



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2013-2014

MASTER FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité

Fonctionnement et Gestion des Ecosystèmes

Résistance partielle au phoma du tournesol : approche
épidémiologique et mesure des composantes de résistance



Aurélien LEPENNETIER

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 02/09/2014

Laetitia WILLOCQUET, CR INRA et André AGUIAR-SCHWANCK, Doctorant

Sophie SLEZCAK-DESCAHUMES, MC ENSAIA

INRA Toulouse – UMR AGIR, 24 Chemin de Borde Rouge, 31320 AUZEVILLE TOLOSANE

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je souhaiterais remercier sincèrement Laetitia WILLOCQUET et André AGUIAR-SCHWANCK qui en tant qu'encadrants se sont toujours montrés à l'écoute et disponibles tout au long de mon stage et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie aussi Philippe DEBAEKE, chercheur à l'UMR AGIR et co-animateur de l'UMT tournesol, qui a permis le financement de ce stage, ainsi qu'Emmanuelle MESTRIES, ingénieur au CETIOM et co-animatrice de l'UMT tournesol, pour m'avoir fourni la souche référence de *Phoma macdonaldii*.

Mes remerciements s'adressent également à Sophie SLEZACK-DESCHAUMES, ma tutrice universitaire, qui tout au long de mon stage m'a fourni de nombreux conseils et a été à mon écoute.

J'exprime aussi ma gratitude à Pascaline et Céline pour leurs nombreux conseils en analyses statistiques. Merci à tous les collègues qui ont su rendre ces 6 mois de stage très agréables. André et Piérri, je me souviendrai longtemps de ce match de football regardé à vos côtés et maintenant devenu historique opposant l'équipe d'Allemagne et celle de votre pays : le Brésil.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à mes parents et Julie qui m'ont toujours soutenu et encouragé pendant ces 6 mois de stage.

Sommaire

1	Présentation de l'organisme d'accueil	5
2	Contexte et synthèse bibliographique	5
2.1	Le tournesol	5
2.1.1	Cycle de développement de la plante.....	5
2.1.2	Importance économique du tournesol	6
2.1.3	Les principales maladies du tournesol	7
2.2	Le phoma du tournesol.....	7
2.2.1	Les caractéristiques du champignon.....	8
2.2.2	Epidémiologie.....	9
2.2.3	Pénétration et développement du champignon à l'intérieur du tournesol	10
2.2.4	Les symptômes sur le tournesol.....	10
2.2.5	Moyen de lutte.....	10
2.3	Résistance partielle du tournesol au <i>Phoma macdonaldii</i>	11
2.3.1	Généralités sur les résistances	11
2.3.2	Cas du phoma du tournesol	13
3	Objectif et étapes de l'étude.....	13
4	Mesure en conditions contrôlées des paramètres épidémiologiques du phoma sur différents géotypes de tournesol.....	14
4.1	Matériels et méthodes	14
4.1.1	Matériel végétal	14
4.1.2	Matériel fongique.....	14
4.1.3	Dispositif expérimental	15
4.1.4	Inoculation.....	15
4.1.5	Mesure des paramètres monocycliques	16
4.1.6	Analyses statistiques	16
4.2	Résultats	16
4.3	Discussion	18
5	Vérification de l'interaction entre géotypes de tournesol et souches de phoma	19
5.1	Matériels et méthodes	19
5.1.1	Matériel végétal	19
5.1.2	Matériel fongique.....	19

5.1.3	Dispositif expérimental	19
5.1.4	Inoculation.....	19
5.1.5	Mesure des paramètres monocycliques.....	20
5.2	Analyses statistiques	20
5.3	Résultats	20
5.4	Discussion	21
6	Identifications des prédicteurs en conditions contrôlées de la résistance partielle au phoma du tournesol en champ	22
6.1	Matériels et méthodes	22
6.1.1	Provenance des données du champ	22
6.1.2	Variables du phytotron	22
6.1.3	Analyses statistiques	22
6.2	Résultats	23
6.3	Discussion	24
7	Discussion générale et conclusions.....	24
	Bibliographie	25

Table des figures

Figure 1 : Les principaux stades du tournesol (CETIOM, 2014)	6
Figure 2 : Carte des surfaces françaises cultivées en tournesol en 2012 (ONIDIOIOL, 2012)	6
Figure 3 : Les quatre principaux agents pathogènes du tournesol en France	7
Figure 4 : Cycle épidémiologique de <i>Phoma macdonaldii</i> (d'après Delos <i>et al.</i> , 1997 ; Abou Al Fadil, 2006 ; Bordat <i>et al.</i> , 2011)	9
Figure 5 : Les différents symptômes provoqués par <i>Phoma macdonaldii</i> sur les organes du tournesol	10
Figure 6 : Trois unités expérimentales dans une caisse	15
Figure 7 : Plan expérimental en blocs complètement randomisés.....	15
Figure 8 : Souche de <i>Phoma macdonaldii</i> MPH2 sur PDA en boîte de Pétri.....	15
Figure 9 : Inoculation d'un pétiole de tournesol avec une suspension contenant des pycniospores de <i>Phoma macdonaldii</i>	15
Figure 10 : Lésion brune-noire provoquée par <i>Phoma macdonaldii</i> sur pétiole de tournesol	16
Figure 11 : Efficacité d'infection (a), longueur des lésions à 8 jours après inoculation (JAI ; b) pour les 18 génotypes de tournesol étudiés.....	18
Figure 12 : Efficacité d'infection (a), delta (b), incidence de flétrissement (c), et longueur des lésions à 8 JAI (d) pour les 5 génotypes de tournesol inoculés par 4 souches de phoma	21
Figure 13 : Matrice présentant les coefficients de corrélation de Pearson (r) et les p-value associées (p) entre les variables du phytotron (_P) et celles du champ (_C) ainsi que des représentations graphiques de la distribution des valeurs des 18 génotypes selon deux variables.	23

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des formes sexuée et asexuée de <i>Phoma macdonaldii</i> (Abou Al Fadil, 2006).....	8
Tableau 2 : Liste des génotypes de tournesol	14
Tableau 3 : Les coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées	17
Tableau 4 : Résultats des analyses de variance sur l'effet des facteurs génotype (gen), expérience (exp) et de leur interaction sur les variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées.....	17
Tableau 5 : Résultats des analyses de variance sur l'effet des facteurs génotype (gen), souche de phoma (souche) et leur interaction sur les variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées	20

1 Présentation de l'organisme d'accueil

L'Unité Mixte de Recherche (UMR) AGroécologie – Innovations – TeRritoires (AGIR) qui compte près de 75 personnes est située sur le site d'Auzeville, le campus le plus important du centre INRA Toulouse Midi-Pyrénées. Cette unité rassemble des chercheurs de l'INRA et des enseignant-chercheurs d'écoles d'ingénieur toulousaines. L'objectif principal de cette unité est de « contribuer à la production de connaissances, de méthodes et de dispositifs sur les processus d'adaptation des agroécosystèmes, de leurs filières et des territoires dans lesquels ils sont insérés afin de faire face aux changements globaux ». Trois équipes composent cette unité, deux en sciences agro-écologiques : MAGELLAN (Méthodes pour l'Agroécologie et la Gestion Locale des ressources Agricoles et Naturelles) et VASCO (VAriétés et Systèmes de Culture pour une production agrO-écologique) et une en sciences sociales : ODYCEE (Organisations, DYnamiques des Connaissances et des innovations dans les tErritoires et les filièrEs). L'UMR AGIR est également impliquée dans deux Unités Mixtes Technologiques (UMT) : Eau et Tournesol.

J'ai réalisé mon stage au sein de l'équipe VASCO. Cette équipe est la plus grosse de l'UMR AGIR avec environ 30 employés. Son objectif principal est de concevoir et évaluer des itinéraires techniques et des systèmes de culture innovants et durables. Pour cela, les concepts de la production intégrée, de l'agronomie systémique et de l'agro-écologie sont mobilisés. Cette équipe est structurée autour d'un axe intégrateur et de trois axes spécifiques. SYSTEM, l'axe intégrateur, vise à concevoir et évaluer des systèmes de culture innovants. Les trois autres axes sont : IGEC (Etude des interactions génotype - environnement - conduite de cultures), PEST (Analyse et modélisation des effets des pratiques agricoles sur les pressions biotiques et les dommages induits en grandes cultures) et ASSO (Etude des interactions plurispécifiques d'espèces cultivées en association pour la production de graines et/ou de services écosystémiques).

Mon stage s'inscrit dans l'axe PEST. Des pathosystèmes particuliers sont étudiés : le phoma (*Phoma macdonaldii*) et phomopsis (*Phomopsis helianthi*) du tournesol, ainsi que les profils de dégâts provoqués par des champignons, des adventices et des insectes sur le blé tendre et blé dur.

2 Contexte et synthèse bibliographique

2.1 Le tournesol

Le tournesol, *Helianthus annuus* L., est une plante annuelle de la famille des Astéracées (Schilling, Heiser, 1981), originaire d'Amérique du Nord.

2.1.1 Cycle de développement de la plante

Le cycle complet du tournesol dure entre 120 à 150 jours selon la précocité du cultivar. Sur la base d'un zéro de végétation théorique de 6°C, les exigences en sommes de températures varient de 1500 à 1700 degrés.jours pour atteindre la maturation (CETIOM, 2014). Cinq périodes clés codifiées en stades repères peuvent être distinguées (INA P-G – Département AGER, 2003) (Figure 1) :

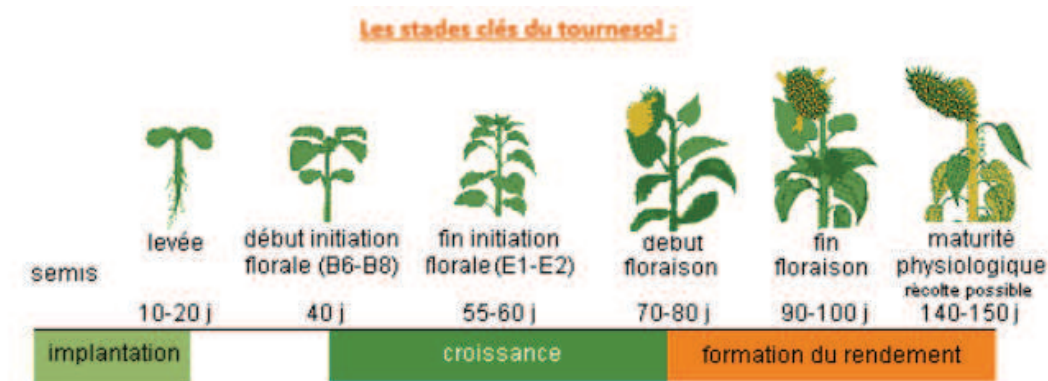


Figure 1 : Les principaux stades du tournesol (CETIOM, 2014)

2.1.2 Importance économique du tournesol

Les principaux producteurs de tournesol sont l'Ukraine et la Russie : 9,4 millions de tonnes de graines, l'Union Européenne : 4,1 millions de tonnes de graines et l'Argentine : 2,2 millions de tonnes de graines en 2004 (PROLEA, 2014).

