

**COMPORTEMENT DE GENOTYPES DE TOURNESOL (*HELIANTUS ANNUUS* L.)
A DES INFECTIONS ARTIFICIELLES SUR FEUILLES AVEC CINQ ISOLATS
FRANÇAIS DE PHOMOPSIS (*DIAPORTHE HELIANTHI* MUNT-CVET. ET AL.)**

**BEHAVIOUR OF SUNFLOWER GENOTYPES (*H. ANNUUS* L.) INFECTED WITH
FIVE FRENCH ISOLATES OF *DIAPORTHE HELIANTHI* MUNT-CVET. ET AL**

Kamel Langar, Yves Griveau ✉, **Laurent Ziercher, Hervé Serieys et André Bervillé**
Laboratoire de Génétique et Amélioration des plantes, ENSA.M-INRA, 2, place pierre Viala
34062 Montpellier cedex 2. ✉ griveau@ensam.inra.fr

ABSTRACT

Research was carried out on interactions between sunflower genotypes and isolates of phomopsis (*Diaporthe helianthi*). The leaves of two hybrids and three inbred lines, chosen on the basis of their level of resistance in previous screenings, were infected with mycelium in 3 years under controlled humidity conditions. French isolates of phomopsis showed some differences between and within isolates for their growth rates and their mycelial branching form *in vitro*. Infection results showed significant differences between phomopsis isolates and between sunflower genotypes. The phomopsis isolate 96001 gave a very short incubation time and a high rate of lesion extension on leaves; isolate 95031 showed an opposite behaviour. The most resistant genotype was the inbred line LR4-17, followed by the hybrid Agrisol, inbred line LR2-9, hybrid Viki and the susceptible inbred line HA89. LR2-9 was characterised by its susceptibility on leaves and its resistance to pathogen extension in stem tissue whereas Viki presented resistance to initial penetration and susceptibility to pathogen extension in leaves and stems. A significant interaction was detected between host and isolates, the behaviours of LR2-9 and Viki being influenced by environmental conditions and phomopsis isolates. However, interaction patterns were not stable over experiments, and genotype ranking was only slightly influenced by the fungal strains. No evidence has been found for occurrence of phomopsis races adapted to different sunflower genotypes so any aggressive strain should be satisfactory for screening purposes.

RESUME

Nous avons étudié les interactions entre le tournesol et des isolats de phomopsis (*Diaporthe helianthi*). Les feuilles de deux hybrides et de trois lignées, choisis sur la base de leurs niveaux de résistance mesurés auparavant, ont été infectées avec du mycélium trois ans de suite en conditions contrôlées d'humidité. Cinq isolats français de phomopsis ont montré quelques différences entre et dans les isolats pour leurs rythmes de croissance et la morphologie de leur mycélium *in vitro*. Les résultats des infections ont montré des différences significatives entre isolats de phomopsis, ainsi qu'entre les génotypes de tournesol. L'isolat de phomopsis 96001 a montré un temps d'incubation très court et une grande vitesse d'extension de nécroses sur feuilles; l'isolat 95031 a montré un comportement opposé. Le génotype de tournesol le plus résistant était la lignée LR4-17, suivi de l'hybride Agrisol, la lignée LR2-9, l'hybride Viki et la lignée HA89, la plus sensible. LR2-9 s'est caractérisée par sa sensibilité sur feuilles et sa résistance à la propagation des nécroses sur tige. Viki a montré une résistance initiale à la pénétration initiale et à une sensibilité à la propagation du pathogène dans la feuille et la tige. Une interaction significative a été observée entre les génotypes de tournesol et les isolats de phomopsis, les comportements de LR2-9 et de Viki étant influencés par l'environnement et les isolats de phomopsis. On n'a pas déterminé de races de phomopsis adaptées à des génotypes de tournesol particuliers. Ainsi, tout isolat agressif de phomopsis semble pouvoir être utilisé pour évaluer la résistance chez le tournesol.

