

## Quel lien entre l'épidémiologie, la création variétale et le potentiel de durabilité des résistances ? Illustration chez le phoma du colza.

Bousset L.<sup>1</sup>, Brun H.<sup>1</sup>, Chèvre A.M.<sup>2</sup>, Delourme R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR1099 BiO3P, BP35327, 35653 Le Rheu cedex, France

<sup>2</sup> INRA, UMR118 APBV, BP35327, 35653 Le Rheu cedex, France

Correspondance: bousset@rennes.inra.fr

### Résumé

La manière dont les épidémies réduisent le rendement des cultures est influencée par les plantes, les agents pathogènes, l'environnement, le temps et les actions humaines. La résistance génétique est indéniablement une des tactiques contribuant à la protection des cultures par l'utilisation de résistances qualitatives et/ou quantitatives. Parce qu'elle agit sur l'épidémiologie, la création variétale peut contribuer à l'objectif d'augmenter le potentiel de durabilité des résistances. L'adaptation des populations pathogènes entraînant la perte d'efficacité des résistances ne dépend pas uniquement de la dynamique épidémique sur une parcelle pendant une saison, mais au contraire d'une dynamique pluriannuelle incluant la transmission d'inoculum entre parcelles. Comprendre l'épidémiologie en incluant la transmission du champignon entre années et entre parcelles permet d'exploiter plus largement le potentiel de la création variétale et de construire des stratégies basées sur la complémentarité avec les pratiques culturales ou le déploiement des variétés. La mise en œuvre concrète des stratégies dépend de la capacité à mesurer précisément l'expression des résistances dans les variétés ce qui repose sur le développement des méthodologies correspondantes. Nous illustrerons ces points dans le cas du phoma du colza.

**Mots-clés :** durabilité, sélection, récurrence des épidémies, transmission, constructions génétiques, *Leptosphaeria maculans*.

**Abstract:** Relationship between epidemiology, plant breeding and possible durability of disease resistance. Case study of oilseed rape phoma

How epidemics reduce crop yield is influenced by plants, pathogens, environment, time and human actions. Genetic resistance undeniably is one tactic contributing to crop protection, using qualitative and/or quantitative resistances. Because it acts on the epidemiology, plant breeding can contribute to the goal of increasing the potential durability of resistance. The adaptation of pathogen populations causing the loss of efficacy of resistance does not depend solely on the epidemic dynamics on one field in one season, but rather on pluriannual dynamics including transmission of inoculum between seasons. Understand the epidemiology including the transmission of the fungus between years and between plots can allow using breeding potential more thoroughly and to building crop protection strategies based on the complementarity with cropping practices or the deployment of varieties. The practical implementation of strategies depends on the ability to accurately measure the expression of resistance in varieties, that relies on the development of corresponding methodologies. We will illustrate these points in the case of Phoma stem canker of oilseed rape.

**Keywords:** durability, selection, recurrence of epidemics, transmission, plant genotypes, *Leptosphaeria maculans*.

## Introduction

Les changements majeurs associés à l'intensification de l'agriculture (Stoate *et al.*, 2009), sous l'effet de la disponibilité des pesticides, ont amené à une réduction considérable de la diversité des plantes cultivées dans les agro-écosystèmes. Ceci a augmenté la vulnérabilité des cultures aux maladies (Stukenbrock et McDonald, 2008) qui a entraîné l'augmentation de l'usage des pesticides, usage que l'on souhaite maintenant réduire. Parce qu'elle n'est pas basée sur le recours aux intrants, l'utilisation des résistances génétiques de la plante est une des tactiques possibles. Le recours à la génétique par la création variétale est déjà largement utilisé, par exemple dans la protection du colza contre le phoma (Delourme *et al.*, 2006). Cependant, des cas de perte d'efficacité des résistances ont été observés en raison de l'adaptation des populations pathogènes (Rouxel *et al.*, 2003). Ceci amène à reconsidérer l'élaboration des stratégies de protection des cultures en tenant compte du lien entre génétique de la résistance et épidémiologie des agents pathogènes, ce que nous ferons en appliquant notre propos au phoma du colza.

### 1. En quoi les processus du cycle de vie du champignon impactent-ils le développement des épidémies et l'adaptation des populations fongiques aux résistances des plantes ?

La manière dont les épidémies réduisent le rendement des cultures est influencée par les plantes, les agents pathogènes, l'environnement, le temps et les actions humaines. Agir sur les épidémies implique donc de comprendre ce qu'est une épidémie, ce qu'est une résistance et comment les deux interagissent

#### 1.1 Comment une épidémie fongique se développe-t-elle ?

En phytopathologie, "quand un agent pathogène se répand sur et affecte de nombreux individus au sein d'une population dans un espace vaste et un temps court, le phénomène est appelé épidémie" (Agrios, 2005). Au cours d'une épidémie à l'échelle d'une parcelle, on peut distinguer séquentiellement trois phases :

- (i) L'initiation de l'épidémie, qui correspond à l'arrivée d'inoculum et l'établissement de la population pathogène sur le couvert végétal en développement ;
- (ii) L'amplification de la maladie, qui correspond à l'augmentation de la taille de la population pathogène et à la modification de sa composition en fonction de la sélection ou contre sélection d'individus en compétition. Les symptômes qui se développent pendant l'épidémie sont impliqués d'une part dans la nuisibilité – qui dépend de la relation entre les dégâts (symptômes) et les dommages (pertes de rendement) – et d'autre part dans la récurrence inter annuelle – qui dépend de la production de descendants issus de multiplication asexuée et/ou de reproduction sexuée après que l'agent pathogène se soit développé au dépend de son hôte ;
- (iii) La fin de l'épidémie correspond à la transmission de descendants contribuant à initier l'épidémie de l'année suivante, ce qui implique d'une part la survie et d'autre part – pour les plantes annuelles – la dispersion vers un nouvel hôte, occasionnant à l'échelle de la région le mélange de populations issues de différentes parcelles.

