *Plasmopara halstedii*. Nous avons d'ores et déjà pu identifier chez le mildiou du tournesol des effecteurs de pathogénicité mis en évidence auparavant chez des oomycètes modèles, et notamment le mildiou de la pomme de terre *Phytophthora infestans*. Nous avons également mis en évidence pour ces effecteurs un polymorphisme inter et intra races (As Sadi *et al*, soumis). Un travail en cours (L. Godiard, Q. Gascuel) vise à identifier par transformation transitoire chez le tournesol les phénotypes associés à ces effecteurs. Il est donc vraisemblable qu'à moyen terme, on disposera des outils moléculaires permettant de comprendre comment les pathotypes se sont diversifiés, et d'allouer en probabilité, d'après son « patron », un pathotype à une race. Ces outils pourraient être mobilisés par exemple dans le cadre du suivi phytosanitaire piloté par les Services Régionaux de l'Alimentation (Moinard *et al.*, 2006).

Gérer les interactions plante * pathogène dans l'espace et dans le temps

Disposant d'une gamme diversifiée de sources de résistances spécifiques – celles localisées sur les trois clusters déjà cartographiés, et de nouvelles sources en cours d'étude -, et éventuellement de nouveaux types de mécanismes (ex : QRM1), la question se pose de savoir quelle stratégie peut être mise en place pour assurer une résistance des variétés de Tournesol plus durable dans l'avenir.

Dans le cadre d'un programme soutenu par le Ministère de l'Agriculture, Tourvieille *et al.* (2005) ont comparé les effets de différentes stratégies d'assemblage (association en mélange de différents gènes, cf. stratégie « multiligne », d'alternance (culture successive de versions quasi-isogéniques – au gène PI près - de la même variété sur la même parcelle), et de pyramidage (association de différents gènes au sein de la même variété), sur le devenir quantitatif et qualitatif de la population de pathogène. Sur la durée de l'expérience (4 années), le pyramidage apparaît le plus efficace, mais on imagine qu'à plus long terme il pourrait être susceptible de favoriser l'apparition de résistances multiples. Le schéma d'alternance semble assez prometteur, mais nécessiterait une gestion collective de la sole, ce qui à ce jour apparaît difficile à mettre en place.

1.2 La maladie du « dessèchement précoce » causée par *Phoma macdonaldii* : de l'analyse étiologique à l'identification de géniteurs de tolérance

Parmi les facteurs limitants majeurs du rendement du tournesol, le syndrome du « dessèchement précoce » est présent aujourd'hui dans toutes les zones de production et peut engendrer jusqu'à 70 % de pertes de rendement. Les travaux de recherche conduits depuis 2006 notamment dans le cadre de l'UMT Tournesol ont concerné l'identification des causes de la maladie et les conséquences pour la production en relation avec l'intensité des contraintes hydriques et azotées subies par la culture (Seassau *et al.*, 2010). L'agent pathogène *Phoma macdonaldii* qui provoque des nécroses au niveau du collet et sur racines en est le principal responsable. Il a également été démontré qu'un stress hydrique conjoint à une forte fumure azotée favorise le développement des symptômes. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la validation d'un protocole de mesure de la tolérance aux attaques au collet en conditions d'inoculation artificielle, à la recherche d'une variabilité génétique pour cette tolérance et à son analyse par les méthodes classiques (cartographie de QTL). Deux types de comportements ont été clairement identifiés au sein d'un panel de 48 lignées (Figure 3), certains génotypes n'évoluant jamais vers le stade « pied sec » de la maladie.

Si une variation d'agressivité des souches a pu être mise en évidence, il apparaît que pour les attaques au collet qui engendrent la maladie du « dessèchement précoce », l'interaction {souche du pathogène*génotype de tournesol} peut être négligée au moins dans un premier temps. Nous serions donc dans une situation proche de celle qui est rencontrée avec *Sclerotinia sclerotiorum*, un autre champignon nécrophage.