INTRODUCTION

Le *Phomopsis* causé au tournesol (*Helianthus annuus L.*) des dégâts importants en France, en Europe de l'Est, en Amérique et même en Australie. La maladie est due à un champignon – ascomycète appartenant à la tribu des Diaporthales, famille des Valsacées décrit comme *Phomopsis/Diaporthe helianthi* (Munt.-Cvet *et al.*, 1981). Elle se manifeste par la présence de pycnides brunes alignées sur les différentes nervures des feuilles au stade bouton floral de développement de la plante hôte ; ce qui provoque le dessèchement des feuilles. A maturité, les pycnides se trouvent le plus souvent densément groupées au niveau des nœuds causant ainsi des altérations des systèmes vasculaires qui conduisent à une baisse du rendement et parfois par la mort de la plante.

L'amélioration génétique a débuté en Yougoslavie (Novi-Sad) depuis 1981. Elle s'est avérée efficace ce qui a conduit aux sources de résistance dites classiques de type Agrisol et NSH45. La station d'amélioration des plantes de Montpellier dispose d'une des plus grandes collections de génotypes de tournesol sauvages et cultivés. Des évaluations de la tolérance au *Phomopsis* en conditions semi-naturelles ont été effectuées et des nouvelles sources de résistance ont été trouvées (Griveau *et al.*, 1992, Vear *et al.*, 1997). Cependant, la mise en évidence de gènes de résistance à partir de ces sources, et leur utilisation dans la sélection, n'est pas une solution définitive pour surmonter le parasite. En effet, des attaques notables de *Phomopsis* sur des variétés résistantes ont été observées (Masirevic *et al.*, 1998). Pour garantir la stabilité de la résistance, nous devons à la fois essayer de comprendre et de typer les variations de la résistance dans les différents génotypes de tournesol, et connaître la variabilité génétique du pathogène, à savoir son agressivité et ses capacités de mutations qui lui permettent de contourner la résistance. L'une des plus grandes difficultés que nous rencontrons dans cette étude est le choix à la fois d'un effectif d'isolats représentatif de la population totale de *Phomopsis* et un ensemble de génotypes hôtes regroupant tous les facteurs de résistances et de sensibilités. L'évaluation de la résistance des différents génotypes sauvages et cultivés que nous avons déjà réalisé en condition artificielle et en conditions semi-naturelles (Langar *et al.*, 1997) nous a permis de choisir cinq génotypes. L'analyse de la variabilité phénotypique (croissances pondérales et radiales dans différents milieux de culture, formes et couleurs des embranchements du mycélium, taux d'attaques sur le génotype HA89) de 33 isolats de *Phomopsis* d'origines géographiques différentes nous a permis de choisir cinq isolats

MATERIEL ET METHODES

Nous avons choisi comme hôtes la lignée LR4-17 et l'hybride Agrisol très résistants, l'hybride Viki sensible, la lignée HA89 très sensible, et la lignée LR2-9 à comportement intermédiaire peu sensible. Ces génotypes ont été plantés sous tunnel en filet de Nylon à la station d'amélioration des plantes INRA-Melgueil (Montpellier). Trois expériences ont été conduites sans répétitions dans des parcelles de 10 plantes. Un groupe de brumisateurs d'eau nous a permis de maintenir l'humidité entre 70 et 100% et de l'eau libre en permanence sur le couvert.

Nous avons choisi cinq isolats de *Phomopsis* (96001, 95004, 95049, 95050 et 95031) qui nous ont été fournis par le Laboratoire de Pathologie Végétale (INRA Clermont-Ferrand). Toutes les inoculations ont été réalisées sur feuilles au stade bouton floral (période propice aux attaques). La technique utilisée est celle décrite par Tourvieille (1990).

L'observation journalière est réalisée trois jours après la date d'inoculation. Douze notations ont été réalisées. L'échelle de notation s'étale de zéro à dix: 0 : échec de l'infection, 1

: la zone nécrotique apparaît sur la nervure principale et dépasse de 1 cm le papier d'aluminium, 2 : la zone nécrotique occupe le quart de la feuille, 3 : le tiers de la feuille, 4 : la moitié de la feuille, 5 : les deux tiers de la feuille, 6 : toute la feuille, 7 : la feuille et le pétiole, 8 : la nécrose atteint la tige, 9 : tache encerclante sur tige, et 10 : tache encerclante et verse. Nous avons aussi noté la durée mise pour l'apparition des premières nécroses (Temps de Latence TL) et mesuré la longueur des lésions qui se sont développées sur les feuilles, sur les pétioles et sur les tiges.

