

**ANALYSE GENETIQUE DE LA RESISTANCE AU PHOMOPSIS (*DIAPORTHE HELIANTHI* MUNT.-CVET. ET AL.) CHEZ LE TOURNESOL CULTIVE (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

**GENETIC ANALYSIS OF PHOMOPSIS (*DIAPORTHE HELIANTHI* MUNT.-CVET. ET AL.) DISEASE RESISTANCE IN CULTIVATED SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.)**

**Kamel Langar, Yves Griveau ✉, Hervé Serieys and André Bervillé.**

UFR de génétique et amélioration des plantes, ENSA.M-INRA, 2 Place Pierre Viala F34062 Montpellier cedex 2. ✉ [griveau@ensam.inra.fr](mailto:griveau@ensam.inra.fr)

**SUMMARY**

LR4-17, a sunflower inbred line with stable resistance to the ascomycete fungus *Diaporthe/Phomopsis helianthi* (Munt. Cvet.*et al*, 1981), was crossed to the highly susceptible inbred line Ha89. 232 recombinant inbred lines (RILs) were produced. The F1, F2/F3 progeny were evaluated for Phomopsis in fields under semi natural condition by using infested stems as sources of inoculum. The F1 hybrids presented an intermediate behaviour compared to parents. Segregation for resistance between F2/F3 derived families indicated a complex inheritance of Phomopsis resistance genes in offspring. No family was found more resistant than LR4-17. In contrast, we noted some derived families more susceptible than HA89. This transgression indicated the presence of resistance factors in HA89. The study of the evolution of necrosis on artificially infected leaves of each of the 232 RIL suggested that resistance on leaves is influenced by one major gene and that at least two complex factors influence resistance in petiole and stem tissues. Most of the traits presented significant genetic variation and high heritability . We conclude that derived inbred lines offer promising opportunities to select resistant lines and for molecular analysis of resistance. The association of molecular markers and phenotypic traits will provide a high-resolution QTL analysis and accurate identification of Phomopsis resistance genes expressed in leaves, petioles and stems.

**RESUME**

LR4-17, une lignée pure de tournesol présentant une résistance stable au phomopsis, (*Diaporthe/Phomopsis* Munt. Cvet.*et al.*), a été croisé à la lignée pure fortement sensible HA89. Les descendances F2/F3 ont été évaluées pour leur comportement vis-à-vis du Phomopsis en conditions semi-naturelles avec des tiges infectées comme source d'inoculum. La ségrégation pour la résistance entre les familles dérivées F2/F3 a mis en évidence une transmission complexe des gènes de résistance de Phomopsis dans la descendance. Aucune famille n'a été trouvée plus résistante que LR4-17. A l'opposé, nous avons noté des familles plus sensibles que le parent HA89. Cette transgression suggère la présence des facteurs de résistance dans HA89. 232 lignées recombinantes (RILs) ont été ensuite produites à partir du croisement HA89 x LR4-17. L'étude de l'évolution des nécroses sur les 232 RIL après infections artificielles sur feuilles suggère que la résistance sur feuille est influencée par un gène majeur et qu'une hérédité plus complexe contrôle la résistance sur pétioles et tiges. La plupart des caractères liés à l'infection présentaient une variation génétique significative et une héritabilité élevée. On conclut que les lignées recombinantes sont un matériel de choix pour une analyse moléculaire de la résistance au phomopsis. Des éléments de stratégie sont proposés pour relier la ségrégation des marqueurs et le comportement des lignées recombinantes vis-à-vis du phomopsis.

## INTRODUCTION

Le Phomopsis (*Diaporthe helianthi* Munt-Cvet *et al.*) peut provoquer d'importants dégâts sur tournesol en culture allant jusqu'à 30% de pertes de rendement. Les études sur la génétique de la résistance au phomopsis mettent en évidence une variation continue dans le comportement des variétés. Certains auteurs émettent l'hypothèse d'un contrôle oligogénique de la résistance au phomopsis (Vranceanu *et al.*, 1993). Vear *et al.* (1997) ont montré qu'il est possible de sélectionner la résistance au phomopsis chez les parents pour obtenir des hybrides résistants. La lignée LR4-17 sélectionnée par l'INRA à partir de l'hybride yougoslave NS-H-45 (Skoric, 1985) apparaît cumuler un maximum de facteurs de résistance dans le matériel dont nous disposons. En particulier, elle manifeste à la fois une résistance précoce et une résistance tardive à l'infection (Langar *et al.* 1997). C'est pourquoi une population de lignées recombinantes tirées de HA89 x LR4-17 a été choisie pour réaliser une cartographie moléculaire des facteurs de résistance au phomopsis. Dans le présent article, nous décrivons la variabilité génétique pour la résistance au phomopsis manifestée dans cette population et les conséquences qui peuvent en être tirées pour une stratégie de marquage moléculaire.