La France est le premier producteur européen de tournesol avec 1,88 millions de tonnes devant la Hongrie qui produit 1,29 millions de tonnes (PROLEA, 2012). Le rendement moyen en France était de 25,4 q/ha en 2012, l'un des meilleurs résultats des pays producteurs de tournesol. Malgré de réels progrès génétiques, la production de tournesol en France est en stagnation car depuis quelques années nous observons une légère diminution des surfaces destinées à cette culture, et les rendements sont en très légère hausse. En France la production de tournesol se réalise principalement dans deux bassins de production : le sud-ouest (Midi Pyrénées) et le centre-ouest (Poitou-Charentes) (Figure 2).

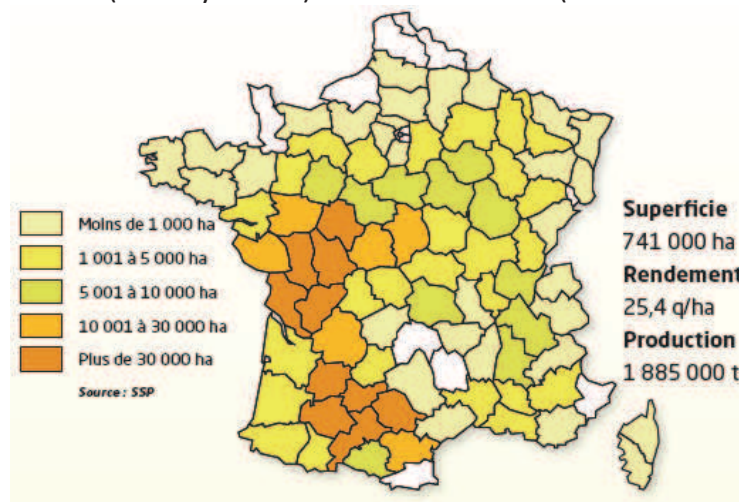


Figure 2 : Carte des surfaces françaises cultivées en tournesol en 2012 (ONIDIOL, 2012)

Les débouchés de cette culture sont très divers : alimentation humaine et animale, industrie et énergie. L'huile de tournesol est à la 4^{ème} place des huiles végétales derrière celle de palme, de soja et de colza.

2.1.3 Les principales maladies du tournesol

Le tournesol est sensible à de nombreuses maladies plus ou moins importantes qui sont apparues avec le développement de cette culture. Dans les années 1960, la pourriture grise du capitule (*Botrytis cinerea*) et le mildiou (*Plasmopara halstedii*) étaient responsables de la plupart des dégâts sur tournesol. Certaines maladies comme la pourriture blanche (*Sclerotinia sclerotiorum*) sont devenues au cours des années de plus en plus préoccupantes. Puis au cours de ces vingt dernières années, certains agents pathogènes sont apparus tels que *Phomopsis helianthi* et *Phoma macdonaldii*. Ce dernier est responsable de la maladie des tâches noires, qui s'avère être une maladie très préoccupante notamment en France pour diverses raisons : (1) cette maladie est présente sur tout le territoire français, (2) la lutte fongicide n'est pas économiquement rentable, et (3) il n'existe aucune classification de résistance variétale (Bordat *et al.*, 2011). Actuellement en France, les quatre principaux agents pathogènes du tournesol sont *Plasmopara halstedii*, *Phoma macdonaldii*, *Phomopsis helianthi*, et *Sclerotinia sclerotiorum* (Figure 3).

Le tournesol est aussi sensible à d'autres maladies secondaires telles que l'alternariose (*Alternaria helianthi*) et la pourriture charbonneuse (*Macrophomina phaseoli*), ou maladies émergentes telles que la verticilliose (*Verticilium dahliae*). Cette culture peut aussi être parasitée par l'orobanche qui provoque de sérieux dégâts en Europe de l'Est ainsi qu'en Espagne.



Plasmopara halstedii



Phoma macdonaldii



Phomopsis helianthi



Sclerotinia sclerotiorum

Figure 3 : Les quatre principaux agents pathogènes du tournesol en France

2.2 Le phoma du tournesol

Au Canada en 1964 le chercheur McDonald identifie pour la première fois l'agent causal de la maladie des tâches noires du tournesol et lui donne son nom : *Phoma macdonaldii* (McDonald, 1964). La forme sexuée de ce champignon est identifiée en 1968 par Frezzi en Argentine : *Leptosphaeria lindquistii* Frezzi (Frezzi, 1968). En 1970 Boerema affine sa caractérisation et lui donne le nom de *Phoma macdonaldii* Boerema (Boerema, 1970). Aujourd'hui cet agent pathogène est présent sur toutes les zones de production de tournesol. La maladie des tâches noires dont il est responsable est actuellement considérée comme la deuxième maladie la plus importante en France par les acteurs de la filière tournesol.

2.2.1 Les caractéristiques du champignon

La classification des formes sexuée et asexuée du *P. macdonaldii* est présentée dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Classification des formes sexuée et asexuée de *Phoma macdonaldii* (Abou Al Fadil, 2006)

	Forme sexuée = téléomorphe <i>Leptosphaeria lindquistii</i> Frezzi	Forme asexuée = anamorphe <i>Phoma macdonaldii</i> Boerema
Embranchement	Eumycètes	Deutéromycètes
Sous-embranchement	Pyrénomycètes	Coelomycètes
Ordre	Pléosporales	Sphaeropsidales
Famille	Pléosporacées	Hyalosporées

Les fructifications asexuées de *P. macdonaldii* sont des pycnides en forme de poire avec un court col pourvu d'un ostiole. Elles apparaissent comme des grains noirs sous l'épiderme du tournesol. Leur taille varie de 70 à 300 µm (McDonald, 1964 ; Boerema *et al.*, 1981 ; Roustae *et al.*, 2000b). A l'intérieur des pycnides sont formées des spores appelées pycniospores. Celles-ci sont unicellulaires, hyalines et leur taille varie de 3 à 8,5 µm sur 1,3 à 2,9 µm (Boerema *et al.*, 1981). Les pycnides produisent un mucilage appelé cirrhe qui entraîne les pycniospores à l'extérieur de celles-ci.

Concernant la forme sexuée - *L. lindquistii* - les fructifications produites sont des périthèces. Ces organes de reproduction apparaissent sur les résidus infectés de cultures à la fin de l'hiver. Ces périthèces de couleur foncée sont globuleux avec un très court col pourvu d'un ostiole et se forment sous l'épiderme. Leur taille varie entre 170 et 300 µm (Frezzi, 1968 ; Boerema *et al.*, 1981). A l'intérieur de ces fructifications se trouvent des asques cylindriques en forme de massue qui contiennent huit ascospores pluricellulaires (2 à 4 cellules) peu colorées dont la taille varie de 6 à 17 µm sur 5 à 8 µm (Frezzi, 1968). Un mucilage blanc est produit par les périthèces pour faire sortir les ascospores à l'extérieur.

Il existe une grande variabilité de souches de *P. macdonaldii* par rapport à différents critères comme la vitesse de croissance mycélienne sur milieu de culture, la pigmentation du mycélium, la production et la taille des pycnides, la germination des pycniospores et l'agressivité (Roustae *et al.*, 2000b ; Larfeil, 2003 ; Abou Al Fadil, 2006). Il semblerait que les souches de *P. macdonaldii* ayant la croissance la plus faible sur milieu de culture en conditions axéniques ont un niveau d'agressivité plus élevé (Larfeil, 2003 ; Abou Al Fadil, 2006). Aucune corrélation n'a été montrée entre l'agressivité des souches et les autres caractères phénotypiques (Roustae *et al.*, 2000b ; Abou Al Fadil, 2006).

P. macdonaldii, comme d'autres champignons pathogènes, tels que *Alternaria* sp., est capable de produire une phytotoxine appelée zinniol (C₁₅H₂₂O₄) (Sugawara, Strobel, 1986). Cette toxine émise par le champignon permet de déstructurer les cellules végétales et ainsi l'utilisation des tissus morts pour la croissance du champignon. Se forment alors des tâches nécrotiques sur les tiges, un brunissement des nervures foliaires et une chlorose autour des tissus infectés. Mais aucun lien n'a été montré entre la quantité de zinniol produite et l'agressivité des souches de phoma (Larfeil, 2003).

2.2.2 Epidémiologie

Au champ, le champignon se conserve sur les résidus infectés de cultures sous forme de mycélium. Ce mycélium reste viable au moins 3 ans sur les résidus et garde son pouvoir infectieux (Bordat *et al.*, 2011). Au cours de l'hiver, ce mycélium se différencie en périthèces et en pycnides. Ces fructifications apparaissent dès février et persistent jusque fin juillet (Delos *et al.*, 1997, 1998) couvrant ainsi une grande partie du cycle de vie du tournesol.

Les pycniospores et les ascospores sont responsables de contaminations primaires. Les pycniospores sont disséminées sur de courtes distances alors que les ascospores sont disséminées sur de très longues distances (Delos *et al.*, 1997). En France ce sont les ascospores qui sont responsables de la majeure partie des contaminations primaires. En effet le tournesol ne revient en moyenne sur une parcelle que tous les 3 ans. Les ascospores proviennent alors de parcelles éloignées de tournesol. Toutefois les pycniospores ne doivent pas être négligées dans le cas de rotation blé-tournesol. Malgré un travail du sol régulier dans ce genre de rotation, il reste une faible quantité de résidus mal enfouis. Ces résidus peuvent alors être porteurs de fructifications de phoma et les pycniospores sont produites en plus grande quantité que les ascospores (Bordat *et al.*, 2011).

Des pycnides peuvent se former au niveau des nécroses au cours du cycle cultural et produire des pycniospores à l'origine de contaminations secondaires, mais en France cela n'a pas été observé (Delos *et al.*, 1997). C'est pourquoi en France nous considérons que le phoma du tournesol génère des épidémies monocycliques.

La Figure 4 présente de manière schématisée le cycle de vie du phoma du tournesol.