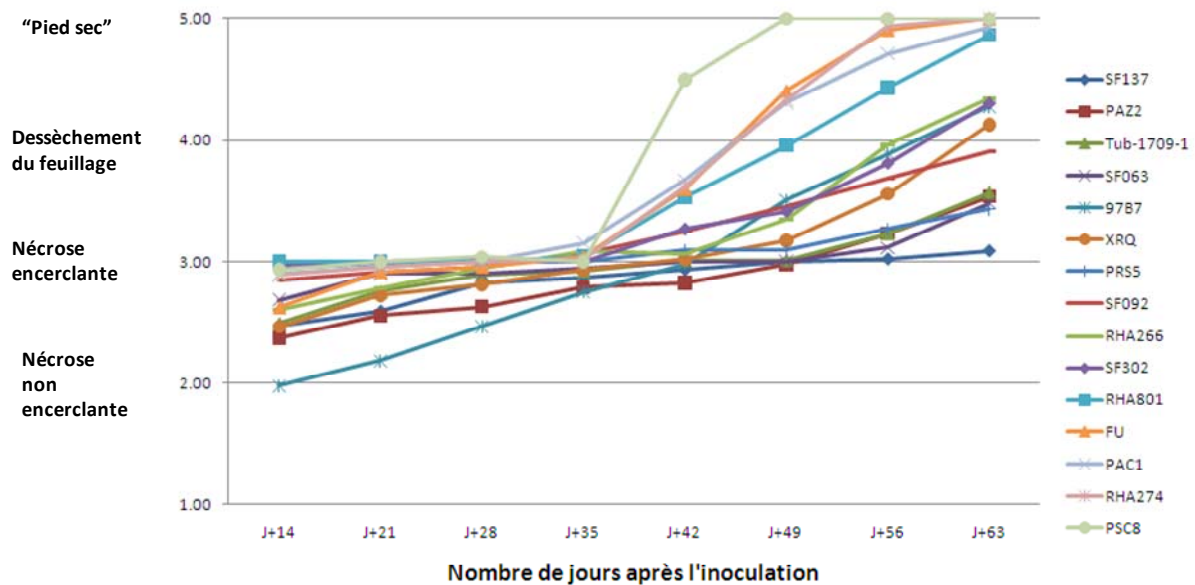


Figure 3 : Evolution différentielle des symptômes de la maladie du « pied sec » causé par *Phoma macdonaldii* dans un ensemble de lignées de tournesol. Le stade « nécrose encerclante » est atteint chez tous les génotypes testés, mais à 35 jours après l'infection, le symptôme du « pied sec » se met en place ou non, traduisant ou non une tolérance à la maladie.

1.3 La tolérance au sclérotinia : un déterminisme génétique complexe, mais une progression continue du niveau de tolérance malgré un manque de connaissances sur les mécanismes impliqués

De nombreux travaux de cartographie ont confirmé depuis vingt ans (Mestries *et al.*, 1998 ; Bert *et al.*, 2002 & 2004 ; Micic *et al.*, 2005 ; Yue *et al.*, 2008) la nature polygénique du déterminisme de la tolérance aux différentes pathologies associées à *Sclerotinia sclerotiorum* : symptômes sur capitule, sur bouton floral, et au collet. Les conditions climatiques des derniers étés – absence d'eau libre à la surface du capitule en cours de floraison – n'ont pas été favorables au développement de ceux des symptômes qui s'expriment principalement en France (attaques sur capitule). Les symptômes sur collet sont considérés comme plus importants dans les autres zones de culture, mais sont à ce jour peu présents en France. Globalement, la mise au point de tests de sélection a permis un progrès génétique régulier, quoique vraisemblablement à un moindre degré pour la résistance aux attaques sur collet. Dans le cadre d'un projet ANR 2006 consacré au sclérotinia des oléagineux européens, un panel de 260 lignées de tournesol - une core collection de lignées cultivées (Coque *et al.*, 2008) complétée par des lignées au comportement connu et des lignées d'introgression d'espèces sauvages – a été évalué au cours de deux campagnes pour la tolérance aux attaques du capitule (Vear et Grezes-Besset, 2010). Cette évaluation solide mériterait d'être valorisée dans une approche de génétique d'association, d'autant que des outils de génotypage SNP très denses sont en cours de validation dans nos équipes.