## MATERIEL ET METHODES

La lignée HA89 a été croisée avec la lignée LR4-17 avec castration chimique. 242 Plantes F2 ont été autofécondées pour donner des lignées recombinantes. Les familles F3 ont été évaluées au champ en infection semi-naturelle pour la résistance au phomopsis. 232 lignées recombinantes ont été obtenues à partir du croisement HA89 x LR4-17 par autofécondations successives. Les générations F7 ont été étudiées en conditions semi-naturelles et en infections artificielles en 1997. Les essais en infections semi-naturelles ont été réalisés à Toulouse en 1997. Les essais en infections artificielles ont été réalisés.

En infection semi-naturelle, chaque lignée était représentée par deux répétitions de 20 plantes. Les essais étaient répartis en blocs de Fisher avec pour témoins HA89, LR4-17 et les hybrides Agrisol (résistant) et Viki (sensible). L'infection était réalisée par apport de cannes de tournesol infectées à raison de 2 par parcelle. On a noté la date de floraison (50% de plantes à ligules ouverts), le nombre de plantes attaquées sur tiges et le nombre de plantes avec taches encerclantes à fin floraison et à maturité physiologique. Ont été calculés :

TGI3 (%) : taux de plantes attaquées sur tiges à fin floraison en F3

TGF3 (%) : taux de plantes attaquées sur tige à maturité physiologique en F3

CEI3 (%) : taux de plantes avec taches encerclantes à fin floraison en F3

CEF3 (%) : taux de plantes avec taches encerclantes à maturité physiologique en F3

TGI7 : taux de plantes attaquées sur tiges à fin floraison en F7

TGF7 : taux de plantes attaquées sur tige à maturité physiologique en F7

CEI7 (%) : taux de plantes avec taches encerclantes à fin floraison en F7

CEF7 (%) : taux de plantes avec taches encerclantes à maturité physiologique en F7.

Les infections artificielles ont été réalisées sous tunnel avec brumisation. Chaque lignée était représentée par trois plantes. Les témoins ont été répartis en blocs randomisés dans les tunnels avec 8 répétitions en 1997. L'apport d'eau a été réalisé avec une brumisation contrôlée par humectostat de façon à entretenir la présence d'eau libre sur les feuilles (Tourvieille et Vear, 1986). Du mycélium de *D. helianthi* a été apporté sur chaque plante à l'extrémité d'une feuille et recouvert d'aluminium (Bertrand et Tourvieille, 1987). On a mesuré ensuite la longueur des nécroses sur limbe, pétiole et tige, et l'importance des symptômes selon l'échelle suivante : 0 = pas de nécrose, 1 = nécrose dépassant la feuille d'aluminium de moins de 1 cm, 2 = nécrose dépassant la feuille d'aluminium de plus de 1 cm, 3 = nécrose sur le quart de la nervure, 4 = nécrose sur la moitié de la nervure, 5 = nécrose sur les trois quarts de la nervure, 6 = nécrose sur le limbe entier, 7 = nécrose sur pétiole, 8 = nécrose sur tige, 9 = nécrose encerclant la tige, 10 = nécrose encerclante et casse de la tige. Les notations ont été réalisées 2 fois par semaines pendant 6 semaines, jusqu'à la maturité physiologique. Les plantes dont les notes ne dépassaient pas 2 en fin de cycle ont été considérées comme non infectées.