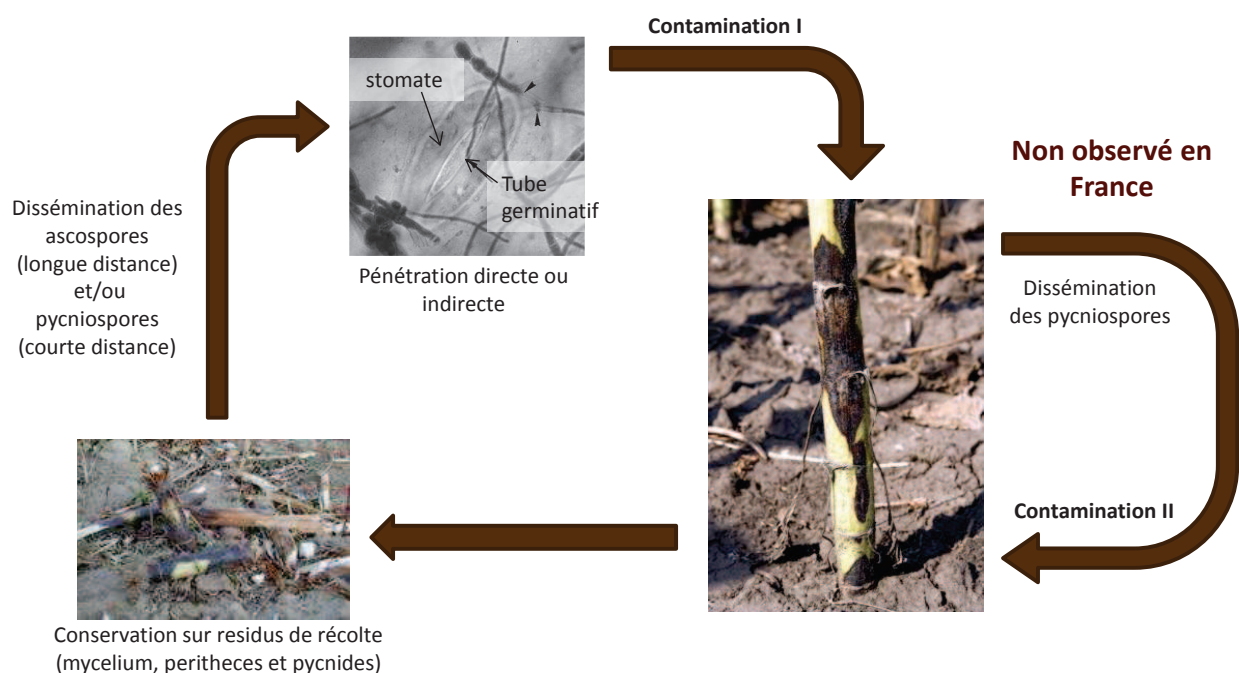


Figure 4 : Cycle épidémiologique de *Phoma macdonaldii* (d'après Delos *et al.*, 1997 ; Abou Al Fadil, 2006 ; Bordat *et al.*, 2011)

2.2.3 Pénétration et développement du champignon à l'intérieur du tournesol

Le mycélium de *P. macdonaldii* pénètre directement à travers la cuticule du tournesol en la perforant mécaniquement sans différenciation du tube germinatif en appressorium (Roustaei *et al.*, 2000c ; Abou Al Fadil *et al.*, 2009). Il peut aussi pénétrer par les stomates. Le mycélium va d'abord se développer dans la paroi des cellules puis ensuite dans le cytoplasme et enfin dans les vaisseaux conducteurs (Abou Al Fadil, 2006). Après la phase d'infection, *P. macdonaldii* va avoir avec son hôte une relation biotrophe qui s'achève par une phase nécrotrophe (Bordat *et al.*, 2011).

2.2.4 Les symptômes sur le tournesol

La sensibilité du tournesol au phoma s'étend du stade cotylédonaire au stade remplissage des grains. Le champignon peut attaquer tous les organes du tournesol (Bordat *et al.*, 2011 ; Figure 5).

Les symptômes sur racines correspondent à des nécroses noires. Sur le collet, des nécroses brune-noires sont formées et peuvent encercler la tige. Le champignon ne se développe pas sur le limbe foliaire mais le long des nervures où se forment des tâches brune-noires discontinues. Ces tâches se réunissent à l'embranchement des nervures puis forment un sillon noir sur le pétiole qui rejoint le point d'insertion de la feuille sur la tige. Sur les tiges, les symptômes correspondent à des nécroses noires au niveau des nœuds foliaires. Dans certains cas rares, des symptômes de coloration noire peuvent apparaître sur le point d'insertion du capitule sur la tige. Le capitule se dessèche alors très rapidement. Le champignon peut se conserver dans les graines quand le capitule est totalement atteint.

Les dégâts engendrés par ce champignon pathogène peuvent entraîner une diminution de la qualité des huiles, une diminution du poids de 1000 grains et des pertes de rendement de l'ordre de 10 à 30%, voire 70% lorsque cet agent est à l'origine d'une sénescence prématurée du tournesol.

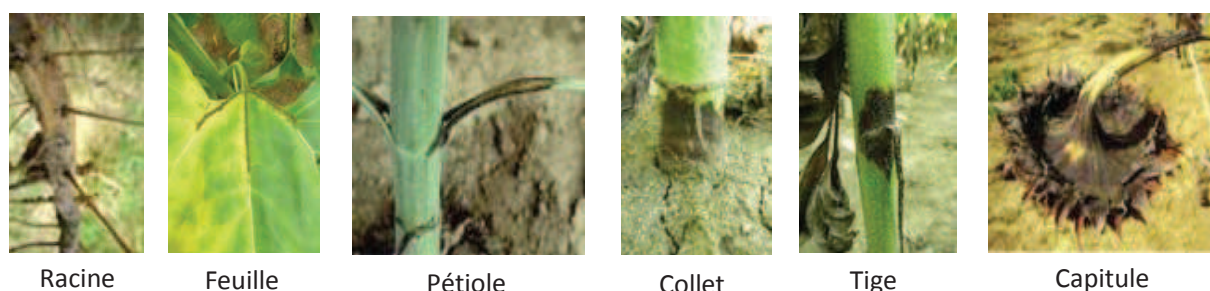


Figure 5 : Les différents symptômes provoqués par *Phoma macdonaldii* sur les organes du tournesol

2.2.5 Moyen de lutte

Il n'existe pas actuellement de classement officiel des variétés de tournesol selon leur niveau de résistance au phoma comme cela peut exister pour phomopsis et sclérotinia. La lutte variétale contre le phoma du tournesol ne peut donc pas s'effectuer.

La lutte agronomique est très importante. Il est conseillé de broyer et d'enfouir les résidus végétaux le plus tôt possible après la récolte (Bordat *et al.*, 2011). L'efficacité de

cette pratique est améliorée quand elle est appliquée à toutes les parcelles du secteur. L'allongement des rotations a un impact très faible car le phoma peut se conserver longtemps sur les résidus. La densité de peuplement de tournesol ne doit pas être trop élevée (inférieure à 7 plantes/m²) (Seassau *et al.*, 2012). La fertilisation azotée doit être ajustée aux besoins de la culture en tenant compte de la fourniture du sol pour éviter les excès d'azote (Debaeke et Peres, 2003). L'irrigation du tournesol doit être suffisante en fin de floraison (Seassau *et al.*, 2010).

Très peu de produits fongicides sont efficaces contre le phoma du tournesol. De plus un traitement spécifique contre cette maladie n'est pas toujours rentable. En effet les fongicides homologués sur tournesol sont inefficaces contre les attaques au collet qui sont les plus dommageables. Le tournesol avec un IFT (Indice de Fréquence de Traitement) de 1,75 figure parmi les cultures les moins traitées en France.

2.3 Résistance partielle du tournesol au *Phoma macdonaldii*

2.3.1 Généralités sur les résistances

Les résistances dans les relations hôtes/pathogènes sont classées en deux grandes catégories : résistance qualitative et résistance quantitative. Ces catégories de résistance sont fondées sur des études phénotypiques et non sur leur déterminisme génétique (Andrivon *et al.*, 2014). Ces résistances variétales sont des éléments importants dans la lutte intégrée contre les maladies. C'est une méthode peu coûteuse et dont les impacts sur les services écosystémiques des agroécosystèmes sont très limités (Andrivon *et al.*, 2014).

2.3.1.1 La résistance qualitative

La résistance qualitative est aussi appelée résistance verticale ou complète. Elle est spécifique car l'hôte pourra n'être résistant qu'à certaines souches de l'agent pathogène, et se caractérise par une réponse de type "tout ou rien". Si l'hôte est résistant il n'y a donc pas d'épidémie. Cette résistance est basée sur le modèle « gène pour gène » de Flor (Lepoivre, 2003). Pour un gène d'avorulence appartenant à l'agent pathogène correspond un gène de résistance appartenant à la plante hôte (gène « majeur » ou gène R). Quand l'interaction entre ces deux gènes est dite compatible, l'hôte est sensible au parasite et à l'inverse quand cette interaction est dite incompatible, l'hôte est résistant au parasite. Cette résistance dépend donc d'un nombre restreint de gènes, elle est soit monogénique (gouvernée par un seul gène), soit oligogénique (gouvernée par un petit nombre de gènes). Ce type de résistance s'est avéré instable dans le temps car très facilement contournable par l'agent pathogène. En effet mettre en culture des variétés contenant des gènes de résistance qualitative augmente la probabilité de sélection de parasites virulents (Lepoivre, 2003 ; Poland *et al.*, 2009).

2.3.1.2 La résistance quantitative

La résistance quantitative, dite aussi partielle, incomplète ou bien encore horizontale, se caractérise par différents niveaux de résistance selon le génotype de l'hôte. Contrairement à la résistance qualitative c'est une résistance générale, c'est-à-dire que le niveau de résistance de l'hôte est le même pour les différentes souches de l'agent pathogène (Lepoivre, 2003). Cette résistance est généralement polygénique mais peut être

monogénique (Lepoivre, 2003 ; Poland *et al.*, 2009). C'est la combinaison de plusieurs gènes à effet mineur qui va moduler le développement de l'agent pathogène à différentes étapes de son cycle et ainsi ralentir la vitesse de l'épidémie (Andrивon *et al.*, 2014). Ces différentes étapes sont appelées composantes de résistances. Il est important pour caractériser cette résistance de connaître le cycle infectieux de l'agent pathogène (Lepoivre, 2003). Pour quantifier cette résistance il est préconisé d'utiliser une approche épidémiologique c'est-à-dire mesurer les composantes de résistance (Lepoivre, 2003 ; Voir paragraphe 2.3.1.3). La résistance partielle peut aussi être associée à des QTLs (Quantitative Trait Loci) (Poland *et al.*, 2009). Elle est certes moins efficace et plus difficile à identifier que la résistance qualitative mais elle est considérée comme plus durable dans le temps. En effet ce type de résistance est plus difficile à contourner par l'agent pathogène.

2.3.1.3 L'approche épidémiologique pour l'étude des résistances

L'approche épidémiologique consiste à mesurer des paramètres épidémiologiques soigneusement choisis selon le cycle de l'agent pathogène. Ces paramètres permettent de mettre en exergue les composantes de résistances. Pour un monocycle les paramètres (Andrивon *et al.*, 2014) peuvent être :

- L'efficacité d'infection : nombre de lésions divisé par le nombre de spores déposées. Ce paramètre informe sur la capacité de l'agent pathogène à infecter l'hôte et à produire des lésions. Il permet alors de quantifier la composante de résistance à l'infection.
- La période de latence : période entre le dépôt des propagules et la sporulation des lésions. Ici c'est la composante de résistance à la colonisation qui peut être quantifiée.
- La période infectieuse : durée de sporulation des lésions. Ce paramètre permet d'évaluer la composante de résistance à la reproduction de l'agent pathogène.