En parallèle à ces démarches sans *a priori*, la disponibilité prochaine de la séquence génomique du tournesol à laquelle notre équipe participe (Kane *et al.*, 2011) offrirait la possibilité d'identifier certains des QTL majeurs :

- L'interaction *Arabidopsis thaliana* * *Sclerotinia sclerotiorum* a été analysée (Perchepped *et al.*, 2010), notamment dans la perspective d'apporter des éléments d'information sur le sclerotinia du colza, *Brassica napus*. Cette approche est susceptible de faire émerger des candidats importants également dans le cas du tournesol:
- Le rôle de certains produits du métabolisme secondaire (composés phénoliques tels les coumarines) a été mis en évidence (Prats *et al.*, 2003, 2009). La voie de biosynthèse des phenylpropanoïdes est largement documentée, et il est envisageable d'en co-localiser les gènes clés avec les QTL déjà détectés.
- Il est connu depuis longtemps que l'acide oxalique est la principale toxine produite par *Sclerotinia sclerotiorum* (Noyes et Hancock, 1981) et qu'elle agit en induisant la mort cellulaire programmée qui favorise la nécrotrophie de ce champignon. (Kyoung Su Kim, 2008). Cette propriété a été utilisée pour développer des approches transgéniques en faisant s'exprimer dans les plantes hôtes un enzyme (« germin-like »/oxalate oxydase) venant d'une céréale et permettant la dégradation de l'acide oxalique (ex : Brevet FR19910002874). Les «germin-like», qui cependant assurent bien d'autres fonctions biologiques dans la plante, ont été récemment inventoriées chez le soja (Lu *et al.*, 2010), vraisemblablement avec la perspective d'analyser leur co-localisation avec des QTL de résistance au sclerotinia dont souffre également cette espèce. Une telle stratégie pourrait être envisagée chez le tournesol.

1.4 La tolérance au phomopsis

La maladie est apparue en France au milieu des années 1980. Des solutions génétiques ont été assez rapidement identifiées dans des collections de matériel génétique soumis antérieurement à une pression de sélection sur le territoire de l'ex-Yougoslavie, et des cultivars présentant un très bon niveau de résistance ont été assez rapidement disponibles sur le marché. La résistance présente là encore un déterminisme quantitatif (Vear *et al.*, 1997 ; Bert *et al.*, 2002). Des interactions {génotypes de tournesol*souches de phomopsis} ont été mises en évidence (Viguie *et al.*, 1999) mais elles sont d'ampleurs réduites, et les méthodes de sélection pour une résistance de type non race spécifique peuvent être appliquées. En parallèle au développement de variétés résistantes, des approches de modélisation (Debaeke et Estragnat, 2003 ; Debaeke et Moinard, 2010) ont été entreprises pour prévoir, en fonction de l'importance du couvert foliaire, le niveau de risque de développement de la maladie.

2. Quelques sujets de réflexion pour préparer l'avenir

2.1 Un paradigme en mutation

Le paradigme dans lequel se sont mues les équipes d'amélioration génétique de l'INRA au cours de la seconde moitié du vingtième siècle était orienté vers l'action (Figure 4). Il s'agissait notamment de diffuser vers les sélectionneurs publics et privés des solutions génétiques (ressources et mode d'emploi) aux problèmes posés en culture - par le développement de nouvelles pathologies, pour ce qui nous concerne - et aussi de produire des recommandations pour l'organisme chargé de l'inscription variétale, afin qu'il puisse exercer son rôle de protection des utilisateurs de semences, les agriculteurs.