Analyse des données

Pour réduire l'effet dû à la variabilité de la taille des feuilles des différents génotypes étudiés, nous avons réalisé des analyses sur les vitesses relatives de croissance ($VR = [\Delta \log(P_i) / \Delta t]$) des nécroses. Elles représentent l'évolution des proportions relatives d'attaques (P) en fonction du temps; $P = p / (1 - p)$, avec $p = L(N) / LT(F)$; avec L(N): Longueur de la nécrose, LT(F) : Longueur totale de la feuille infectée.

Nous avons aussi calculé les vitesses absolues de croissances initiales (VI cm/j), maximales (VMAX cm/j) et finales (VF cm/j) des nécroses sur feuille ainsi que celles sur le pétiole (VPET cm/j) et sur la tige (VTIGE cm/j). Par ailleurs, nous avons défini comme indice de la vitesse de croissance des nécroses ($IV \text{ j}^{-1}$), le rapport de la vitesse maximale sur feuille d'une plante par la moyenne des VMAX de tous les génotypes et divisé par le temps de latence (j) :

$IV (\text{Jours}^{-1}) = (1/TL) \cdot [VMAX / \text{Moyenne}(VMAX)]$. L'analyse de variance sur toutes les variables cités dessus a été réalisée par la procédure GLM du logiciel SAS. Le modèle complet est un modèle à effets fixes, comprenant les effets "années"(97, 98, 99), génotypes (LR4-17, HA89, LR2-9, Agrisol, Viki) et isolats (96001, 95004, 95049, 95050, 95031) et les interactions simples entre ces facteurs.

RESULTATS

Le suivi régulier des vitesses moyennes absolues de croissance des nécroses causées par le mycélium de l'isolat 96001 sur les cinq génotypes est donné dans la figure 1. Le génotype LR2-9 présente une sensibilité élevée sur feuille et une résistance sur la tige. Viki présente au début une forte résistance à la pénétration du mycélium dans ses tissus mais ne résiste pas une fois que le pathogène est entré. Le génotype le plus résistant est LR4-17 qui cumule des facteurs de résistance sur tous les organes. La lignée HA89 apparaît la plus sensible. Toutefois, nous constatons en moyenne un ralentissement des vitesses absolues de croissance des nécroses lors du passage de la feuille au pétiole ou du pétiole à la tige. Ceci indique la présence de facteurs de résistances chez HA89 et LR2-9, alors qu'ils sont absents chez Viki.

Des analyses de variance avec le modèle complet révèle que les effets des génotypes, souches et années sont hautement significatifs (Tableau 1). L'étude par variable montre des interactions génotypes x isolats significatives. Cependant, pour toutes les variables, c'est le génotype qui explique la plus grande part de la variation observée, sauf pour les vitesses sur pétioles où l'effet isolat l'emporte. En effet, le pourcentage de variation qu'il révèle, calculé comme le rapport de la somme des carrés due au facteur génotype (ou souche) sur la somme des carrés due au modèle, est nettement supérieur aux R^2 calculés pour l'interaction. Cependant, on note une interaction hautement significative entre isolat et année d'expérimentation pour la variable vitesse sur tige qui est dépendante des conditions environnementales.

Sur le même tableau, nous avons représenté le résultats de test de Student-Newman-Keuls (SNK). On constate une stabilité des classements des hôtes selon leur résistance aux pathogènes quel que soient l'inoculum et le milieu, à l'exception de Viki et LR2-9 dont la

stabilité de réponse au parasite est dépendante de l'environnement. Il en est de même pour les isolats 95050 et 95049, dont l'agressivité varie selon le milieu. Ces deux isolats ont présenté également une instabilité de comportement selon les conditions de cultures in vitro (données non présentées).