D'autres paramètres peuvent être utilisés comme la taille des lésions et la période d'incubation (temps entre le dépôt des spores et l'apparition des premières lésions) qui renseignent sur la résistance à la colonisation, ou bien encore l'intensité de sporulation (production de spore par lésion) qui renseigne sur la résistance à la reproduction.

La quantification des composantes de résistance permet d'identifier les processus épidémiologiques qui affectent cette résistance (Parlevliet, 1979 ; Savary, 2007). Elle peut également aboutir à l'identification des prédicteurs de résistance partielle et aux méthodes de phénotypage permettant de mesurer ces prédicteurs (Andrивon *et al.*, 2014).

L'approche épidémiologique est une approche complémentaire à la recherche de QTLs. En effet, cette dernière ne permet pas toujours de prédire la résistance quantitative en champ car très variable selon l'environnement. Il est nécessaire de réaliser des essais en plein champ pour déterminer les variétés résistantes au phoma. De tels essais sont longs, coûteux et un nombre restreint de variétés de tournesol est utilisé. Le phytotron permet de réaliser des essais sur 1 mois et de tester un plus grand nombre de variétés. C'est un gain de coût et de temps pour les sélectionneurs.

Cette approche a été utilisée par exemple pour quantifier les composantes de résistance du riz vis-à-vis de *Rhizoctonia solani* (Wilocquet *et al.*, 2011 ; Srinivasachary *et al.*, 2013). Différents paramètres épidémiologiques ont été utilisés comme : (1) le nombre de lésions qui permet de calculer l'efficacité d'infection et (2) la taille des lésions qui représente la capacité de l'agent pathogène à se développer dans l'hôte. Cette méthode a permis dans cet exemple de détecter un effet significatif de la variété de riz sur les différents paramètres épidémiologiques mesurés. Ainsi des sources de résistances ont pu être identifiées.

2.3.2 Cas du phoma du tournesol

De nombreuses études ont été effectuées pour caractériser la résistance du tournesol à *P. macdonaldii*. Différents matériels végétaux ont été utilisés : hybrides commerciaux, lignées parentales et hybrides issus de différents croisements entre lignées. Les résultats obtenus ont montré que cette résistance est quantitative et héritable (Roustaei *et al.*, 2000a ; Rachid Al-Chaarani *et al.*, 2002 ; Abou Al Fadil, 2006 ; Darvishzadeh, 2007).

Des interactions entre souche de phoma et génotype de tournesol ont été montrées sur plantule (Abou Al Fadil, 2006 ; Darvishzadeh *et al.*, 2007) : le classement des variétés de tournesol selon leur niveau de résistance au phoma diffère selon la souche pathogène utilisée. Ainsi dans les programmes d'amélioration variétale il sera nécessaire d'utiliser différentes souches représentatives de la variabilité du phoma. Cependant, en 2010 à l'INRA de Toulouse deux expériences conduites en serre sur des plantes plus âgées ont montré des différences entre souches de phoma mais aucune interaction entre génotypes et souches (Bordat *et al.*, 2011).

Une soixantaine de QTLs impliqués dans la résistance du tournesol au phoma ont été détectés jusqu'à présent. Ces QTLs expliquent entre 3 et 42% de la résistance mesurée et sont répartis sur tout le génome du tournesol (Bordat *et al.*, 2011). Abou Al Fadil *et al.* (2007) montrent que certains QTLs sont impliqués dans la résistance spécifique à certains organes alors que d'autres QTLs s'expriment dans plusieurs organes. De plus, il semblerait que certains QTLs soient spécifiques de souches de phoma, en adéquation avec l'observation d'interactions entre génotypes de tournesol et souches de phoma (Darvishzadeh *et al.*, 2007).

L'approche épidémiologique n'a pas été encore utilisée dans l'étude de la résistance du tournesol au phoma. Toutefois, il a été constaté que *P. macdonaldii* présente une période d'incubation (durée entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes) plus longue chez les tournesols résistants (Larfeil, 2003). En France il n'a pas été encore observé des sporulations sur les lésions des plantes vivantes (Voir paragraphe 2.2.2), ainsi il n'est pas possible d'utiliser la période de latence ni les paramètres quantifiant la résistance à la reproduction (sporulation). Pour quantifier la résistance à la colonisation, deux paramètres peuvent être mesurés : la taille des lésions et la période d'incubation.

3 Objectif et étapes de l'étude

L'objectif de ce stage est d'élaborer une méthode pour prédire la résistance partielle du tournesol au phoma en conditions contrôlées (phytotron) en utilisant des paramètres épidémiologiques monocycliques.

Dans un premier temps, les paramètres du monocycle sont mesurés en conditions contrôlées pour quantifier les composantes de résistances au phoma pour différents génotypes de tournesol. Ainsi ces différents génotypes peuvent être classés selon leur niveau de résistance. Il est ensuite nécessaire de vérifier s'il existe une interaction entre génotypes de tournesol et souches de phoma dans les conditions expérimentales des expériences précédentes. La présence d'une telle interaction est importante à connaître car elle doit être prise en compte dans les programmes de sélection variétale. La dernière étape du stage est d'identifier des prédictors de la résistance partielle au phoma du tournesol. Il s'agit d'identifier quels sont les paramètres épidémiologiques mesurés en conditions contrôlées qui permettent le même classement des génotypes qu'au champ.

4 Mesure en conditions contrôlées des paramètres épidémiologiques du phoma sur différents génotypes de tournesol

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Matériel végétal

Dix-huit génotypes de tournesol ont été utilisés : 3 hybrides commerciaux, 12 hybrides de l'INRA et 3 lignées parentales (Tableau 2). Un témoin non-inoculé a été utilisé avec le génotype 598.

Tableau 2 : Liste des génotypes de tournesol

Génotypes			
Hybrides INRA ^a	Hybrides INRA ^b	Lignées parentales ^c	Hybrides commerciaux
610	550	FP055	ES Paulina
616	574	SF056	Krebel
628	586	SF306	NK Ferti
634	592		
640	598		
652			
658			

^a : issus de croisements entre FP056 et des lignées recombinantes provenant du croisement FP056xPAZ2

^b : issus de croisements entre FP056 et des lignées homozygotes

^{a, b, c} : Matériel fourni par le LIPM (Patrick VINCOURT)

Quarante-cinq graines par génotype sont mises à pré-germer quatre jours avant le semis. Les graines sont placées sur du papier tissu humidifié puis enfermées dans des boîtes de Pétri. Les boîtes de Pétri sont placées à l'obscurité à température ambiante. Lors du semis les graines pré-germées sont légèrement enfouies dans le terreau afin que l'extrémité supérieure de celles-ci dépasse. Au moment du semis, les caisses en plastique contenant les pots où sont semées les graines sont placées dans le phytotron (période lumineuse de 14H à 25°C et période d'obscurité de 10H à 20°C). Les plantules sont régulièrement arrosées afin que le terreau reste humide.

4.1.2 Matériel fongique

La souche monopycniospore de *P. macdonaldii* MPH2 a été fournie par le CETIOM comme étant la souche de référence pour les études du phoma du tournesol. C'est une souche indiquée comme très agressive, qui a été isolée en 2006 à partir d'un résidu de tige infecté sur une parcelle expérimentale du Centre INRA d'Auzeville. Elle est stockée à -80°C dans une solution cryoprotectrice. Pour la production d'inoculum, une goutte de 20 µL de suspension est placée au centre de boîtes de Pétri contenant du PDA (Potato Dextrose Agar, 20g/L). Les boîtes de Pétri sont ensuite mises en incubation à 25°C pendant 14 jours avec une photopériode de 12h pour la production de pycniospores.

4.1.3 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est en bloc aléatoire complet avec quatre blocs (Figure 7). Une unité expérimentale représente un lot de huit plantules d'un même génotype, soit un total de 16 pétioles. Trois unités expérimentales sont installées dans chaque caisse (**Erreur ! Référence non valide pour un signet.**). Ce dispositif a été appliqué dans deux expériences indépendantes.

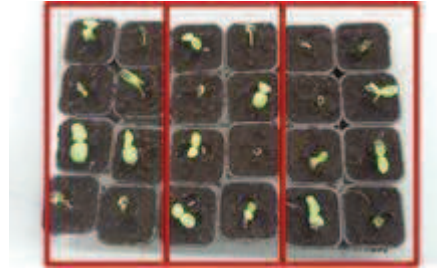
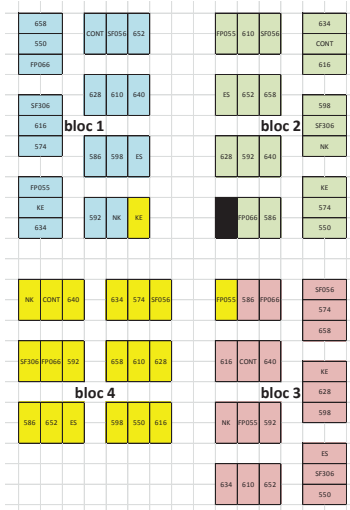


Figure 6 : Trois unités expérimentales dans une caisse

Figure 7 : Plan expérimental en blocs complètement randomisés

4.1.4 Inoculation

L'inoculation se fait au 20^{ème} jour après semis. Pour récupérer les pycniospores nous versons environ 5 mL d'eau distillée dans la boîte de Pétri où l'on peut observer des pycnides (points noirs sur la Figure 8). La suspension mère est prélevée avec une pipette et déposée dans un bécher contenant environ 100 mL d'eau avec du Tween 20 (0.01%). La quantité de suspension mère prélevée est variable (entre 2 et 7 mL) de manière à obtenir une solution légèrement trouble dans le bécher. La concentration en pycniospores de la suspension dans le bécher (S0) est déterminée par comptage des spores sur cellule de Malassez. Une dilution de S0 est ensuite effectuée pour obtenir une suspension avec une concentration de 10⁵ spores par mL (S1).

A l'aide d'une pipette, 20 μ L de suspension S1 sont déposés à la base des pétioles de la première paire de feuilles (Figure 9). Une fois l'inoculation effectuée les caisses contenant les plantules sont fermées hermétiquement pendant quatre jours afin d'assurer un environnement humide, favorable à l'infection.



Figure 8 : Souche de *Phoma macdonaldii* MPH2 sur PDA en boîte de Pétri



Figure 9 : Inoculation d'un pétiole de tournesol avec une suspension contenant des pycniospores de *Phoma macdonaldii*

4.1.5 Mesure des paramètres monocycliques

Le nombre total de pétioles inoculés dans chaque unité expérimentale est compté au moment de l'inoculation.

Le nombre de pétioles présentant des lésions brunes-noires dues au phoma du tournesol est ensuite compté 4, 5, 6, 7 et 8 jours après l'inoculation (JAI ; Figure 10).