Les progressions des nécroses ont été rapportées à la durée pour calculer des vitesses d'évolution sur limbe. Les caractères suivants sont pris en compte : TL7 (jours) : temps de latence en F7, durée séparant l'infection des premiers symptômes ; VMAX7 (cm/j) vitesse

maximale d'évolution des nécroses sur limbe en F7 ; VF7 (cm/j) vitesse finale d'évolution des nécroses sur limbe en F7 : dernière vitesse notée avant passage de la nécrose sur pétiole ou la fin du cycle ; NF7 note en fin de cycle selon l'échelle de 1 à 10 à la fin de cycle en F7

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Héritabilité des caractères (tableau 1)

Elles ont été calculées d'après des analyses de variances selon le modèle  $P_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$ , avec  $P_{ij}$

**Tableau 1 : Moyennes et héritabilités des caractères mesurés en infections semi-naturelle et artificielles**

Caractère	Moyenne	Héritabilité %
<b>Infections semi-naturelles</b>		
TGI3	53.2%	69.4***
TGF3	94.6%	74.8***
CEI3	3.3%	47.7***
CEF3	66.0%	50.5***
TGI7	9.8%	61.7***
TGF7	64.0%	47.7***
CEI7	1.1%	38.7***
CEF7	16.4%	61.0***
<b>Infections artificielles</b>		
TL7	12 jours	25.3***
VMAX7	0.474 cm/j	73.8***
VF7	0.408 cm/j	82.3***
NF7	6.89	30.0***

\*\*\* Effet famille F3 ou effet lignée F7 significatif à

la valeur phénotypique de la plante  $j$  (répétition  $j$ ) de la lignée  $i$ ,  $\mu$  la moyenne de toutes les lignées,  $G_i$  l'effet de la lignée  $i$  sur le caractère et  $\varepsilon_{ij}$  la résiduelle. Pour les infections semi-naturelles, les données parcellaires ont subi la transformation angulaire et sont ajustées des effets essais et blocs sur les témoins. Pour les infections artificielles, chaque plante a été considérée comme une répétition de la lignée. En infection semi-naturelle, les héritabilités observées sont fortes, même lorsque les taux d'attaques sont faibles. Cependant, le plus faible taux d'attaque observé en F7 a conduit à des héritabilités plus faibles qu'en F3, contrairement à ce qu'impliquerait le niveau de fixation des lignées. En infection artificielle, les

héritabilités des vitesses maximales et vitesses finales sur feuilles sont très élevées.

### Distribution des taux d'attaques au champ en infection semi-naturelle

Les distributions des taux d'attaques sur tiges et des taches encercleuses en F3 et F7 sont continues et unimodales (fig. 1 et 2). Cependant leur symétrie dépend du niveau d'attaque, aucune famille F3 ni lignée F7 n'est plus résistante que LR4-17. Par contre, on observe des lignées plus sensibles que HA89 en F7 pour le taux de taches encercleuses à floraison (CEI7).

### Distribution des vitesses d'évolution des nécroses en infection artificielle

Pour le temps de latence TL7 (fig. 3a) la distribution est pratiquement symétrique, mais non normale (test de Shapiro-et Wilk,  $P < 0.05$ ). Elle admet un mode principal égal à sa médiane. Les parents, bien que significativement différents, ne sont pas aux extrémités de la distribution, HA89 présentant sa moyenne proche de celle de la population. Les distributions des vitesses maximales et vitesses finales apparaissent significativement non normales (test de Shapiro-Wilk,  $P < 0.05$ ) et bimodales (fig. 3b et 3c). Pour ces deux critères, les distributions sont comprises entre les moyennes des parents, ce qui suggère qu'un facteur majeur pour la résistance à l'avancement du parasite sur feuille ségrège dans la population, en addition avec des facteurs d'effets moindre.

### Corrélations entre les caractères observés dans les lignées recombinantes

Nous avons constaté des corrélations significatives faibles entre expériences pour un même mode d'infection, semi-naturelles d'une part, artificielle d'autre part, (tab. 2). Elles sont très faibles entre les deux modes d'infection. Ceci peut s'expliquer par l'existence de génotypes chez lesquels la vitesse de croissance des nécroses varie selon les organes et qui se classent différemment selon la cinétique et l'intensité de l'attaque. L'expérimentation des descendances du croisement HA89 x LR4-17 a confirmé que LR4-17 constitue une source de résistance élevée au phomopsis. La distribution continue des taux d'attaques finaux dans les 2 modes d'infection, associée à des héritabilités élevées, implique un déterminisme complexe de cette résistance. Ceci est à relier avec l'observation de niveaux intermédiaires de résistance