DISCUSSION ET CONCLUSION

La présente étude nous a permis de mettre en évidence trois composantes de résistance au *Phomopsis* chez le tournesol: 1- une résistance à la pénétration du mycélium (Viki) ; 2- une résistance à l'évolution des vitesses de croissances des nécroses sur feuilles (LR4-17) ; et 3- une résistance à l'évolution des vitesses des nécroses sur pétioles et sur tige (LR2-9). Le génotype LR4-17 semble cumuler toutes les composantes. Les différences des profils d'évolution des symptômes selon les génotypes de tournesol permettent d'expliquer les faibles corrélations observées entre notations dans des conditions variables d'infection (naturelles et artificielles) et d'environnement (intensité d'attaque) dans une population de lignées recombinantes comme l'ont rapporté Langar *et al.* (2000).

Les interactions entre isolats et génotypes sont faibles par rapport aux effets génotypes. Aucune inversion de rang dans le classement des génotypes n'en résulte. Ces résultats entrent en concordance avec ceux obtenus par Thuault (1986) pour la résistance au *Sclerotinia*. Il a montré que l'utilisation de différents isolats de *Sclerotinia sclerotiorum* (*Lib*) ne modifiait pas le classement des génotypes de tournesol pour leur réponse au test mycélium.

En contrepartie, nous avons distingué une interaction hautement significative entre isolats et conditions environnementales qui peuvent avoir une influence sur le classement des génotypes de type Viki et LR2-9. Ceci s'explique par les variations des conditions climatiques et d'autres facteurs abiotiques qui ont des effets majeurs sur la croissance du mycélium des champignons. Les mêmes observations ont été relevées aux champs où les variations des taux d'attaques aux champignons sont plutôt liées aux facteurs environnementaux qu'à l'agressivité particulière de nouveaux isolats (Viguié, 1999). Les études d'interaction hôte-champignon parasite chez les végétaux sont multiples et les informations recueillies sont diverses. Nous citons l'exemple du blé-*Fusarium* où des interactions faibles et instables ont été observées sans effets majeurs sur le classement des génotypes (Mesterhazy, 1988 ; Snijders *et al.*, 1991). Ce qui a conduit ces auteurs à noter l'absence de relations gène pour gène (Flor, 1955). Il en est de même pour la résistance de l'orge à l'oïdium où la majorité des QTLs détectés pour la densité des pustules sur feuilles est conservée, quel que soit l'isolat utilisé (Saghai-Marouf *et al.*, 1994).

En conclusion, on peut dire que la résistance au *Phomopsis* est de type horizontal. Nous n'avons pas mis en évidence de races spécifiques adaptées à des génotypes déterminés de tournesol. De tels résultats nous permettent d'estimer la résistance de génotypes de tournesol avec un seul isolat agressif.

REFERENCES

- Flor H.H., (1955). Host –parasite interaction in flax rust – its genetics and other implications. *Phytopathology*, 45 : 680 – 685.
- Griveau Y., Serieys H., Belhassen E., (1992) : Resistance evaluation of interspecific and cultivated progenies of sunflower infected by *Diaporthe helianthi*. Proc. 13th Int. Sunflower Conf. Vol II, Pisa (Italy), pp 1054-1058.
- Langar K, Griveau Y., Vares D. and Bervillé A., (1997). Evaluation of resistance to *Phomopsis* on Wild species, cultivars and inbreds of sunflower with artificial and seminatural infections. 10th Mediterranean Phytopathological sUnion – June 1st – 5th, 1997 Montpellier (France), pp 831 –8367.
- Langar K., Griveau Y. Serieys H. et Bervillé A. (2000). Analyse génétique de la résistance au phomopsis (*Diaporthe helianthi* Munt-Cvet *et al.*) chez le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.) Proc. 15th Int. Sunflower Conf., Toulouse (France), In press