La largeur et la longueur des lésions provoquées par le phoma sont mesurées à 6 JAI. Les lésions mesurées sont alors marquées. A 8 JAI la largeur et la longueur des lésions marquées sont mesurées une nouvelle fois. De ces notations quelques variables sont calculées :

- L'Efficacité d'infection : son calcul est réalisé au moment où le nombre de lésions n'augmente plus pour tous les géotypes c'est-à-dire dans notre cas à la dernière notation (8 JAI).

$$\text{Efficacité d'infection} = \frac{\text{Nombre de pétioles infectés parmi 16 pétioles à 8 JAI}}{\text{Nombre total de spores déposées sur les 16 pétioles}}$$

- Taille des lésions : cette variable est issue de la multiplication de la longueur et de la largeur des lésions et est calculée à 6 et 8 JAI.

- Différence de longueur, de largeur et de taille des lésions : on soustrait la longueur, la largeur et la taille de 6 JAI à celles de 8 JAI.

- Période d'incubation maximale : cette variable correspond au jour où le nombre maximum de lésions est atteint.

- Delta : représente l'écart d'incidence d'infection ($= \frac{\text{Nombre de pétioles infectés}}{\text{Nombre total de pétioles}}$) entre 4 et 8 JAI.

- Slope : cette variable correspond au coefficient directeur de la droite de régression linéaire de l'évolution de l'incidence d'infection au cours du temps (entre 4 et 8 JAI).



Figure 10 : Lésion brune-noire provoquée par *Phoma macdonaldii* sur pétiole de tournesol

4.1.6 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est effectué sous le logiciel R (R Core Team, 2014). Dans un premier temps les variables mesurées sont comparées les unes aux autres à l'aide d'une corrélation de Pearson (package 'stats' de R). Puis les résultats des deux expériences sont analysés selon un modèle mixte d'analyse de variance (package 'nlme' de R) où l'on considère le facteur génotype et le facteur expérience ainsi que l'interaction entre ces deux facteurs comme des effets fixes, et le facteur bloc comme effet aléatoire. Une ANOVA est utilisée sur ce modèle.

4.2 Résultats

Relations entre les variables mesurées

D'après le Tableau 3, nous observons que la plupart des variables mesurées présentent une corrélation significative ($P\text{-value} < 0,05$). Cependant les variables se rapportant au temps d'apparition des symptômes (période d'incubation maximale, delta et slope) sont certes corrélées entre elles mais ne sont pas corrélées aux autres variables mesurées.

Tableau 3 : Les coefficients de corrélation de Pearson entre les différentes variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées

	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
a : Efficacité d'infection	0,43	0,47	0,41	0,42	0,48	0,39	0,24	0,24	0,30	0,17	0,19	0,17
b : Longueur des lésions à 6 JAI *		0,70	0,94	0,95	0,69	0,89	0,55	0,27	0,69	0,03	0,13	0,19
c : Largeur des lésions à 6 JAI *			0,83	0,75	0,94	0,84	0,61	0,33	0,74	0,09	0,18	0,10
d : Taille des lésions à 6 JAI *				0,93	0,81	0,97	0,62	0,32	0,80	0,08	0,01	0,08
e : Longueur des lésions à 8 JAI *					0,77	0,95	0,79	0,37	0,86	0,05	0,05	0,14
f : Largeur des lésions à 8 JAI *						0,87	0,67	0,61	0,85	0,13	0,20	0,12
g : Taille des lésions à 8 JAI *							0,77	0,48	0,93	0,13	0,06	0,02
h : Différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI *								0,07	0,09	0,001	0,09	0,89
i : Différence de largeur des lésions entre 6 et 8 JAI *									0,15	0,24	0,19	0,64
j : Différence de taille des lésions entre 6 et 8 JAI *										0,17	0,15	0,06
k : Période d'incubation maximale *											0,29	0,33
l : Delta												0,96
m : Slope												

* coefficients en noir : P-value<0,05 et coefficient en rouge et gras : P-value>0,05

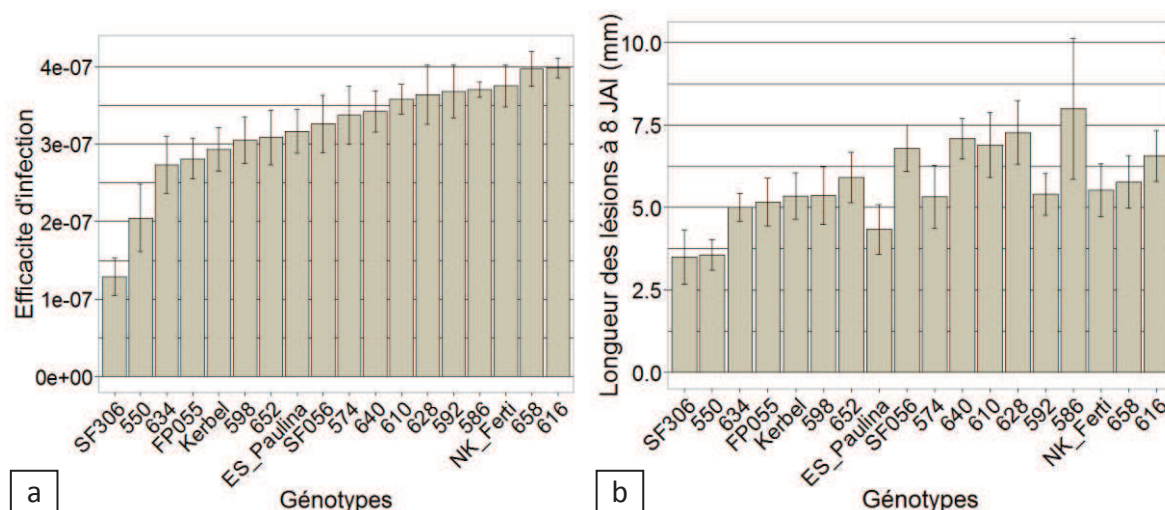
Effet des génotypes de tournesol sur les variables mesurées

Les résultats des analyses de variance présentés dans le Tableau 4 indiquent que pour toutes les variables aucune interaction significative entre les facteurs génotype et expérience n'est observée. Pour les variables reflétant la progression des lésions (différence de longueur, largeur et de taille entre 6 et 8 JAI) ainsi que pour la longueur et la taille des lésions à 8 JAI, un effet de l'expérience est décelé. L'effet génotype est observé sur la plupart des variables sauf celles reflétant le temps d'apparition des symptômes.

Tableau 4 : Résultats des analyses de variance sur l'effet des facteurs génotype (gen), expérience (exp) et de leur interaction sur les variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées

Variable analysée	P-value de l'effet du facteur :		
	gen	exp	gen x exp
Efficacité d'infection	<,0001	0,1296	0,3568
Longueur des lésions à 6 JAI	0,0229	0,238	0,6954
Largeur des lésions à 6 JAI	0,0001	0,266	0,9276
Taille des lésions à 6 JAI	0,0407	0,4256	0,9073
Longueur des lésions à 8 JAI	0,0175	0,003	0,5671
Largeur des lésions à 8 JAI	0,0002	0,9555	0,9622
Taille des lésions à 8 JAI	0,0141	0,0365	0,8604
Différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI	0,0375	<,0001	0,2941
Différence de largeur des lésions entre 6 et 8 JAI	0,0557	0,0244	0,7803
Différence de taille des lésions entre 6 et 8 JAI	0,007	0,0004	0,6291
Période d'incubation maximale	0,5445	0,4752	0,3763
Delta	0,1297	0,6247	0,0671
Slope	0,2505	0,1655	0,1521

Les géotypes de tournesol peuvent donc être classés selon une variable en combinant les deux expériences mais ce classement diffère selon la variable utilisée (Figure 11). La variable permettant la meilleure discrimination des géotypes est l'efficacité d'infection, elle varie de $1,3 \cdot 10^{-07}$ à $4 \cdot 10^{-07}$ lésions par spore (P-value <0.0001 ; Tableau 4).



Chaque colonne représente pour un géotype la valeur moyenne entre les quatre blocs des deux expériences indépendantes. Les barres d'erreur représentent l'écart type de la moyenne.

Figure 11 : Efficacité d'infection (a), longueur des lésions à 8 jours après inoculation (JAI ; b) pour les 18 géotypes de tournesol étudiés

4.3 Discussion

Lors de la première expérience indépendante, les lésions ont eu globalement une très faible expansion comparée à la deuxième expérience indépendante, ce qui explique l'effet du facteur expérience sur les dimensions des lésions à 8 JAI et sur les différences de celles-ci avec celles à 6 JAI. Aucune interaction entre les facteurs géotype et expérience n'est observée, ce qui indique que les données des deux expériences peuvent être combinées.

Les largeurs des lésions à 6 et 8 JAI sont des variables qui permettent une discrimination fine des géotypes (P-value=0,0002 ; Tableau 4). Les pétioles de tournesol sont très étroites, entre 2 et 5 mm selon le géotype de tournesol. Les lésions larges occupent toute la largeur des pétioles. Ainsi la largeur des lésions est une variable fortement dépendante de la morphologie des géotypes de tournesol. A 8 JAI aucun effet de l'expérience n'est observé sur la largeur des lésions (P-value=0,9555 ; Tableau 4) car celle-ci est limitée par la morphologie des pétioles, constante sur les deux expériences. Nous décidons donc de ne pas utiliser cette variable pour la comparaison avec les variables du champ (Voir partie 6). La taille des lésions, calculée à partir de la largeur des lésions, n'est pas non plus retenue.

L'absence d'effet du géotype sur la période d'incubation maximale, delta et slope, des variables reflétant l'apparition des symptômes, indique que (1) soit la période d'incubation n'est pas affectée par les géotypes, (2) soit les conditions expérimentales (première observation possible à 4 JAI après avoir enlevé les couvercles des caisses) n'ont pas permis une mesure précise de la période d'incubation, des lésions étaient déjà constatées lors de la première observation. Les variables liées à la période d'incubation ne seront pas utilisées pour la comparaison avec le champ, puisqu'elles ne sont pas affectées

par le facteur génotype. La forte corrélation (coefficient de corrélation de Pearson = 0,95 ; Tableau 3) entre les longueurs des lésions à 6 et 8 JAI indique qu'une seule de ces deux variables peut être retenue dans les analyses de comparaison avec le champ. Nous choisissons celle à 8 JAI car plus discriminante qu'à 6 JAI (6 JAI : P-value=0,0229 et 8 JAI : P-value=0,0175 ; Tableau 4).

Ainsi il nous reste trois variables utilisables pour la comparaison aux résultats du champ : l'efficacité d'infection, la longueur des lésions à 8 JAI et la différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI.

En conditions contrôlées, les composantes de la résistance partielle au phoma du tournesol retenues correspondent à la composante de résistance à l'infection (représentée par l'efficacité d'infection) et la composante de résistance à la colonisation (représentée par deux variables : la longueur et la différence de longueur des lésions).