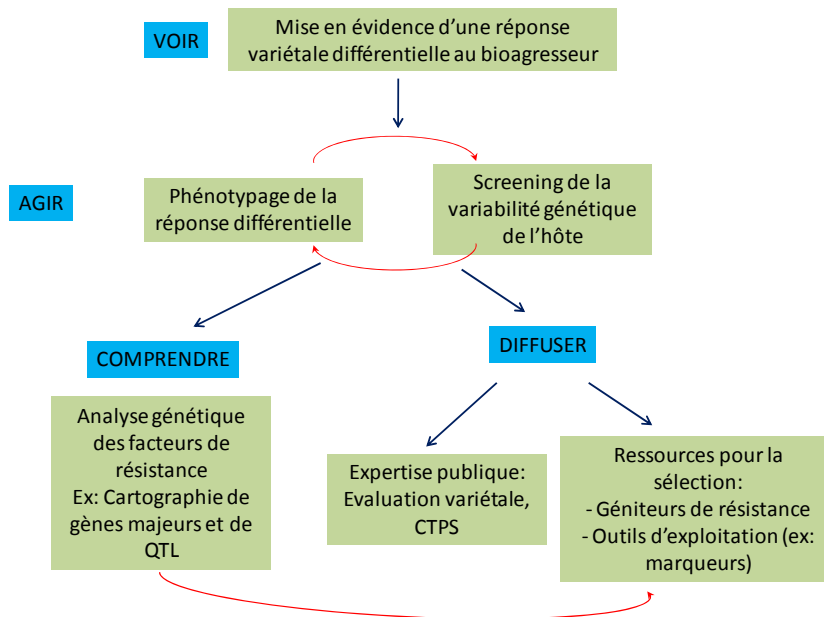


Figure 4 : Le paradigme de l'amélioration des plantes pendant la seconde moitié du vingtième siècle. Exemple de la tolérance aux maladies

En quelques années, ce paradigme est entré en profonde mutation, du fait de la conjonction de différents facteurs. Ne retenant ici que ceux qui concernent les filières agricoles et agroindustrielles, nous pouvons citer :

- Les questions scientifiques, sociétales et éthiques posées à l'origine par le développement potentiel des OGM, avec leur corollaire : la remise en cause du « tout génétique », qui a renforcé les questionnements légitimes sur la durabilité des solutions génétiques apportées, et a aussi incité à réfléchir à nouveau aux équilibres et aux interactions à mettre en œuvre au sein du triptyque {environnement, plante, pathogène}.
- La remise en cause du rôle de l'Etat dans la réglementation de la mise en marché (« better regulation »)

Le nouveau paradigme se caractérise par une incitation à accorder une place plus précoce dans le processus à la compréhension des mécanismes, si possible à l'échelle systémique, et à la hiérarchisation des questions. On observe une pathologie, mais quelle est sa réelle nuisibilité (relation dégâts/dommages) ? En complément, voire en alternative, à des solutions génétiques coûteuses à développer et à la durabilité incertaine, n'existe-t-il pas des conduites de cultures ou une organisation de l'espace agricole qui limiterait le développement des foyers infectieux ? Une résistance quantitative qui exerce une pression moins forte sur l'évolution de la virulence du pathogène n'aura-t-elle pas *a contrario* un effet néfaste sur l'évolution de son agressivité ? De telles questions sont pertinentes, et offrent le grand intérêt de stimuler les réflexions interdisciplinaires. Il faudra cependant certainement veiller, dans ce mouvement de balancier, à préserver la place de l'innovation génétique. Que celle-ci devienne le fait de plus en plus des entreprises de sélection ne fait aucun doute ; qu'un flux visant à l'exploitation conjointe des connaissances fondamentales et de ressources génétiques originales ait vocation à survivre ne nous semble présenter aucun doute.

2.2 Le moteur et le carburant

Les interactions plantes*micro-organismes constituent un objet de recherche primordial au plan mondial en particulier du fait de la nécessité de réduire les intrants phytosanitaires. Les travaux pionniers conduits sur les espèces modèles ont permis par des approches ciblées (un gène candidat, sa régulation, ses cibles,...) ou de façon croissante par des approches globales à l'échelle du génome et du transcriptome entier, d'identifier des mécanismes moléculaires génériques / ubiquistes. Les résultats de ces approches mécanistiques - le moteur - sont un prérequis pour aborder la compréhension des

phénomènes y compris sur les espèces d'intérêt agronomique. Mais le carburant qui fait vivre cette mécanique reste la variabilité génétique accessible.

D'un autre côté, la part de cette variabilité mobilisée dans les expériences ainsi que la méthode retenue pour révéler l'interaction crée un filtre sur ce que nous sommes susceptibles d'observer. Pour illustrer notre propos, nous reviendrons sur le pathosystème {tournesol*mildiou} (Figure 5). Une étude transcriptomique a permis de révéler que pas moins de 17% des 32421 gènes de l'espèce *Helianthus annuus* présents sur la puce Affymetrix™ que nous avons utilisée sont exprimés de façon différentielle - en présence ou non du pathogène - en situation compatible (sensibilité) ou incompatible (résistance).