- . Masirevic S., Forcig G. et Kurjak N., (1998). Sunflower disease, the main limiting factors in sunflower production in 1997. Proc. of., 30, A periodical of scientific research on field and vegetable crops Novi Sad, Yugoslavia.
- Mesterhazy A., (1988). Expression of resistance of wheat to *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* under various experimental conditions. J. Phytopathol., 123 : 304 – 310.
- Muntanola-Cvetkovic M., Mihaljcevic M. et Petrov M., (1981). On the identity of the causative agent of a serious *Phomopsis/Diaporthe* disease in sunflower plants. Nova Hedwigia, 34 : 417-435.
- Saghai-Maroo M.A., Zhang Q. et Biyashev R.M., (1994). Molecular marker analysis of powdery mildew resistance in barley. Theor. Appl. Genet., 88: 733 – 740.
- Snijders C.H.A. et Van Eeuwijk F.A., (1991). Genotype x strain interactions for resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium culmorum*. Theor. Appl. Genet., 81 : 239 – 244.
- Thuault M.C., (1986). Etude des relations Hôte-parasite chez le couple *Helianthus annuus* – *Sclerotinia*. Mém. DEA Biol. Fond. et Appl., Univ. Clermont Ferrant – Ferrant II, 52 pages.
- Tourvieille D., Pelletier C. (1988) Jugement de la résistance du tournesol au *Phomopsis* sous tunnel en file avec irrigation contrôlée. Inf. Tech. CETIOM. 103
- Vear F., Garreyn M., Tourvieille D., (1997). Inheritance of resistance to *Phomopsis /Diaporthe helianthi* in sunflower. Plant Breeding, 116 : 277 – 281.
- Vignié A., (1999). Etude du pathosystème *Phomopsis helianthi/Diaporthe helianthi* Munt.-Cvet.- tournesol (*Helianthus annuus* L.). Thèse de Doct., Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France, 84 pages.

Figure 1: Evolution des vitesses de croissance des nécroses chez les cinq génotypes de tournesol: LR4-17, Agrisol, LR2-9, Viki et HA89 (isolat 96001). Les flèches marquent le début d'attaque sur pétiole (traits pleins) et sur tige (pointillées).

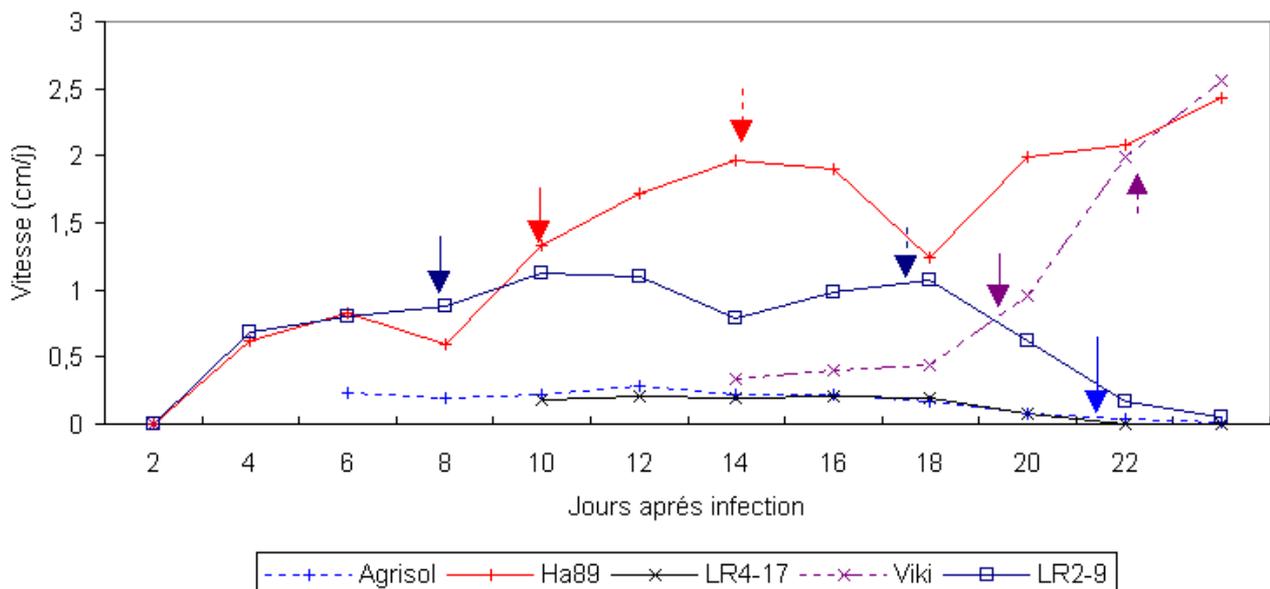


Tableau 1: Analyse de variance sur les critères de résistance au Phomopsis de l'infection de 5 isolats sur 5 génotypes de tournesol cultivés choisis selon leur degré de sensibilité.