5 Vérification de l'interaction entre génotypes de tournesol et souches de phoma

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Matériel végétal

Nous avons sélectionné cinq génotypes de tournesol parmi ceux de l'expérience précédente selon leur niveau d'efficacité d'infection (Figure 11). Ainsi nous avons choisi des génotypes présentant une efficacité d'infection de faible niveau (SF306), de niveau intermédiaire (634 et 598) et de niveau élevé (NK et 658).

Pour l'obtention et la croissance des plantules, le protocole de l'expérience précédente a été utilisé (Voir paragraphe 4.1.1)

5.1.2 Matériel fongique

Nous avons utilisé quatre souches monopycniospores de *P. macdonaldii* différentes : la souche MPH2 de l'expérience précédente et trois souches qui ont été isolées en février 2014 sur des résidus de tiges prélevés en novembre 2013 dans des champs de tournesol des départements Charente (souche M1) et Bourgogne (souches M2 et M3). Le protocole d'obtention de pycnides des souches est le même que pour l'expérience précédente (Voir paragraphe 4.1.2)

5.1.3 Dispositif expérimental

Le plan expérimental est en bloc aléatoire complet à deux facteurs avec quatre blocs. Les 20 combinaisons (souche phoma x génotype tournesol) sont disposées aléatoirement au sein de chaque bloc. Comme pour l'expérience précédente, une unité expérimentale est constituée de 8 plantules et trois unités expérimentales sont placées dans chaque caisse (Voir paragraphe 4.1.3).

5.1.4 Inoculation

Le protocole d'obtention des inocula et d'inoculation est le même pour toutes les souches et correspond à celui de l'expérience précédente (Voir paragraphe 4.1.4).

5.1.5 Mesure des paramètres monocycliques

Les modalités de notation et de mesure sont les mêmes que l'expérience précédente (Voir paragraphe 4.1.5). Une observation supplémentaire est effectuée à 8 JAI : le nombre de pétioles flétris dont la partie morte représentant plus de 50% du pétiole. De cette observation est calculée l'incidence de flétrissement ($= \frac{\text{Nombre de pétioles flétris}}{\text{Nombre total de pétioles infectés}}$)

5.2 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est effectué sous le logiciel R (R Core Team, 2014). Une seule expérience a été effectuée. Les résultats de cette expérience sont analysés avec une analyse de variance selon un modèle mixte (package 'nlme' de R) où l'on considère le facteur génotype, le facteur souche et l'interaction entre ces deux facteurs comme fixes et le facteur bloc comme aléatoire. Une ANOVA est utilisée sur ce modèle.

5.3 Résultats

Effet des souches et des génotypes de tournesol sur les variables mesurées

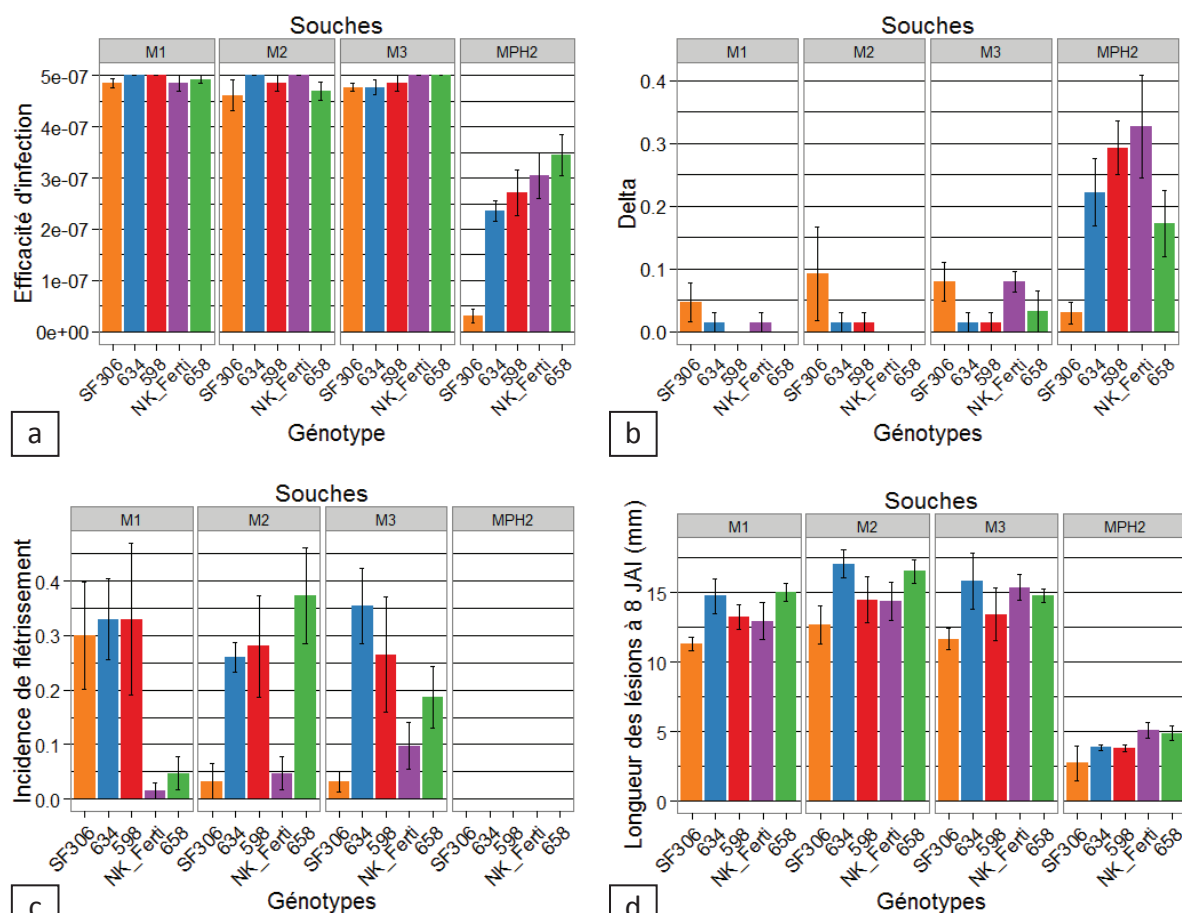
Le facteur souche a un effet significatif sur toutes les variables mesurées (P-value<0,0001 ; Tableau 5). Le facteur génotype n'a un effet que sur trois variables : l'efficacité d'infection, l'incidence de flétrissement et la longueur des lésions à 8 JAI. L'interaction entre génotype de tournesol et souche de phoma est observée pour toutes les variables sauf la longueur des lésions à 8 JAI et la différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI.

Tableau 5 : Résultats des analyses de variance sur l'effet des facteurs génotype (gen), souche de phoma (souche) et leur interaction sur les variables mesurées lors du développement du phoma du tournesol en conditions contrôlées

Variable analysée	P-value de l'effet du facteur :		
	gen	souche	gen x souche
Efficacité d'infection	<,0001	<,0001	<,0001
Incidence de flétrissement	<,0001	<,0001	0,0013
Longueur à 8 JAI	0,0007	<,0001	0,9028
Différence de longueur entre 6 et 8 JAI	0,0687	<,0001	0,7572
Période d'incubation maximale	0,5470	<,0001	0,0179
Delta	0,2435	<,0001	0,0002
Slope	0,3747	<,0001	0,0014

Visualisation de l'interaction génotype*souche

Pour les souches M1, M2 et M3 l'efficacité d'infection est à son maximum pour tous les génotypes et leur delta est presque nul sauf pour le génotype SF306 (Figure 12 a et b). La différence de niveau d'incidence de flétrissement entre les génotypes varie selon la souche de phoma utilisée (Figure 12 c) alors qu'elle reste à peu près similaire pour la longueur des lésions à 8 JAI (Figure 12 d). Notons que tous les génotypes de tournesol ont une incidence de flétrissement nulle quand ils sont contaminés par la souche MPH2. Le classement des génotypes selon le niveau d'efficacité d'infection de la souche MPH2 est le même que celui des expériences précédentes (Figure 11 a).



Chaque colonne représente pour un génotype la valeur moyenne entre les quatre blocs. Les barres d'erreur représentent l'écart type de la moyenne.

Figure 12 : Efficacité d'infection (a), delta (b), incidence de flétrissement (c), et longueur des lésions à 8 JAI (d) pour les 5 génotypes de tournesol inoculés par 4 souches de phoma

5.4 Discussion

Les souches M1, M2 et M3 sont plus agressives que la souche MPH2. Leur incidence d'infection atteint dès la première notation son maximum - 100% des pétioles sont infectés - d'où un delta presque nul pour la plupart des génotypes et une efficacité d'infection maximale. L'interaction observée pour l'efficacité d'infection, la période d'incubation maximale, delta et slope, est due à la plus forte agressivité des souches M1, M2 et M3 en comparaison avec MPH2. Elle ne reflète pas une interaction réelle entre souche et génotype de tournesol. Cette interaction n'a pas pu être testée pour ces variables dans nos conditions expérimentales. Les souches M1, M2 et M3 sont plus fraîchement isolées (2013) que la souche MPH2 (2006) ce qui expliquerait la moindre agressivité de cette dernière.

Bien que les classements entre génotypes ne soient pas exactement les mêmes d'une souche à l'autre (634 plus sensible pour M1, M2 et M3, et intermédiaire pour MPH2 ; Figure 12) l'interaction génotype*souche n'est pas significative pour la longueur de lésion et la différence de longueur de lésion (Tableau 5). Nous pouvons donc considérer que pour ces variables, il n'y a aucune interaction significative entre souche et génotype.

L'interaction significative génotype*souche observée sur l'incidence de flétrissement, reflétant un comportement de tolérance, est quant à elle avérée. Il semblerait que le comportement de tolérance des génotypes varie selon la souche de phoma.

6 Identifications des prédicteurs en conditions contrôlées de la résistance partielle au phoma du tournesol en champ

6.1 Matériels et méthodes

6.1.1 Provenance des données du champ

Les données du champ sont issues d'une expérience menée en 2013. Cette expérience a été mise en place selon un dispositif en bloc aléatoire complet avec quatre blocs. Une unité expérimentale correspond à une micro-parcelle de 3*5 m, soit 6 rangs sur 5 m. Les 18 génotypes de l'expérience en phytotron étaient inclus dans l'expérience au champ. Trois notations ont été effectuées (20 août, 29 août et 5 septembre). Les variables de maladie suivantes ont été calculées à partir des observations effectuées au champ :

- inc1 : Incidence de la maladie à la première notation (proportion de plantes ayant au moins une lésion de phoma)
- inc2 : Incidence de la maladie à la deuxième notation (proportion de plantes ayant au moins une lésion de phoma)
- incs : incidence de la maladie sur tige à l'échelle de la plante à la troisième notation (proportion de plantes ayant au moins une lésion sur tige)
- asev : sévérité de la maladie sur tige à la troisième notation
- anuml : nombre de lésions par tige à la troisième notation
- incn : incidence de la maladie sur tige à l'échelle du nœud foliaire à la troisième notation (proportion de nœuds foliaires sur tige présentant une lésion)
- lesi : taille des lésions sur tige à la troisième notation

6.1.2 Variables du phytotron

Les variables utilisées pour le phytotron sont celles qui ont été sélectionnées dans la partie 4. Nous avons donc la longueur des lésions à 8 Jours Après Inoculation (JAI ; long), l'efficacité d'infection (ei) et la différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI (difflong).