Le phoma du colza est causé par un complexe d'espèces de champignons ascomycètes dont *Leptosphaeria maculans* (Mendes-Pereira *et al.*, 2003). L'initiation des épidémies en automne se produit sur les feuilles (Figure 1). Sur les symptômes occasionnés, appelés macules, le champignon peut produire

des conidies (aussi appelées pycnidiospores) dispersées à courte distance par la pluie (Travadon *et al.*, 2007). De l'automne au début de l'été suivant, à partir des macules, le champignon rejoint les nervures et progresse de manière systémique vers la tige puis le collet de la plante où il dégrade les tissus occasionnant une nécrose. La nécrose perturbe l'alimentation hydrique de la plante – pouvant aller jusqu'à la verse de la plante – occasionnant des pertes de rendement. Le champignon survit l'été – et plusieurs années tant que les résidus ne sont pas totalement décomposés – sous forme de mycélium sur les résidus restant sur la parcelle à l'issue de la culture. La survie sur les graines a été montrée, la survie sur d'autres crucifères que le colza a été postulée mais leur contribution effective aux épidémies n'a pas été démontrée en Europe (Pinochet, 2011)

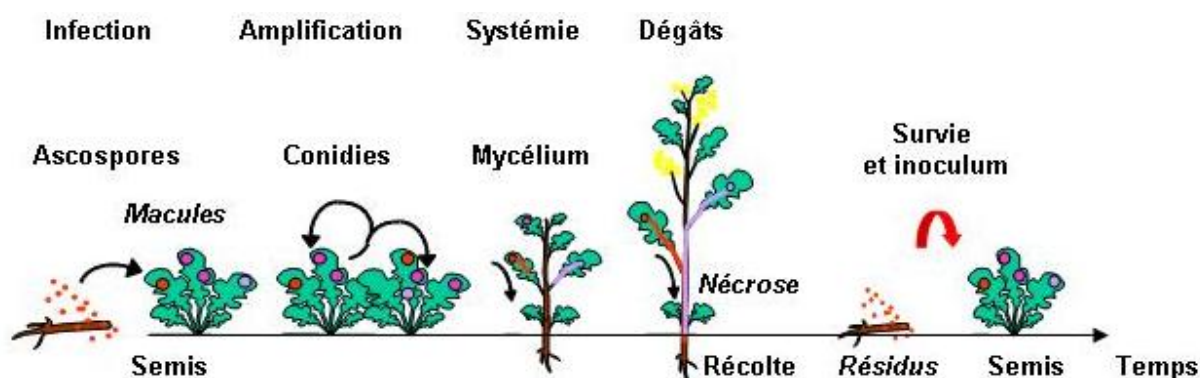


Figure 1. Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans* sur colza. © Bousset, INRA.

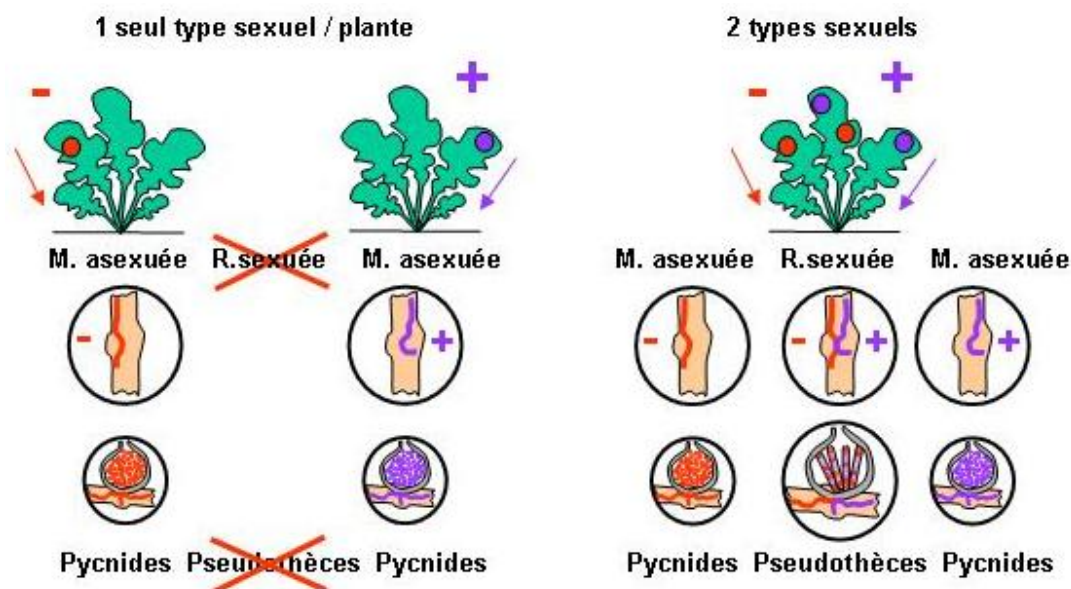


Figure 2. Production d'inoculum par *Leptosphaeria maculans* sur colza par multiplication asexuée et reproduction sexuée. La multiplication asexuée est possible dans tous les cas, y compris pour des individus isolés (un seul type sexuel par plante) ; les fructifications produites nommées pycnides contiennent des conidies dispersées par la pluie. La reproduction sexuée de ce champignon hétérothallique n'est possible qu'en présence simultanée de deux individus compatibles sur la même plante (deux types sexuels) ; les fructifications produites nommées pseudothèces contiennent des ascospores dispersées par le vent. © Bousset, INRA.

A partir du mycélium, si un seul individu champignon est présent sur un résidu, il ne peut produire par multiplication dite "asexuée" que des fructifications (pycnides) contenant des conidies dispersées à courte distance par la pluie (Figure 2). Si les mycéliums de deux individus de types sexuels complémentaires (il existe deux types sexuels différents, auto-incompatibles) se rencontrent sur un même résidu, ils peuvent alors, en plus des pycnides, produire par reproduction sexuée des fructifications (pseudothèces) contenant des ascospores dispersées par le vent jusqu'aux parcelles voisines (Marcroft *et al.*, 2004).

### 1.2 Comment les résistances des plantes agissent-elles et comment les populations de champignons s'y adaptent-elles ?