Variable	Source	R ² %	Pr>F	Génotypes groupes SNK		Isolats groupes SNK	
Vitesse relative	Génotype (Gén)	24.8	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	09.7	0.0001	B A	LR2-9	B	95050
	Année	15.1	0.0001	B	Viki	B	95004
	Gén X Iso	05.3	0.0278	C	Agrisol	B	95049
	Gén X Année	12.4	0.0001	D	LR4-17	C	95031
	Année X Iso	08.0	0.0001				
Note initiale	Génotype (Gén)	20.4	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	19.5	0.0001	A	LR2-9	B	95004
	Année	00.0	0.9114	B	Agrisol	C	95050
	Gén X Iso	16.5	0.0001	B	Viki	C	95049
	Gén X Année	02.6	0.1389	B	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	03.3	0.0511				
Note finale	Génotype (Gén)	35.3	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	24.7	0.0001	A	Viki	B	95004
	Année	13.0	0.0001	A	LR2-9	C	95049
	Gén X Iso	06.4	0.0001	B	Agrisol	C	95050
	Gén X Année	04.7	0.0001	C	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	02.4	0.0004				
Temps de latence	Génotype (Gén)	35.3	0.0001	A	Viki	A	95031
	Isolat (Iso)	15.8	0.0001	B	Agrisol	B	95049
	Année	03.3	0.0001	B	Lr4-17	B	95050
	Gén X Iso	06.5	0.0001	C	HA89	B	95004
	Gén X Année	08.5	0.0001	C	LR2-9	C	96001
	Année X souche	05.3	0.0001				
Vitesse maximale	Génotype (Gén)	18.2	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	21.0	0.0001	A	LR2-9	B	95050
	Année	00.0	0.0638	B	Viki	C	95004
	Gén X Iso	06.2	0.0001	C	Agrisol	D	95049
	Gén X Année	01.9	0.0501	C	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	32.5	0.0001				
Vitesse initiale	Génotype (Gén)	05.2	0.0001	A	LR2-9	A	95050
	Isolat (Iso)	21.7	0.0001	A	HA89	B	96001
	Année	11.2	0.0001	B	LR4-17	B	95004
	Gén X Iso	05.5	0.0046	B	Viki	B	95049
	Gén X Année	01.9	0.1126	B	Agrisol	B	95031
	Année X Iso	44.2	0.0001				
Vitesse Finale	Génotype (Gén)	10.3	0.0001	A	LR2-9	A	96001
	Isolat (Iso)	32.0	0.0001	A	HA89	B	95050
	Année	03.3	0.0001	B	Viki	C	95004
	Gén X Iso	04.9	0.0001	C	Agrisol	D	95049
	Gén X Année	04.8	0.0001	D	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	42.9	0.0001				
Indice de vitesse	Génotype (Gén)	09.8	0.0001	A	LR2-9	A	96001
	Isolat (Iso)	17.6	0.0001	A	HA89	B	95004
	Année	01.2	0.0590	B	Agrisol	C B	95050
	Gén X Iso	10.6	0.0001	B	Viki	C B	95049
	Gén X Année	07.8	0.0001	B	LR4-17	C	95031
	Année X Iso	09.9	0.0001				
Vitesse sur pétiole	Génotype (Gén)	16.3	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	37.7	0.0001	A	Lr2-9	B	95050
	Année	18.7	0.0001	B	Viki	B	95004
	Gén X Iso	08.1	0.0001	C	Agrisol	C	95049
	Gén X Année	00.0	0.9474	D	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	37.4	0.0001				
Vitesse sur tige	Génotype (Gén)	03.7	0.0001	A	HA89	A	96001
	Isolat (Iso)	45.0	0.0001	B	LR2-9	B	95050
	Année	27.7	0.0001	C	Viki	B	95004
	Gén X Iso	05.7	0.0001	C	Agrisol	C	95049
	Gén X Année	00.0	0.5702	D	LR4-17	D	95031
	Année X Iso	62.0	0.0001				