6.1.3 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques est effectué sous le logiciel R (R Core Team, 2014). Les variables retenues des expériences en phytotron sont comparées aux variables obtenues en champ présentées ci-dessus. Des corrélations simples de Pearson sont effectuées pour chaque variable du phytotron avec chaque variable du champ (package 'stats' de R).

6.2 Résultats

D'après la Figure 13 les seules corrélations significatives qui existent ($P\text{-value} < 0.05$) entre les variables du phytotron et celles du champ, sont celles qui existent entre la longueur des lésions à 8 JAI (long_P), l'efficacité d'infection (ei_P) et l'incidence de maladie à la première et deuxième notation (inc1_C et inc2_C). La corrélation la plus élevée est entre ei_P et INC_1 ($r = 0.62$), mais ei_P n'est pas significativement corrélée à INC_2 . Par contre long_P est corrélée significativement à INC_1 et INC_2 .

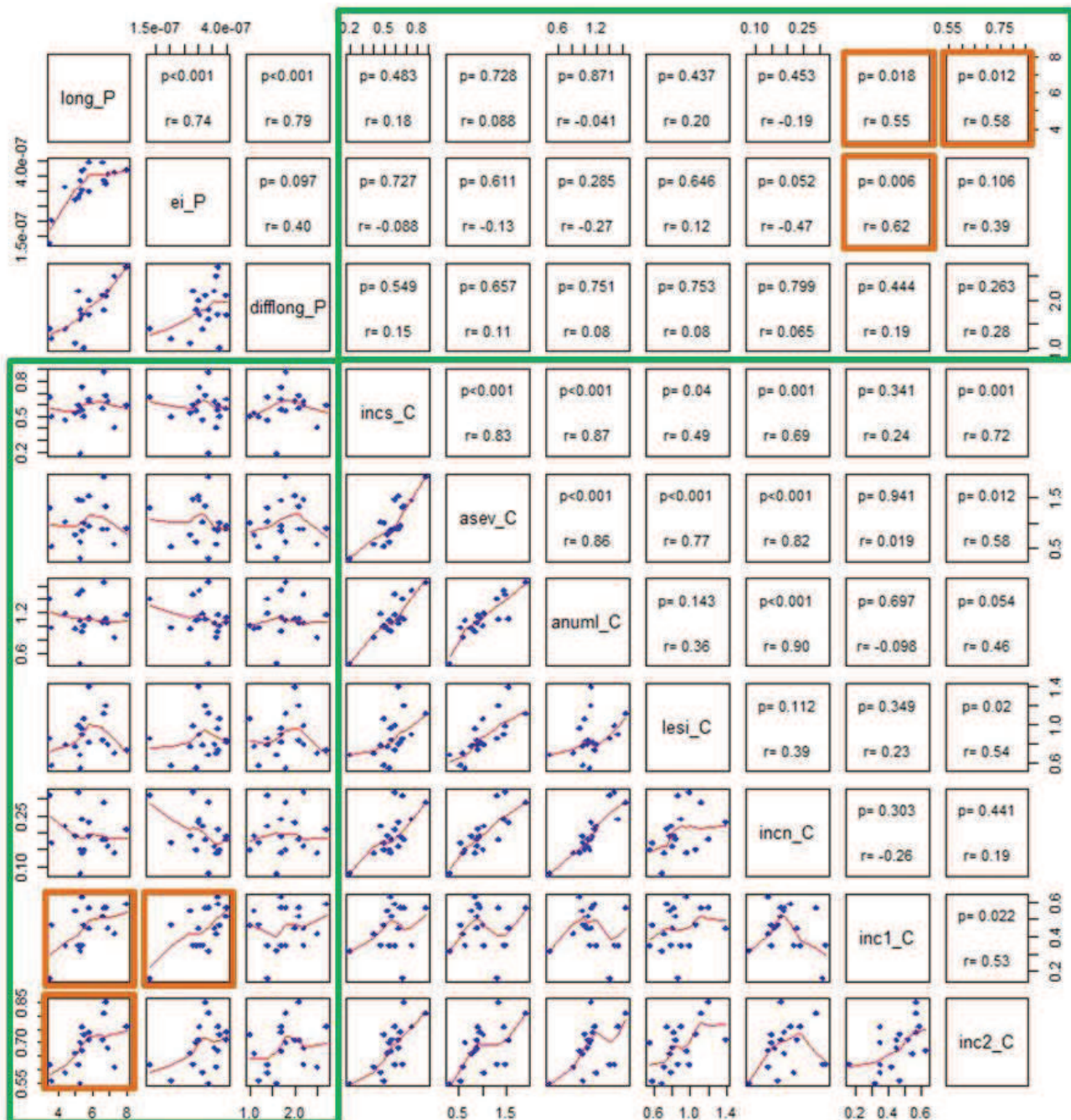


Figure 13 : Matrice présentant les coefficients de corrélation de Pearson (r) et les p -value associées (p) entre les variables du phytotron ($_P$) et celles du champ ($_C$) ainsi que des représentations graphiques de la distribution des valeurs des 18 géotypes selon deux variables.

6.3 Discussion

La longueur des lésions à 8 JAI semble être une bonne variable pour prédire la résistance partielle au phoma du tournesol car elle est corrélée avec deux variables du champ : incidence de la maladie à la première et à la deuxième notation. Aucune corrélation significative n'est détectée entre les variables mesurées au phytotron et les variables de maladie mesurées à la troisième notation. Ces résultats indiquent que les variables mesurées au phytotron permettent de prédire la phase initiale d'épidémie au champ.

L'incidence de maladie au champ représente l'efficacité d'infection des ascospores de *P. macdonaldii*. En effet, c'est l'inoculum principal au champ (Voir partie 2.2.2). Ainsi l'efficacité d'infection des pycniospores de *P. macdonaldii* en conditions contrôlées semble corrélée à celle des ascospores au champ.

7 Discussion générale et conclusions

Les mesures monocycliques de maladie effectuées en conditions contrôlées (phytotron) pour discriminer des génotypes de tournesol selon des paramètres de l'épidémiologie de *P. macdonaldii* correspondent à un dispositif expérimental efficace en termes de temps et d'espace. Dans le phytotron de 9 m² dont nous disposons, nous avons pu tester jusqu'à 20 modalités différentes ensemble sur une expérience de 28 jours. Par ailleurs, aucun effet de l'interaction génotype*expérience sur les variables mesurées n'a été observé. Par contre, sur certaines variables l'effet de l'expérience a été mis en évidence. Ainsi cette méthode paraît robuste car reproductible (pas d'interaction génotype*expérience) pour discriminer des modalités entre elles.

La variable présentant la plus faible P-value du test de l'analyse de variance pour l'effet génotype est la variable différenciant le mieux les génotypes de tournesol entre eux. Ainsi d'après le Tableau 4, l'efficacité d'infection des pycniospores de *P. macdonaldii* est la variable la plus discriminatoire en conditions contrôlées. En deuxième, c'est la largeur des lésions, une variable fortement liée à la morphologie propre des génotypes. Cette dernière reflète plus les différences de morphologie entre les génotypes qu'une différence de comportement face à la maladie. Puis viennent en dernier, la longueur et la différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI. En conditions contrôlées il apparaît que c'est la composante de résistance à l'infection qui s'exprime le plus et qui différencie le mieux les génotypes.

La méthode utilisée en phytotron permet de fournir des prédicteurs de la résistance partielle au phoma du tournesol au champ. Toutefois ces prédicteurs ne permettent de prédire la résistance au champ qu'au début de l'épidémie. Une seconde expérience au champ est en cours de réalisation (été 2014). Elle apportera un jeu supplémentaire de données ce qui permettra de compléter l'analyse des prédicteurs en conditions contrôlées de la résistance au champ.

De nombreux travaux ont consisté à rechercher des QTLs de la résistance partielle au phoma du tournesol sur jeunes plantules en conditions contrôlées (voir paragraphe 2.3.2). A l'heure actuelle aucun lien n'a été établi entre conditions contrôlées et champ pour les QTLs trouvés. La méthode que nous avons mise en place permettrait de faire ce lien.

La mesure des composantes de résistance est une méthode peu développée contrairement à celle visant à rechercher les QTLs. Toutefois elle a été appliquée à d'autres pathosystèmes tels que la rouille naine de l'orge (Parlevliet et Van Ommeren, 1975), la

rouille couronnée de l'avoine (Díaz-Lago *et al.*, 2003), la rouille jaune de l'orge (Sandoval-Islas *et al.*, 2007), la fusariose du blé (Browne *et al.*, 2006), *Magnaporthe grisea* sur fétuque élevée (Tredway *et al.*, 2003) et *Rhizoctonia solani* sur riz (Willoquet *et al.*, 2011 ; Srinivasachary *et al.*, 2013). La recherche de prédicteurs en conditions contrôlées de résistance au champ est encore plus rare et n'aboutit pas souvent à des résultats probants. Par exemple pour *Rhizoctonia solani* sur riz (Srinivasachary *et al.*, 2013), les prédicteurs trouvés ne s'avèrent que très peu performant car la morphologie des riz joue un rôle très important dans l'expression de la maladie.

En conditions contrôlées pour la longueur des lésions à 8 JAI et la différence de longueur des lésions entre 6 et 8 JAI, l'absence d'interaction entre génotype de tournesol et souche de *P. macdonaldii* a été mise en évidence. Cette interaction n'a pas pu être testée pour les autres variables. Mais seulement une expérience a été réalisée, une autre, suivant le même protocole, est en cours de réalisation. Les résultats des deux expériences combinées sur l'interaction génotype*souche seront présentés lors de la soutenance orale du 02 septembre 2014. Pour le moment nous ne pouvons ni affirmer ni contredire la bibliographie au sujet de cette interaction en conditions contrôlées (Voir paragraphe 2.3.2).