Chez les plantes hôtes, on distingue les résistances qualitatives des résistances quantitatives. Les résistances qualitatives, souvent à déterminisme génétique monogénique chez la plante, s'expriment en "tout ou rien" en fonction du génotype de l'agent pathogène, virulent (capable d'infecter) ou avirulent (incapable d'infecter). Chez le colza, une dizaine de gènes de résistance qualitative issus du colza (*Brassica napus*) ou introduits dans les variétés de colza par croisement avec des moutardes brune (*Brassica juncea*) et noire (*Brassica nigra*) ont été décrits (Delourme *et al.*, 2006). Leur expression empêche l'infection par les individus du champignon possédant les gènes d'avirulence correspondants (Ansan-Melayah *et al.*, 1998). Les résistances quantitatives, à déterminisme génétique polygénique chez la plante, s'expriment de manière partielle en fonction du niveau d'agressivité de l'agent pathogène et de l'environnement. Chez le colza, la résistance quantitative a d'abord été décrite chez des variétés de colza d'hiver européen telle que 'JetNeuf'. L'expression de cette résistance ne limite pas ou peu l'initiation des épidémies, par contre elle réduit l'incidence (nombre de plantes malades) et la sévérité (gravité, proportion de surface malade) des nécroses au collet (Delourme *et al.*, 2006).

Lorsqu'une résistance qualitative est efficace, la proportion d'individus compatibles virulents est faible dans l'inoculum parvenant sur la parcelle, ce qui engendre une taille de population initiale faible. Ceci se traduit par une limitation des épidémies, des dégâts et des dommages occasionnés. Cependant, déployer des variétés sensibles et résistantes dans l'agro-écosystème donne un avantage sélectif automatique aux individus virulents (parfois compensé par un coût de fitness sur leur multiplication ou leur survie), seuls compatibles sur l'ensemble des surfaces de l'hôte alors que les isolats avirulents restent cantonnés aux variétés sensibles. Dès que la variété résistante contribue à transmettre des descendants pour l'épidémie de la saison suivante, la fréquence des individus virulents va alors augmenter dans la population régionale. En conséquence, ce changement de composition de la population entraînera la perte d'efficacité de la résistance utilisée vis à vis de la population modifiée. Il est à noter que la résistance reste toujours pleinement efficace vis à vis des individus avirulents, mais est inefficace vis à vis des individus virulents. Chez le colza, plusieurs "contournements" avec perte d'efficacité des résistances conférées par les gènes correspondants ont été décrits : ceux de *Rlm1* et *LepR3* en situation de production (Li *et al.*, 2003 ; Rouxel *et al.*, 2003 ; Sprague *et al.*, 2006), ceux de *Rlm6* (Brun *et al.*, 2000) et de *Rlm7* (Daverdin, 2011) sur des parcelles expérimentales. Des variétés comportant le gène *Rlm7* ayant été commercialisées en France depuis 2007, la composition des populations fait actuellement l'objet d'un suivi par le CETIOM (Pinochet, 2011).

Lorsqu'une résistance quantitative est efficace, tous les individus de la population pathogène sont compatibles, mais se trouvent affectés dans leur cycle de vie ce qui ralentit les épidémies. Les résistances quantitatives vis à vis des champignons agissent généralement en réduisant l'efficacité d'infection des spores, en allongeant la période de latence, et/ou en réduisant le taux de sporulation des lésions. Il est à noter que les résistances quantitatives connues vis à vis du phoma n'agissent pas ou peu sur ces premières étapes du cycle de vie, mais modifient la progression systémique du champignon dans la plante.

Pour le contournement des résistances quantitatives on parle d'érosion en raison du caractère progressif du phénomène. En effet, s'il existe dans la population des individus plus agressifs qui sont moins affectés dans leur croissance et donc leur cycle de vie, leur succès reproducteur sera supérieur à la moyenne des individus ce qui contribuera à leur augmentation en fréquence au cours des générations. Cependant, cette augmentation du niveau moyen d'agressivité sera plus lente que pour les résistances qualitatives du fait du contrôle polygénique du caractère d'agressivité et du fait que les individus moins agressifs ne sont pas immédiatement éliminés de la population. Le risque d'érosion des résistances quantitatives vis-à-vis du phoma est en cours d'étude (Hortense Brun, communication personnelle) mais n'a pas à ce jour été démontré. En effet, lorsque le niveau de résistance au champ des variétés diminue au cours du temps (Salisbury *et al.*, 1995 ; Sprague *et al.*, 2006) en l'absence de caractérisation détaillée du déterminisme génétique des résistances dans les variétés, il y a confusion possible entre contournement des composantes qualitatives de résistance et réelle érosion de l'efficacité des résistances quantitatives.

Il est possible d'associer plusieurs résistances dans une même variété. Sur placettes expérimentales, une population du champignon exposée à la sélection récurrente par une variété cumulant résistance quantitative et résistance qualitative ne s'adapte pas aussi vite que lorsque seule la résistance qualitative est présente dans la variété, la résistance quantitative permettant de limiter l'amplification des individus virulents (Brun *et al.*, 2010).

## **2. En quoi la gestion durable des résistances dépend-elle du développement des épidémies fongiques et peut-elle être infléchie par la création variétale chez la plante ?**

Le fait que la vitesse d'adaptation des populations pathogènes dépende de la construction génétique utilisée offre des perspectives en termes de stratégies de gestion durable des résistances. Développer de telles stratégies nécessite d'explicitier ce que sont les stratégies de gestion durable et comment la création variétale peut y contribuer en agissant sur les épidémies.

### *2.1 Qu'est-ce que les stratégies de gestion durable des résistances dans l'agro-écosystème ?*

La perte d'efficacité (aussi appelée "contournement") des gènes de résistance dans les variétés lors de leur utilisation à large échelle en culture est liée à l'invasion de la population régionale par les individus virulents correspondants pour les résistances qualitatives ou agressifs pour les résistances quantitatives. Ceci implique (i) l'apparition d'individus virulents ou agressifs, (ii) la production de descendants par ces individus et (iii) la contribution de ces descendants à l'inoculum de la saison suivante. Les stratégies de gestion durable se proposent de ralentir l'adaptation de la population pathogène régionale en agissant sur ces trois mécanismes, en réduisant la quantité de maladie sur la parcelle, la production d'inoculum sur la parcelle et la transmission de descendants entre parcelles de deux années successives. Ceci peut passer à la fois par la création variétale et par le déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques (Hossard *et al.*, 2010). Pour éviter les contresens sur la contribution possible de la génétique, il est cependant nécessaire de revenir sur le concept de "résistance durable" avant d'aborder l'articulation entre la création variétale et la gestion durable des résistances.