Cela signifie :

- Que le filtre imposé expérimentalement par la variabilité génétique de l'hôte et du pathogène, et aussi par la méthode d'évaluation de leur interaction n'avait fait jusqu'à ce jour émerger qu'un nombre très limité d'acteurs - la « part visible de l'iceberg » - : les gènes *PI*, puis les QTL de résistance quantitative du côté du tournesol, et plus récemment des effecteurs de pathogénicité du côté du mildiou.
- Que l'analyse de la grande masse d'information générée par l'analyse du transcriptome, pour laquelle des méthodes d'analyse en réseaux sont en cours de développement, devrait particulièrement considérer ces réseaux avec la vision du « carburant » : dans l'approche « mécanistique » de telles données, les nœuds clés de ces réseaux seraient ceux des gènes dont le dysfonctionnement, démontré par des mutants naturels ou induits, par exemple lignées d'insertion tDNA ou sur-expresses, en général sur des espèces modèles, entraînent une perturbation majeure du processus de réponse de la plante. Katagiri et Tsuda (2010) ont souligné les limites auxquelles était soumise l'interprétation de la relation {génotype*phénotype} en terme de rôle joué par les gènes éléments du réseau. Pour des « améliorateurs de plante », seront nœuds clés de ces réseaux ceux des gènes qui, dans l'espèce considérée ou parmi ses apparentées, présentent une variabilité accessible pour l'action, les autres ayant été contraints par l'histoire évolutive.

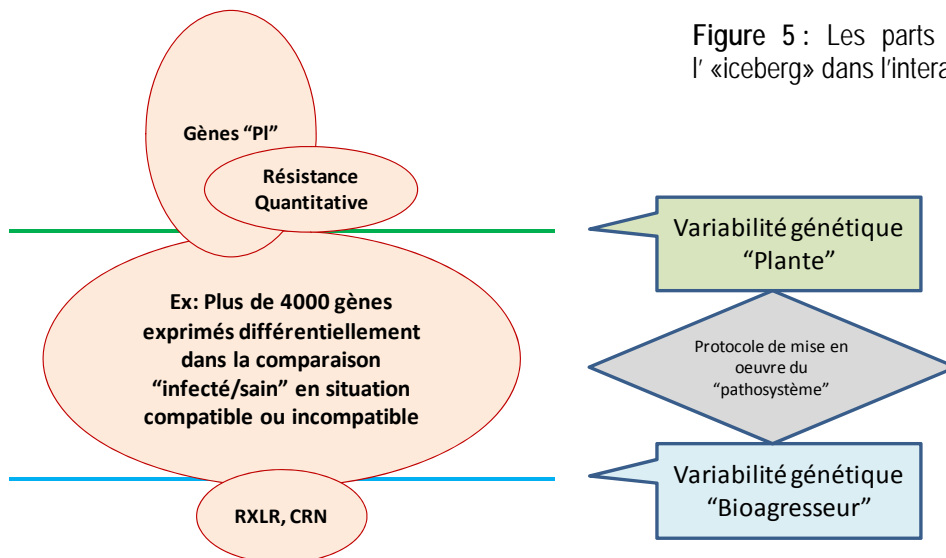


Figure 5 : Les parts visibles et cachées de l' « iceberg » dans l'interaction tournesol*mildiou

On peut également concevoir qu'il existe, pour un même couple « hôte*pathogène » un continuum de systèmes de test - autrement dit, différents « pathosystèmes »-, aptes chacun à révéler telle ou telle fraction de l' « iceberg », selon la finesse de la méthode de phénotypage des symptômes retenus. Les techniques de séquençage du transcriptome (RNA-Seq et DGE) continuent de se développer et leur coût diminue. Les outils de bioinformatique permettant l'assemblage de ces séquences et leur

annotation sont maintenant disponibles. L'analyse du transcriptome est donc en passe de devenir un outil de phénotypage à part entière, et il devient envisageable de modifier le protocole de mise en œuvre de l'interaction dans l'objectif de pénétrer la « part cachée de l'iceberg » et de révéler des variants qui ne sont pas exploités à ce jour.