à *D. helianthi* chez les variétés cultivées. Les hybrides des classes peu sensibles et très peu sensibles manifestent en moyenne de faibles taux de taches encerclantes en fin de cycle, qui est le symptôme le plus fortement lié à la baisse de rendement (Pinochet et Estragnat, 1996). Cependant, les génotypes intermédiaires, hybrides (Viguié, 1999) et lignées (Langar *et al.*, 2000) présentent des résistances moins stables que les hybrides de type Agrisol ou la lignée LR4-17, tant vis-à-vis des conditions expérimentales que des isolats de *D. helianthi*

Tableau 2 : Corrélations entre caractères d'attaques de phomopsis en infections semi-naturelles et artificielles

	TGI7	TGF7	CEI7	CEF7	TL7	VMAX7	VF7	NF7
TGI7								
TGF7	0.59***							
CEI7	0.80***	0.49***						
CEF7	0.73***	0.80***	0.69***					
TL7	-0.13	-0.20**	-0.10	-0.18*				
VMAX7	0.21**	0.31***	0.18*	0.33***	-0.35***			
VF7	0.13	0.30***	0.13	0.26***	-0.43***	0.92***		
NF7	-0.04	-0.06	-0.03	0.00	-0.35***	-0.04	0.00	

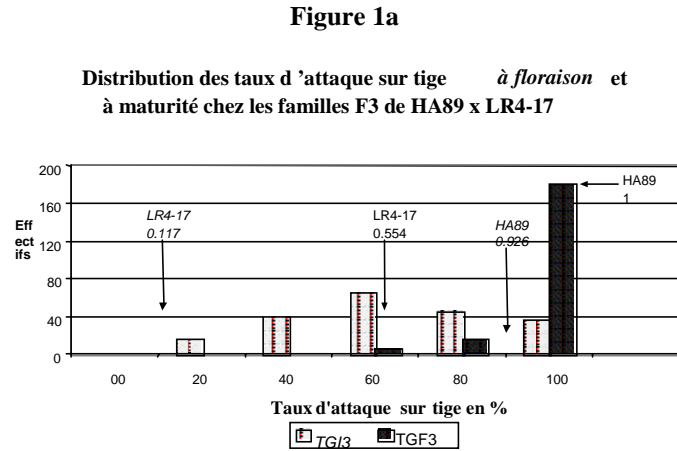
Par ailleurs, les corrélations faibles mais significatives entre les vitesses en infections artificielles et les taux d'attaques en infection semi-naturelles suggèrent que la résistance à *D. helianthi* provenant de LR4-17 comporte plusieurs composantes, précoce sur feuille, et tardive sur pétiole et sur tige. Ces composantes ségrègent indépendamment dans la population de lignées recombinantes, l'intensité de l'attaque à maturité en est la résultante. Langar *et al.* (2000) observent que les résistances sur tige et sur feuille sont séparées chez des génotypes à comportements intermédiaires. Ceci est confirmé par la forme différente des distributions des vitesses sur feuilles qui suggère la prépondérance d'une hérédité monogénique pour contrôler ces caractères, et celles continues des notes et taux d'attaques à maturité. Cependant, les infections artificielles permettent d'approcher une cinétique d'évolution des symptômes sans évaluer la variabilité pour la résistance d à la pénétration des spores (Viguié, 1999).

Les données expérimentales donnent des indications pour une stratégie de marquage moléculaire. Une recherche de QTL est indispensable pour accéder aux différentes composantes de la résistance. Elle se fera par l'analyse des relations des marqueurs avec le taux de taches encerclantes en infection semi-naturelle et les taux d'attaques sur tige fortement corrélés au précédent. Les vitesses maximales et finales, corrélés également au taux de taches encerclantes, sont les critères de constitution de « bulks » pour déterminer les marqueurs d'un facteur majeur de résistance sur feuille apporté par LR4-17.