Clarifiant la terminologie en complétant les définitions antérieures, Johnson (1984) a écrit en insistant sur la nature descriptive du terme "Durable resistance to a disease is resistance that remains effective during its prolonged and widespread use in an environment favourable to disease" que nous traduisons par "La

résistance durable à une maladie est une résistance qui reste efficace pendant son utilisation prolongée et à large échelle dans un environnement favorable à la maladie". Au cœur même de cette définition est gravé le fait que la durabilité est le résultat de l'interaction dans le temps et dans l'espace entre la plante, l'agent pathogène, l'environnement et l'homme. Par essence, ceci rend le concept complexe et interdisciplinaire. Devant une telle complexité, la mise en application pratique du concept de durabilité des résistances a été tentée par simplification, en excluant l'un des partenaires (la plante, l'agent pathogène, l'environnement ou l'homme), l'une des dimensions (le temps ou l'espace) ou l'une des perspectives (*a priori* avant la mise en interaction ou *a posteriori* après qu'elle a été réalisée). Selon les disciplines scientifiques, les objectifs ou l'accès à l'information qui changea au cours du temps, les recherches sur la "résistance durable" suivirent plusieurs chemins. Les épidémiologistes tentèrent de définir des indicateurs (van den Bosch et Gilligan, 2003). Assurément, l'utilisation du concept de résistance durable favorisa les interactions interdisciplinaires. Parmi les réalisations, les généticiens, les épidémiologistes et les phytopathologistes ont travaillé ensemble pour comparer l'évolution de l'efficacité de différentes constructions génétiques dans le temps (Brun *et al.*, 2010) ou pour identifier des indicateurs de durabilité potentielle (Leach *et al.*, 2001 ; Janzac *et al.*, 2009). Ils établirent le contact avec la génétique des populations par la prise en compte du potentiel évolutif des agents pathogènes (McDonald et Linde, 2002). Par la conception des systèmes de culture, ils se dirigèrent vers les agronomes pour qui ce fut l'occasion d'approcher la génétique des populations et l'adaptation (Aubertot *et al.*, 2006 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2010). Enfin, l'ensemble des sciences biologiques se mit en chemin vers les sciences sociales (Hossard *et al.*, 2010).

En mettant bout à bout les résultats des recherches précédentes, les différents chemins un temps séparés convergent maintenant de nouveau. Il apparaît nécessaire et devient envisageable de réintroduire de plus en plus de la complexité initiale mais l'utilisation du concept de résistance durable devient actuellement confuse en raison de deux sources d'ambiguïtés. La première ambiguïté tient à la notion d'efficacité. La notion d'efficacité lie la résistance en soi à l'utilisation par l'homme. Ceci impliquerait de toujours décrire les seuils retenus pour considérer une résistance "efficace" ou "non efficace". Ceci impliquerait aussi de toujours caractériser l'écosystème agricole dans lequel la résistance a été utilisée. Ces deux points n'étant pas toujours explicités, la comparaison des résultats et la mise en relation des différents travaux s'avèrent compliquées. La seconde ambiguïté tient à l'emploi du même terme pour deux notions différentes. Lorsqu'on parle *a posteriori* de "résistance durable" il s'agit de la description d'un résultat unique – une réalisation du phénomène dans un contexte donné. Par analogie, quand on parle du rendement obtenu pour une variété sur une parcelle donnée une année donnée, c'est bien d'un chiffre unique dont il s'agit, exprimé en quintaux. Appliqué à la résistance, cet usage *a posteriori* peut par exemple servir pour comparer des géniteurs potentiels sur la base de la caractérisation de leurs performances passées (Johnson, 1984). Au contraire, lorsqu'on parle *a priori* de "résistance durable" il s'agit de l'espérance du phénomène et non d'un chiffre unique. Pour poursuivre l'analogie, lorsqu'on parle du rendement d'une variété *a priori*, il s'agit du rendement potentiel de la variété et chacun en déduit qu'il faut moduler la valeur issue d'essais multi locaux par le contexte pédo-climatique local et les pratiques culturales. Appliquer à la résistance cet usage *a priori* en le citant comme objectif à atteindre, par exemple "sélectionner des résistances durables", c'est oublier que les résistances ne sont pas "durables" en soi, mais relativement à un contexte. Cet usage *a priori* a été lié à la recherche d'une cause unique et générale à la durabilité malgré les mises en garde de Johnson qui insistait sur sa nature descriptive. Bien qu'elle soit attirante pour des raisons pratiques et malgré les tentatives répétées, la délimitation et l'évaluation d'une propriété de "durabilité" intrinsèque à la résistance se sont avérées vaines car il est impossible de s'abstraire simultanément de toutes les interactions.

En conséquence, il nous semble important pour la création variétale de réintroduire par le langage l'existence de ces interactions en parlant *a priori* non pas de "résistance durable" mais de "potentiel de

durabilité" au même titre que les agronomes parlent de "potentiel de rendement". Il est effectivement possible d'augmenter le potentiel de durabilité d'une variété mais la durabilité observée dépendra aussi des caractéristiques (agent pathogène, environnement, homme, temps et espace) de l'agro-écosystème dans lequel elle sera déployée. Ceci implique de comprendre les processus impliqués dans le potentiel de durabilité.

## 2.2 Comment augmenter le potentiel de durabilité des résistances en agissant sur les épidémies par création variétale ?

La résistance génétique est indéniablement une des tactiques contribuant à la protection des cultures. Comme il a été évoqué précédemment, l'adaptation des populations pathogènes ne dépend pas uniquement de la dynamique épidémique sur une parcelle pendant une saison, mais aussi d'une dynamique pluriannuelle incluant la transmission d'inoculum entre parcelles. Nous ne reviendrons pas sur le déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques qui a fait l'objet d'une revue récemment (Hossard *et al.*, 2010). Notre objet sera la contribution de la création variétale, parce qu'elle agit sur l'épidémiologie.