Conclusion

La sélection du tournesol pour sa tolérance aux maladies a été efficace au cours des cinquante dernières années, et des perspectives de progrès sont encore largement envisageables. On peut cependant observer que le statut de cette espèce – ni espèce modèle au sens académique, ni espèce agronomique d'intérêt tel qu'elle mobilise des efforts publics ou privés qui la transforment de fait en espèce modèle – fait que les mécanismes sous-jacents aux progrès effectués sont encore largement inconnus. Or, il est très vraisemblable que pour répondre aux questions complexes que pose la prise en compte des interactions multiples {plante * pathogène * système de culture * environnement abiotique non contrôlé}, l'accès à ces mécanismes sera nécessaire. En effet, ces questions ne pourront être traitées uniquement par la compilation d'expériences, mais devront impliquer une démarche de modélisation, et donc notamment de représentation des connaissances, comme cela a déjà été entrepris. Dans ce contexte, et en particulier pour prendre en compte la dimension temporelle – au sens évolutif - des processus, et donc pour traiter de la question de la durabilité des résistances, il deviendra primordial de formaliser la connaissance sur ce qui, dans le réseau de gènes mis en œuvre au cours de l'interaction {plante*bioagresseur}, peut intervenir comme paramètre clef : à la fois un nœud du réseau des facteurs génétiques impliqués, au sens du moteur que constitue le polymorphisme dans le genre *Helianthus*, et un paramètre auquel le modèle de représentation spatio-temporel de l'évolution du couple {plante*bioagresseur} sera sensible.

Remerciements

Les travaux sur la tolérance aux maladies du tournesol au sein des équipes du LIPM (INRA-CNRS, Toulouse) et de l'UMR GDC (Clermont-Ferrand) ont bénéficié de soutiens spécifiques du CETIOM, de l'INRA (dispositif « package » 2007-2011, Appel d'offre Bioressources 2008 et 2009), de l'ANR (Géoplante 2006-2009) et de l'association PROMOSOL. Nous tenons également à remercier Sébastien Carrère et Jérôme Gouzy (LIPM) pour leur contribution essentielle au développement des outils bioinformatiques pour le tournesol et pour *Plasmopara* sp.

Références bibliographiques

- Bachlava E., Radwan O.E., Abratti G., Tang S.X., Gao W.X., Heesacker A.F., Bazzalo M.E., Zambelli A, Leon A.JJ., Knapp S.J., 2011. Downy mildew (PI (8) and PI (14)) and rust (R (Adv)) resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. *Theoretical and Applied Genetics* 122, 1211-1221.
- Bert P.F., Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Serre F., Nicolas P., Vear F., 2002 Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theoretical and Applied Genetics* 105, 985-993.
- Bert P.F., Dechamp-Guillaume G, Serre F, Jouan I., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Vear F., 2006. Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) - 3. Characterisation of QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Phoma macdonaldii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 865-874.
- Bouzidi M.F., Badaoui S., Cambon F., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S., 2002. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor Appl Genet* 104, 952-600