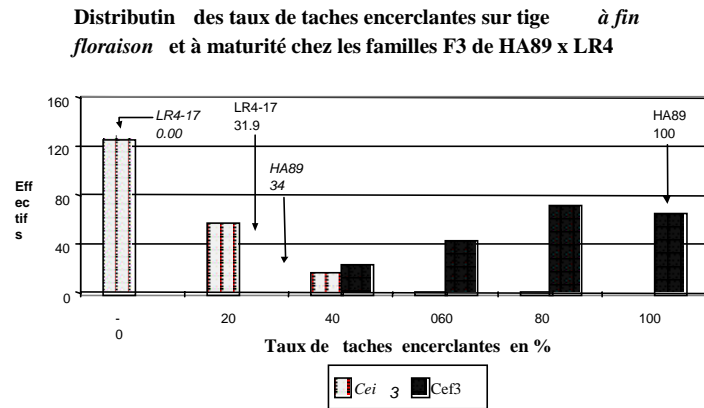
## REFERENCES

- Bertrand F. et Tourvieille D.**, (1987) Phomopsis tournesol : Tests de sélection. Inf. Tech. CETIOM 98, 12-18.
- Langar K., Griveau Y., Vares D., Bervillé A.**, (1997) : Evaluation of resistance to phomopsis on wild species, cultivars and inbreds of sunflower with artificial and seminatural infections. 10<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union – June 1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> 1997, Montpellier (France), pp 831-837.
- Langar K., Griveau Y., Ziercher L., Serieys H. and Bervillé A.** (2000) Comportement de génotypes de tournesol (*H. annuus* L.) vis-à-vis de cinq isolats de phomopsis (*Diaporthe helianthi* Munt-Cvet. *et al.*) observé à partir d'infections artificielles sur feuilles, Proc. 15<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., Toulouse (France), In press
- Muntanola-Cvetkovic M., Mihaljcevic M., Petrov M.**, (1981) On the identity of the causative agent of a serious Phomopsis Diaporthe disease in sunflower plants. Nova Hedwigia 34, 417-435.
- Pinochet X, Estragnat, A** (1996) Field evaluation of hybrid sensitivity to *Diaporthe helianthi* : relation between symptoms and yield losses. Proc. 14<sup>th</sup> Int. Sunflower Conf., Beijing (China), Symposium I: Disease tolerance in sunflower, pp 102-105.
- Skoric D.**, (1985) Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe/Phomopsis helianthi* Munt-Cvet *et al*, Helia 8, 21-24.
- Tourvieille D. et Vear F.**, (1986) : Culture du tournesol sous tunnel en filet avec humectation contrôlée pour l'étude du *Sclerotinia sclerotiorum*. Inf. Tech. CETIOM 96. 20-28.
- Vear F., Garreyn M., Tourvieille D.**, (1997) Inheritance of resistance to phomopsis (*Diaporthe helianthi*) in sunflower. Plant Breeding 116, Berlin, 277-281.
- Viguié A.**, (1999) Etude du pathosystème *Phomopsis helianthi/ Diaporthe helianthi* Munt-Cvet. - tournesol (*Helianthus annuus* L.) - Thèse de Doctorat Univ. Blaise-Pascal, Clermont-Ferrand, France, 84 p
- Vranceanu A.V., Craiciu D.S., Soare G., Pacureanu A.V., Voinescu G., Sandu I.**, (1993) Sunflower genetic

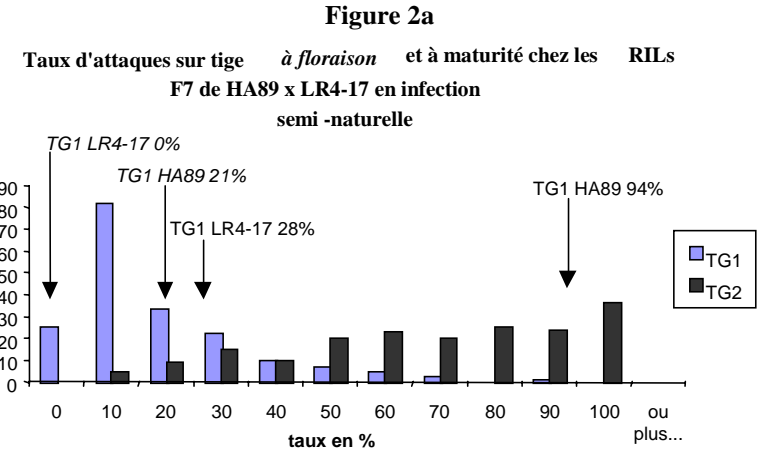
**Figure 1 : Taux d'attaques par *Diaporthe helianthi* en infections semi-naturelles dans la population F3 de HA89 x LR4-17**