Les effets des résistances sur la réduction de sévérité des épidémies d'une saison sur une parcelle sont documentés dans l'expérimentation pluri-annuelle de Brun *et al.* (2010) ayant suivi un dispositif pluri-annuel de parcelles expérimentales. Le dispositif comprenait chaque année 4 essais comparables, distants les uns des autres pour éviter les contaminations croisées et recevant chacun un inoculum sélectionné de manière récurrente sur des génotypes différents résistants ou sensibles. La quantification de la sévérité de la maladie sur ces mêmes génotypes semés dans chacun des 4 essais a permis d'évaluer l'efficacité des résistances face aux différentes populations sélectionnées du champignon. Pour l'année initiale (2003) où chacun des lieux a reçu le même inoculum local, on observe en comparant pour un même lieu Eurol et Darmor que la résistance quantitative réduit la sévérité de la maladie, mais moins que la résistance qualitative conférée par *Rlm6* (Tableau 1). Au cours des années, on constate l'adaptation de la population virulente sélectionnée de manière récurrente sur Eurol/*Rlm6*, ce qui se traduit dans ce lieu par une sévérité de maladie sur Eurol/*Rlm6* qui est non différente de celle sur Eurol, sévérité qui s'accroît rapidement au cours du temps (Figure 3). Au contraire, sur la même durée lorsque l'inoculum virulent est sélectionné de manière récurrente sur la variété Darmor/*Rlm6* cumulant les deux types de résistance, la sévérité de la maladie reste faible. Ces résultats questionnent l'épidémiologie afin de comprendre les processus impliqués dans le ralentissement de l'adaptation des populations, en lien avec la récurrence des épidémies.

Variété réceptrice	Note G2 – 2003
Eurol	7,64 A
Darmor	3,67 B
Eurol <i>Rlm6</i>	0,70 C
Darmor <i>Rlm6</i>	0,39 C

Tableau 1 : Sévérité de la nécrose au collet en 2003 (note G2) sur les variétés Eurol (sensible), Darmor (résistance quantitative), Eurol/*Rlm6* (résistance qualitative) et Darmor/*Rlm6* (résistance quantitative + résistance qualitative) dans le lieu où l'inoculum récurrent sera Eurol. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test NSK,  $\alpha=5\%$ ) (Adapté d'après Brun *et al.*, 2010).

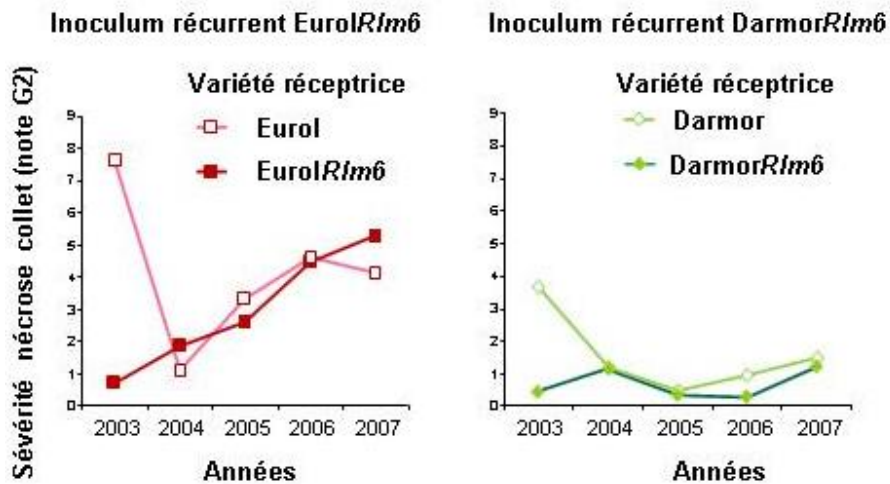


Figure 3 : Evolution de la sévérité de la nécrose au collet au cours des années de sélection récurrente par différentes variétés en parcelles expérimentales. Dans des lieux indépendants, les mêmes variétés EuroI (sensible), Darmor (résistance quantitative), EuroI Rlm6 (résistance qualitative) et Darmor Rlm6 (résistance quantitative + résistance qualitative) sont exposées chaque année à des inoculums récurrents différents exprimant la résistance qualitative conférée par le gène *Rlm6* associé à un niveau de résistance quantitative (Darmor Rlm6) ou non (EuroI Rlm6) (Adapté d'après Brun *et al.*, 2010).

Dans le même temps, il a été montré que réduire la transmission d'inoculum par action directe – enfouissement des résidus – peut ralentir la vitesse d'adaptation des populations (Daverdin, 2011). En utilisant de manière récurrente en parcelles expérimentales une variété comportant la résistance qualitative *Rlm7*, l'adaptation de la population du champignon a été observée lorsque les résidus étaient laissés à la surface (sans travail du sol) entre deux saisons culturales, mais cette adaptation n'a pas été obtenue lorsque la transmission d'inoculum est réduite par enfouissement des résidus.

Un même résultat – le ralentissement de l'adaptation – peut donc être obtenu par action directe à l'aide de pratiques culturales (Daverdin, 2011) et par association avec une résistance quantitative (Brun *et al.*, 2010). Faire ce rapprochement amène à se demander en quoi la résistance des plantes influence la transmission d'inoculum.

### 3. Que connaît-on des processus impliqués dans la récurrence interannuelle des épidémies de phoma ?

Aborder les processus de l'épidémiologie pendant la saison culturale en termes de production d'inoculum pour la saison suivante, caractériser les vecteurs – types de spores, de mycélium ou de tissus hôtes contaminés – intervenant dans la transmission et leurs propriétés est indispensable à une approche pluriannuelle de la protection des cultures. Le phoma du colza représente de ce point de vue un modèle approprié d'étude de l'interaction entre résistance et production d'inoculum.



### 3.1 La sévérité de la maladie à l'issue d'une saison culturale conditionne le potentiel de production d'inoculum

Chez *L. maculans*, la production d'inoculum pour la saison n+1 se fait sur les résidus de culture de la saison n. La relation croissante entre sévérité des nécroses et production d'inoculum a été quantifiée par dénombrement des pseudothèces obtenus après incubation en conditions naturelles de résidus (Figure 4 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2009).