- Debaeke P., Estragnat A., 2003. A simple model to interpret the effects of sunflower crop management on the occurrence and severity of a major fungal disease: Phomopsis stem canker. *Field Crops Research* 83, 139-155
- Debaeke P., Moinard J., 2010. Effect of crop management on epidemics of phomopsis stem canker (*Diaporthe helianthi*) for susceptible and tolerant sunflower cultivars. *Field Crops Research* 115, 50-60
- Delmotte F., Giresse X., Richard-Cervera S., Tourvieille de Labrouhe D., 2008. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii*, the plant pathogen causing sunflower downy mildew. *Infection, Genetics and Evolution* 8, 534–540
- DeYoung B.J., Innes R.W., 2006. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense *Nature Immunology* 7, 1243-1249
- Dussle C.M., Hahn V., Knapp S.J., Bauer E., 2004. PIArg from *Helianthus argophyllus* is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1083-1086.
- Freyssinet G., Sailland A., 2001 Production of plants resistant to attacks by *Sclerotinia sclerotiorum* by the introduction of a gene encoding an oxalate oxidase Brevet FR19910002874: Applicant: Rhône Poulenc Agrochimie.
- Giresse X., Tourvieille de Labrouhe D., Richard-Cervera S., Delmotte F., 2007. Twelve polymorphic expressed sequence tags-derived markers for *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew. *Molecular Ecology Notes* 7, 1363-1365
- Katagiri F., Tsuda K., 2010. Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant Microbe Interactions* 23, 1531-1536
- Kim Kyoung S., Min J.Y., Dickman M.B., 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant Microbe Interaction* 21, 605-612
- Lu M., Han Y.P., Han Y.P., Gao J.G., Wang X.J., Li W.B., 2010. Identification and analysis of the germin-like gene family in soybean. *BMC Genomics* 11, 620
- Mestries E, Gentzittel L., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P, Vear F., 1998. Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L) using molecular markers. *Molecular Breeding* 4, 215-226
- Micic Z., Hahn V., Bauer E., Melchinger A.E., Knapp S.J., Tang S., Schon C.C., 2005. Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 233-242
- Noyes R.D., Hancock J.G., 1981. Role of oxalic acid in the sclerotinia wilt of sunflower. *Physiological Plant Pathology* 18, 123-132.
- Prats E., Galindo J.C., Bazzalo M., ; Leon A., Macias F.AA., Rubiales D., Jorriin J.V., 2007. Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype *Journal of Chemical Ecology* 33, 2245-2253
- Prats E., Bazzalo M.E., Leon A., Jorriin J.V., 2003. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 132, 321-329
- Radwan O., Bouzidi M.F., Vear F., Philippon J., Tourvieille de Labrouhe D., Nicolas P., Mouzeyar S., 2003. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the PI5/ PI8 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor Appl Genet* 106, 1438-1446
- Radwan O., Bouzidi M.F., Nicolas P., Mouzeyar S., 2004. Development of PCR markers for the PI5/PI8 locus for resistance to *Plasmopara halstedii* in sunflower, *Helianthus annuus* L. from complete CC-NBS-LRR sequences. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 176-185
- Seassau C., Dechamp-Guillaume G., Mestries E., Debaeke P., 2010. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii*. *Field Crops Research* 115, 99-106
- Tourvieille de Labrouhe D., Gulya T., Masirevic S., Penaud A., Rashid K.Y., Viranyi F., 2000. New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower Downy Mildew). XVth. International Sunflower Conference – Toulouse june 2000, 12-15

- 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, 433-444
- Vear F., Garreyn M., Tourvieille de Labrouhe D., 1997. Inheritance of resistance to Phomopsis (*Diaporthe helianthi*) in sunflower. *Plant Breeding* 116, 277-281
- Vear F., Serre F., Jouan-Dufournel 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* L.). *Euphytica* 164, 561-570
- Vear F., Grezes-Besset B., 2010. Progress in breeding sunflowers for resistance to Sclerotinia Proceedings of the International Symposium "Sunflower Breeding on Resistance to Diseases". Krasnodar, Russia June 23-24
- Vear F., Marie-Hélène Muller M.H., 2011. Progrès variétal chez le tournesol : l'apport des ressources génétiques au sein du genre *Helianthus*. *Innovations Agronomiques* 14, 139-150
- Virányi F., 2002 : The Sunflower-Plasmopara Halstedii Pathosystem: Natural and Artificially Induced Coevolution. In *Advances in Downy Mildew Research* Spencer-Phillips P.T.N, Gisi U. and Lebeda A. 67-172.
- Wieckhorst S., Bachlava E., Dussle C.M., Tang S., Gao W., Saski C., Knapp S.J., Schon C.C., Hahn V., Bauer E., 2010. Fine mapping of the sunflower resistance locus PI (ARG) introduced from the wild species *Helianthus argophyllus*. *Theoretical and Applied Genetics* 121, 1633-1644
- Yue B., Radi S.A., Vick B.A., Cai X., Tang S., Knapp S.J., Gulya T.J., Miller J.EE., Hu J., 2008. Identifying quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology* 98, 926-931