Bibliographie

- ABOU AL FADIL, T., 2006. *Déterminisme de la tolérance du tournesol à Phoma macdonaldii au collet et sur racines : approches génétiques et histologiques*. Thèse de doctorat ès sciences. Institut National Polytechnique de Toulouse. 170 pp.
- ABOU AL FADIL, T., KIANI, S.P., DECHAMP-GUILLAUME, G., GENTZBITTEL, L. et SARRAFI, A., 2007. QTL mapping of partial resistance to Phoma basal stem and root necrosis in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science*. Vol. 172, n° 4, p. 815-823.
- ABOU AL FADIL, T., JAUNEAU, A., MARTINEZ, Y., RICKAUER, M. et DECHAMP-GUILLAUME, G., 2009. Characterisation of sunflower root colonisation by *Phoma macdonaldii*. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 124, n° 1, p. 93-103.
- ANDRIVON, D., TIVOLI, B. et WILLOQUET, L., 2014. Prendre en compte les contraintes biotiques : cas des maladies fongiques. Conception d'idéotypes de plantes pour une agriculture durable. Eds. : Debaeke, P. & Quilot-Turion, B., *INRA Science & Impact, FormaSciences, CIRAD*. p. 157-173.
- BOEREMA, G.H., 1970. Additional notes on *Phoma herbarum*. *Peersonia*. Vol. 6, p. 15-48.
- BOEREMA, G.H., VAN KESTEREN, H.A. et LOERAKKER, W.M., 1981. Notes on phoma. *Transactions of the British Mycological Society*. Vol. 77, n° 1, p. 61-74.
- BORDAT, A., DEBAEKE, P., DECHAMP-GUILLAUME, G., MESTRIES, E., SEASSAU, C. et VINCOURT, P., 2011. Phoma et dessèchement précoce du tournesol. CETIOM. *Les points techniques du CETIOM*. 86 pp.
- BROWNE, R.A., BEQUAIN, C. et MASCHER, F., 2006. Components of partial disease resistance detected using a detached leaf assay in CIMMYT Fusarium head blight resistant wheat germplasm. *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 116, n° 3, p. 199-210.
- CETIOM, 2014. Les stades repères du tournesol. CETIOM - Centre technique interprofessionnel des oléagineux et du chanvre. Disponible à l'adresse : <http://www.cetiom.fr/tournesol/cultiver-du-tournesol/atouts-points-cles/stades-reperes/>.
- DARVISHZADEH, R., 2007. *Déterminisme génétique de la résistance du tournesol au Phoma*. Thèse de doctorat ès sciences. Institut National Polytechnique de Toulouse. 182 pp.

- DARVISHZADEH, R., DECHAMP-GUILLAUME, G., HEWEZI, T. et SARRAFI, A., 2007. Genotype-isolate interaction for resistance to black stem in sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Pathology*. Vol. 56, n° 4, p. 654-660.
- DEBAEKE, P. et PERES, A., 2003. Influence of sunflower (*Helianthus annuus* L.) crop management on phoma black stem (*Phoma macdonaldii* Boerema). *Crop Protection*. Vol. 22, n° 5, p. 741-752.
- DELOS, M., MOINARD, J. et GUÉRIN, O., 1997. La dynamique épidémique du phoma du tournesol : pycniospores ou ascospores, lesquelles surveiller le plus ? *Phytoma - La Défense des Végétaux*. n° 500, p. 60-62.
- DELOS, M., MOINARD, J. et MÜHLBERGER, E., 1998. Le phoma du tournesol : mise au point d'une méthode d'évaluation des risques de contaminations par des ascospores. *Phytoma - La Défense des Végétaux*. n° 504, p. 26-29.
- DÍAZ-LAGO, J.E., STUTHMAN, D.D. et LEONARD, K.J., 2003. Evaluation of components of partial resistance to oat crown rust using digital image analysis. *Plant Disease*. Vol. 87, n° 6, p. 667-674.
- FREZZI, M.J., 1968. *Leptosphaeria lindquistii* n. sp., forma sexual de *Phoma oleracea* var. *helianthi-tuberosi* Sacc., hongo causal de la « mancha negra del tello » del girasol (*Helianthus annuus* L.). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. Vol. 5, n° 7, p. 77-80.
- INA P-G – DÉPARTEMENT AGER, 2003. Fiche sur le tournesol.
- LARFEIL, C., 2003. *La maladie des taches noires du tournesol causée par Phoma macdonaldii Boerema : Variabilité phénotypique et moléculaire - Evaluation de la sensibilité des géotypes à la maladie - Modalités de l'infection*. Thèse de doctorat ès sciences. Institut National Polytechnique de Toulouse. 102 pp.
- LEPOIVRE, P., 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Gembloux [Belgique]; *Bruxelles : Presses agronomiques de Gembloux ; De Boeck*. p. 259-288
- MCDONALD, W.C., 1964. Phoma black stem of sunflowers. *Phytopathology*. Vol. 54, n° 149, p. 492-493.
- ONIDIOL, 2012. Chiffres clés 2011-2012 - Oléagineux France. Disponible à l'adresse : http://www.cetiom.fr/fileadmin/cetiom/Chiffres_marches/onidol_chiffres-cles-2012.pdf.
- PARLEVLIET, J.E., 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 17, n° 1, p. 203-222.
- PARLEVLIET, J.E. et VAN OMMEREN, A., 1975. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, micro plot tests and latent period. *Euphytica*. Vol. 24, n° 2, p. 293-303.
- POLAND, J.A., BALINT-KURTI, P.J., WISSER, R.J., PRATT, R.C. et NELSON, R.J., 2009. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science*. Vol. 14, n° 1, p. 21-29.
- PROLEA, 2012. Statistiques des Oléagineux & Protéagineux 2011-2012. Disponible à l'adresse : <http://www.prolea.com/fileadmin/internet/fichiers/publications/Statistiques-oleagineux-proteagineux-2012.pdf>.
- PROLEA, 2014. La filière française des huiles et protéines végétales : Tournesol. Disponible à l'adresse : <http://www.prolea.com/index.php?id=1478>.

- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienne [Autriche]. Disponible à l'adresse : <http://www.R-project.org/>.
- RACHID AL-CHAARANI, G., ROUSTAE, A., GENTZBITTEL, L., MOKRANI, L., BARRAULT, G., DECHAMP-GUILLAUME, G. et SARRAFI, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 104, n° 2-3, p. 490-496.
- ROUSTAE, A., BARRAULT, G., DECHAMP-GUILLAUME, G., LESIGNE, P. et SARRAFI, A., 2000a. Inheritance of partial resistance to black stem (*Phoma macdonaldii*) in sunflower. *Plant Pathology*. Vol. 49, n° 3, p. 396-401.
- ROUSTAE, A., COSTES, S., DECHAMP-GUILLAUME, G. et BARRAULT, G., 2000b. Phenotypic variability of *Leptosphaeria lindquistii* (anamorph : *Phoma macdonaldii*), a fungal pathogen of sunflower. *Plant Pathology*. Vol. 49, n° 2, p. 227-234.
- ROUSTAE, A., DECHAMP-GUILLAUME, G., GELIE, B., SAVY, C., DARGENT, R. et BARRAULT, G., 2000c. Ultrastructural studies of the mode of penetration by *Phoma macdonaldii* in sunflower seedlings. *Phytopathology*. Vol. 90, n° 8, p. 915-920.
- SANDOVAL-ISLAS, J.S., BROERS, L.H.M., MORA-AGUILERA, G., PARLEVLIET, J.E., OSADAKAWASOE, S. et VIVAR, H.E., 2007. Quantitative resistance and its components in 16 barley cultivars to yellow rust, *Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*. *Euphytica*. Vol. 153, n° 3, p. 295-308.
- SAVARY, S., 2007. Epidemics of plant diseases: mechanisms, dynamics and management. Ed. : TIBAYRENC, M., Encyclopedia of infectious diseases. *John Wiley & Sons, Inc.* p. 125-136.
- SCHILLING, E.E. et HEISER, C.B., 1981. Infrageneric Classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon*. 1981. Vol. 30, n° 2, p. 393.
- SEASSAU, C., DECHAMP-GUILLAUME, G., MESTRIES, E. et DEBAEKE, P., 2010. Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by *Phoma macdonaldii*. *Field Crops Research*. Vol. 115, n° 1, p. 99-106.
- SEASSAU, C., DECHAMP-GUILLAUME, G., MESTRIES, E. et DEBAEKE, P., 2012. Low plant density can reduce sunflower premature ripening caused by *Phoma macdonaldii*. *European Journal of Agronomy*. Vol. 43, p. 185-193.
- SRINIVASACHARY, S., BELIGAN, G., WILLOCQUET, L. et SAVARY, S., 2013. A strategy to identify sources of quantitative resistance in pathosystems involving disease escape and physiological resistance: the case study of rice sheath blight. *Plant Pathology*. Vol. 62, n° 4, p. 888-899.
- SUGAWARA, F. et STROBEL, G., 1986. Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*. *Plant Science*. Vol. 43, n° 1, p. 19-23.
- TREDWAY, L.P., STEVENSON, K.L. et BURPEE, L.L., 2003. Components of resistance to *Magnaporthe grisea* in 'Coyote' and 'Coronado' tall fescue. *Plant disease*. 2003. Vol. 87, n° 8, p. 906-912.
- WILLOCQUET, L., LORE, J.S., SRINIVASACHARY, S. et SAVARY, S., 2011. Quantification of the components of resistance to rice sheath blight using a detached tiller test under controlled conditions. *Plant Disease*. Vol. 95, n° 12, p. 1507-1515.

Résumé

La maladie des tâches noires du tournesol, causée par *Phoma macdonaldii*, est présente dans toutes les zones de production françaises. L'utilisation de variétés résistantes représente la seule option potentiellement efficace, peu coûteuse et respectueuse de l'environnement, pour gérer cette maladie. La résistance partielle du tournesol envers *P. macdonaldii* a été détectée dans plusieurs génotypes ; ce trait pourrait donc être inclus dans les programmes de sélection variétale. La méthodologie élaborée durant ce stage est fondée sur une approche épidémiologique pour identifier des prédicteurs de la résistance partielle au phoma du tournesol au champ à partir de mesures réalisées en conditions contrôlées. Les mesures des paramètres épidémiologiques du phoma sont effectuées après inoculation artificielle sur jeune plantule de tournesol en phytotron. En conditions contrôlées les composantes de résistance qui s'expriment sont la composante de résistance à l'infection puis celle à la colonisation. Deux prédicteurs ont pu être identifiés pour prédire la résistance partielle au champ en début d'épidémie. Enfin, aucune interaction entre génotype de tournesol et souche de phoma n'a pu être montrée pour les différents paramètres épidémiologiques mesurés.

Abstract

Sunflower black stem disease, caused by *Phoma macdonaldii*, is present in all French sunflower production areas. The use of resistant varieties represents a potential effective option for disease control, representing a cheap and environment-friendly option. Sunflower partial resistance to *P. macdonaldii* was observed in several genotypes; this feature could therefore be included in breeding programs. The methodology developed during the internship corresponds to an epidemiological approach to identify predictors of sunflower partial resistance to phoma in controlled conditions. The measurements of such epidemiological parameters of phoma resistance were done after inoculation on sunflower seedlings in phytotron. In controlled conditions, the components of sunflower partial resistance to phoma are the components of resistance to infection and colonization. Two predictors for partial resistance were identified and were associated to disease intensity at the beginning of epidemic in the field. Finally, no interaction between genotype of sunflower and strains of *P. macdonaldii* was detected for the different epidemiological parameters measured in this work.