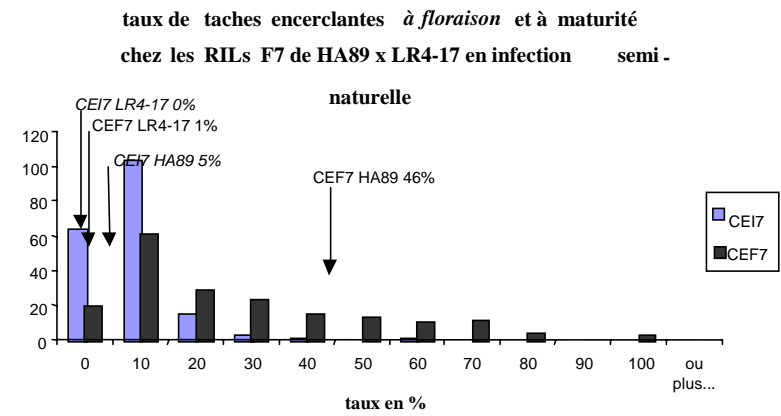
**Figure 1b**



**Figure 2 : Taux d'attaques par *Diaporthe helianthi* en infections semi-naturelles dans la population des lignées recombinantes F7 de HA89 x LR4-17**

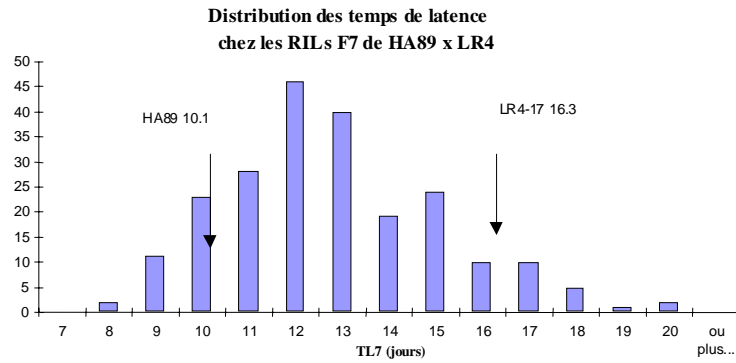


**Figure 2b**

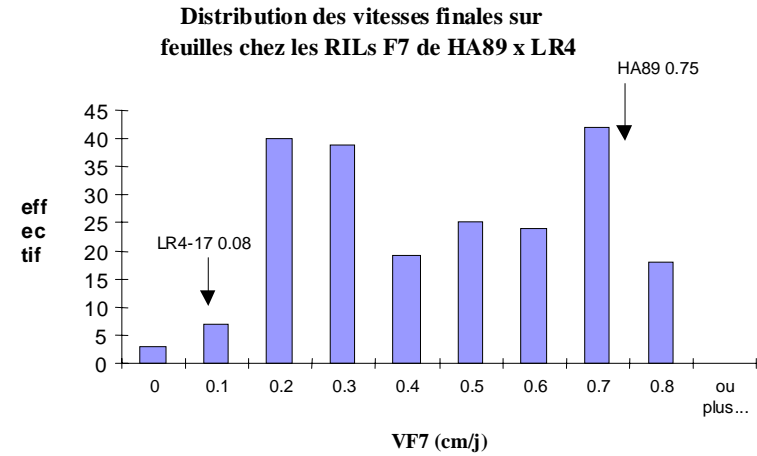


**Figure 3 : Observations en infections artificielles par *Diaporthe helianthi* en F7**

**figure 3a**

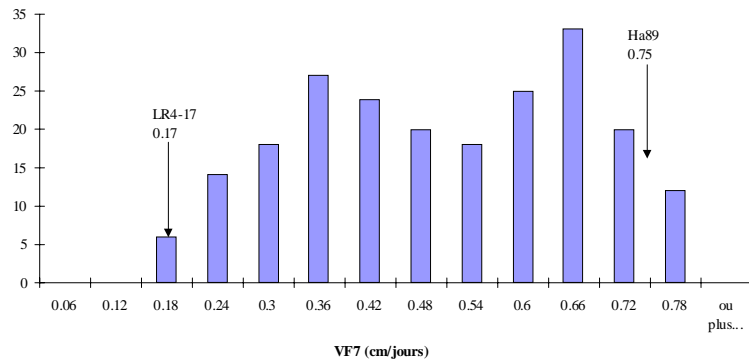


**figure 3c**



**figure 3b**

**Distribution des vitesses maximales de croissance des nécroses sur feuilles chez les RILs F7 (Ha89 X LR4-17).**



**figure 3d**

**Distribution des notes finales (32 jours après infection) chez les RILs F7 issues de Ha89(S)XLR4-17(R).**