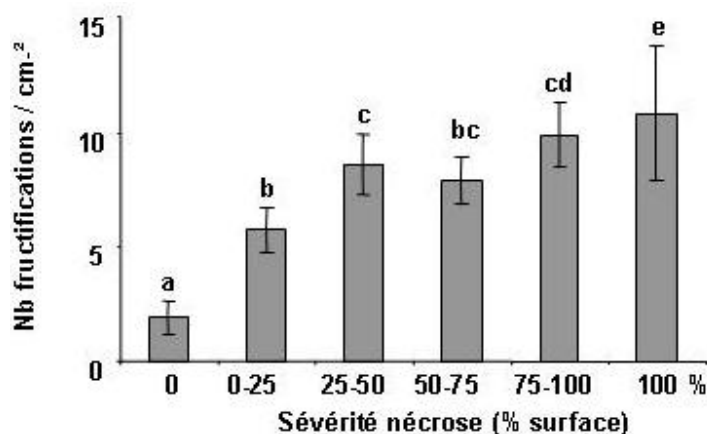


Figure 4 : Nombre de pseudothèces de *L. maculans* par cm<sup>2</sup> de résidu de colza d'hiver en fonction de la sévérité des nécroses à la récolte (surface nécrosée en section transversale). Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les histogrammes surmontés de lettres différentes sont significativement différents (Adapté d'après Lô-Pelzer *et al.*, 2009).

Ces résultats indiquent que le niveau de maladie de l'année précédente peut être utilisé pour prédire l'inoculum primaire disponible pour l'initiation du cycle épidémique suivant. Dans ces expérimentations, le nombre de fructifications dénombrées sur la variété à résistance quantitative n'était pas significativement différent de celui sur variété sensible, à classe de sévérité égale. Cependant, la distribution de la sévérité des nécroses est réduite en présence de résistance quantitative (Brun *et al.*, 2010).

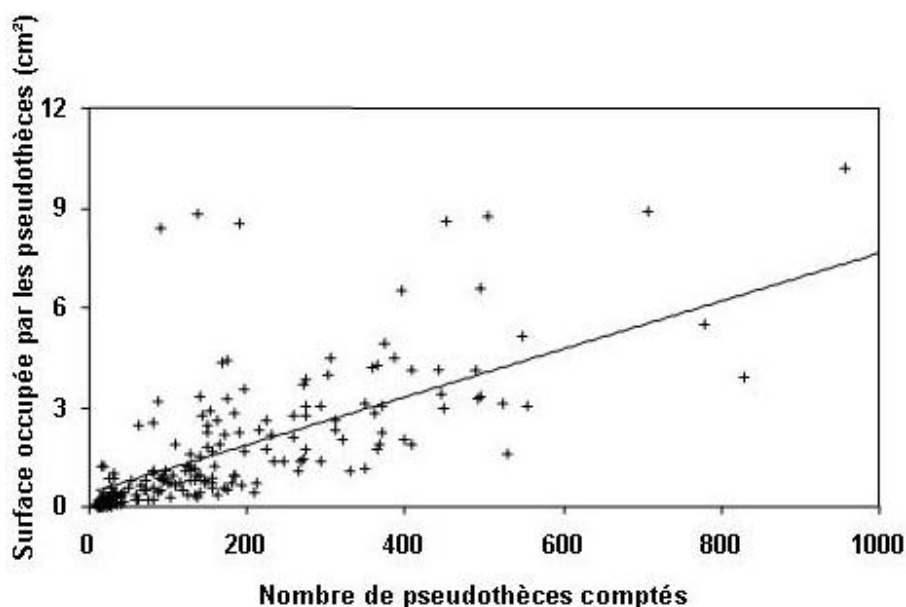


Figure 5 : Relation entre le nombre de pseudothèces comptés et l'évaluation de la surface occupée par les pseudothèces (coefficient de corrélation  $R^2=71\%$ ). Quantification réalisée sur 180 résidus représentant une gamme de sévérité de nécroses, incubés en conditions naturelles (Adapté d'après Lô-Pelzer *et al.* 2009).

Utiliser les résistances quantitatives permet donc non seulement de réduire les dégâts lors de l'épidémie d'une année, mais également de limiter la transmission des épidémies entre saisons culturales. Ceci a été confirmé par des simulations incluant plusieurs itinéraires techniques (Lô-Pelzer *et al.*, 2010).

Le temps nécessaire au dénombrement exhaustif des fructifications sous loupe binoculaire peut constituer un frein à l'évaluation des variétés sur ce critère. Néanmoins, il a été montré qu'une estimation peut être obtenue en quantifiant la surface occupée par les fructifications, techniquement plus simple et moins coûteux en temps (Figure 5 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2009) ce qui ouvre la possibilité de caractériser les variétés pour ce critère.

### 3.2 La phase systémique est-elle un facteur limitant l'accès au collet, site de production d'inoculum ?

Chez *L. maculans*, la production d'inoculum pour la saison n+1 dépend du succès de la progression systémique du mycélium depuis les feuilles (portant les sites d'infection) jusqu'au collet (site de la production d'inoculum) des plantes de colza. En conditions naturelles, la sévérité des nécroses – et donc la présence du champignon dans la tige du colza – est réduite par la résistance quantitative de l'hôte. Ce processus a été simulé en conditions contrôlées (Figure 6 ; Travadon *et al.*, 2009). L'amplification des sites d'infection – qui pourrait se produire en conditions naturelles du fait des contaminations secondaires sur une même plante – a été simulée en conditions contrôlées par l'augmentation du nombre de sites d'infection sur cotylédons et augmente la sévérité des nécroses (Figure 6 ; Travadon *et al.*, 2009).

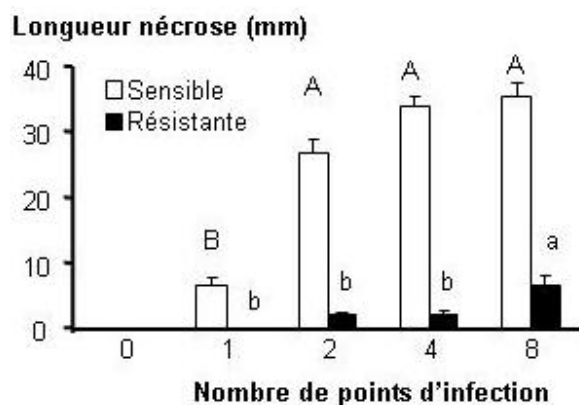


Figure 6 : Longueur des nécroses externes au collet de plantules en fonction du niveau de résistance quantitative de la lignée utilisée et du nombre de points d'infection. Les plantules cultivées en conditions contrôlées ont d'abord été inoculées par dépôt de gouttelettes de suspension de spores après blessure, puis vernalisées et remises à 20°C. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. Les histogrammes surmontés de lettres différentes sont significativement différents (Adapté d'après Travadon *et al.*, 2009).

Ces résultats indiquent que l'accès des individus à la reproduction sexuée (conditionné par la phase systémique) pourrait être limitant en petites populations. Ceci ouvre la perspective théorique d'utiliser la résistance quantitative pour limiter la production de descendants par reproduction sexuée. Cependant avant la mise en application pratique, il sera nécessaire de caractériser plus finement les conditions d'expression de la résistance quantitative, par exemple en fonction de la taille de la population au champ ou des conditions de température et de mesurer l'intensité de la reproduction sexuée chez le champignon.

### 3.3 En l'absence d'ascospores, les conidies comme vecteur potentiel de transmission ?

Réduire la production d'ascospores sera-t-il suffisant ? Limiter la transmission d'inoculum entre saisons culturales implique de déterminer les vecteurs de transmission possibles. Il a été établi qu'en présence d'ascospores produites sur les résidus de culture, leur dispersion par le vent assure la contamination des parcelles de l'année suivante (Marcroft *et al.*, 2004). Cependant, la production d'ascospores implique la rencontre (sur une même plante) d'individus de types sexuels opposés car le champignon est hétérothallique. Lorsque peu d'ascospores sont compatibles sur une variété (par exemple en présence d'une résistance efficace) cette rencontre peut ne pas se produire et devenir un facteur limitant. Dans ce cas, la transmission de la maladie pourrait se faire *via* les conidies qui sont produites par un individu même en l'absence de partenaire. Le mécanisme de dispersion des conidies par la pluie à partir de macules et de résidus a été démontré et quantifié sous simulateur de pluie (Figure 7 ; Travadon *et al.*, 2007).

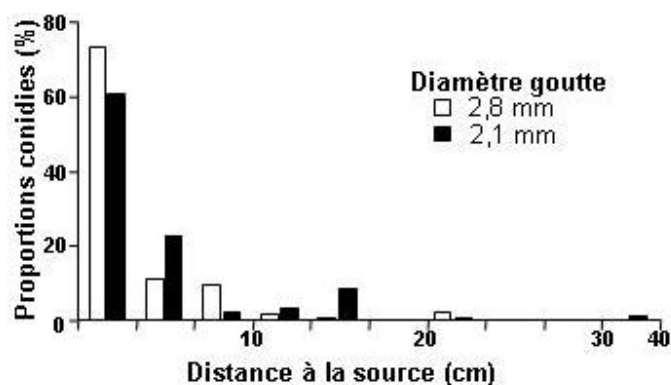


Figure 7 : Proportion des conidies dans les gouttelettes d'éclaboussure en fonction de la distance à la source après l'impact de 15 gouttes incidentes de deux diamètres (2.8 mm et 2.1 mm) tombant d'une hauteur de 1 m (Adapté d'après Travadon *et al.* 2007).

L'initiation d'épidémies de phoma à partir de résidus porteurs uniquement de pycnides – et donc en l'absence de reproduction sexuée – a été obtenue au champ où les conidies libérées à partir de résidus porteurs de pycnides ont permis l'apparition de la maladie sous forme de macules foliaires sur des plantes proches, puis de nécroses au collet des plantes (Travadon *et al.*, 2007 ; Colonges, 2009). Il faut cependant souligner que ce processus ne permet la dispersion des conidies qu'à courte distance. De plus, la réalisation au champ d'expérimentations de ce type a échoué lors des automnes 2003 et 2004 ce qui laisse supposer ces années-là une inadéquation entre les périodes de maturité des conidies, de sensibilité des plantes, d'évènements pluvieux et de périodes propices à l'incubation (Bousset, résultats non publiés).

L'ensemble de ces résultats illustre que la création variétale n'influence pas seulement l'épidémie d'une saison sur une parcelle, mais doit être prise en compte de manière plus large dans l'élaboration des stratégies de gestion durable de la protection des cultures en associant plusieurs méthodes de lutte (Hossard *et al.*, 2010 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2010). Cependant, si l'élaboration des stratégies peut se faire par modélisation sur des scénarios, leur mise en œuvre concrète dépendra de la capacité à caractériser précisément l'expression des résistances dans les variétés créées, quel que soit leur niveau d'efficacité et quelles que soient les combinaisons produites.

#### 4. Que sait-on caractériser des résistances présentes dans les variétés de colza ?

Les résistances qualitatives contre *L. maculans* s'expriment dès le stade cotylédonaire, ce qui permet d'identifier les gènes de résistance présents dans une plante par des tests d'inoculations au stade cotylédonaire (Williams et Delwiche, 1979) en conditions contrôlées avec un set différentiel de souches de *L. maculans* présentant différents gènes d'avirulence. Au champ, la résistance qualitative d'une variété va être plus ou moins efficace en fonction de la fréquence du gène d'avirulence correspondant dans la population locale de *L. maculans*. La présence d'une résistance qualitative efficace, c'est-à-dire contrôlant une très large majorité des individus de la population de phoma sera révélée par l'absence de macules sur les feuilles.

La résistance quantitative est actuellement évaluée par la note G2 au champ en conditions de contamination renforcées. La note G2, développée par Pierre et Régnault (1982) puis modifiée par Aubertot *et al.* (2004), correspond à un indice de maladie calculé à partir du nombre de plantes réparties dans les différentes classes de sévérité de symptôme (pourcentages de section de tige nécrosée au niveau du collet). Cette note est utilisée en routine pour l'évaluation du niveau de résistance des plantes au champ. Cependant, lorsqu'une variété porte un gène de résistance spécifique efficace, celui-ci prévient la formation de macules sur les feuilles et donc l'entrée du champignon dans la plante et par voie de conséquence empêche l'apparition de la nécrose du collet. Il n'est alors plus possible dans ce cas, d'évaluer le niveau de résistance quantitative présent dans cette variété par un test au champ.

Dans ce contexte, nous avons testé différentes techniques d'évaluation en conditions contrôlées pour étudier le comportement de quelques génotypes de colza connus pour leur niveau de résistance quantitative au champ. Nous avons montré que le test « Inoculation sur pétiole » est le plus discriminant. Il a donc été mis en œuvre sur une gamme plus large de génotypes. Le classement de leurs moyennes correspond globalement au classement attendu d'après les niveaux de résistance quantitative observés au champ (Figure 8 et Tableau 2) avec cependant une variabilité intra-génotype importante et des écarts de comportement observés entre ce test pétiole et l'évaluation au champ pour quelques génotypes (ex : Capitol). L'utilisation de souches virulentes sur les variétés portant le gène *Rlm1* permet de mettre en évidence le niveau de résistance quantitative présent dans ces variétés (Figure 8).

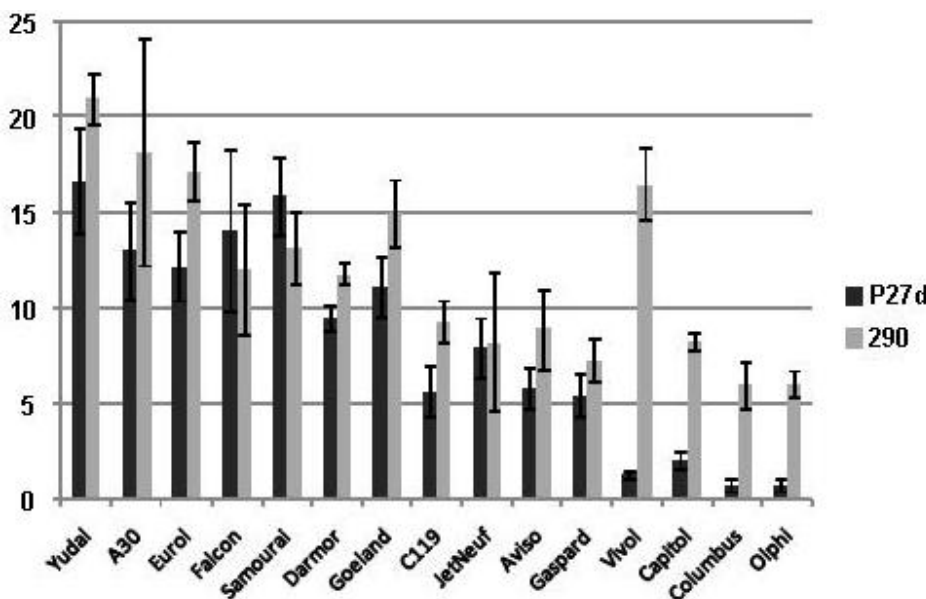


Figure 8 : Longueur de nécrose interne (en mm) mesurée dans la tige à 62 jours après inoculation sur pétiole à l'aide de deux souches (290 et P27d) de *L. maculans*. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% autour de la moyenne. Les variétés portant le gène *Rlm1* (Vivol, Capitol, Columbus, Olphi) montrent un comportement bien différentiel par rapport aux deux souches en fonction de la présence (P27d) ou de l'absence (290) de l'allèle d'avirulence *ArvLm1*.

Génotype	Note G2 *
Yudal	7,13 A
A30	5,22 B
Eurol	2,79 C
Capitol	2,63 CD
Falcon	2,30 CDE
Samourai	2,21 CDE
Vivol	1,94 DEF
Darmor	1,56 EFG
Goeland	1,44 FGH
C119	1,19 FGHI
Columbus	1,25 FGHI
JetNeuf	0,97 GHIJ
Aviso	0,94 GHIJ
Olphi	0,78 GHIJ
Gaspard	0,54 IJ

Tableau 2 : Note G2 obtenue au champ en 2006 pour les différents génotypes étudiés. \* les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes (Test DUNCAN,  $\alpha=5\%$  réalisé sur 17 génotypes).

### Conclusion : l'utilisation de la résistance pour la protection durable des cultures

L'ensemble de ces résultats amènent à reconsidérer le lien entre les résistances variétales et l'élaboration des stratégies de protection des cultures.

Le premier point est que le recours aux résistances génétiques de la plante est une des tactiques sur laquelle se baser. Cependant, elle ne doit pas être considérée comme indépendante de l'utilisation qui sera faite des variétés dans un agro-écosystème donné. C'est pourquoi tant que la mise en confrontation ne n'est pas produite, parler de "potentiel de durabilité" est plus précis que de "résistance durable". Ceci permet de fixer à la création variétale l'objectif atteignable "d'augmenter le potentiel de durabilité des variétés" plutôt que celui flou de "sélectionner pour des résistances durables".

Le second point est que la contribution de la génétique peut être vue en interaction avec d'autres tactiques, par exemple les pratiques culturales sur la parcelle (Daverdin, 2011) ou le déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques dans l'agro-écosystème (Hossard *et al.*, 2010). Comprendre les processus du cycle de vie du champignon en incluant la transmission entre années et entre parcelles permet de relier les tactiques différentes par leurs effets sur le développement des épidémies, ce qui permet d'espérer exploiter plus largement le potentiel de la création variétale. L'ensemble de ces résultats rend possible d'une part la modélisation pluriannuelle de la transmission des populations de phoma même petites, et d'autre part une meilleure caractérisation des niveaux de résistance quantitative, et la compréhension de ses conséquences épidémiologiques.

Le troisième point est que la mise en œuvre concrète des stratégies dépend de la capacité à mesurer précisément les caractéristiques des variétés. Le développement d'un test applicable en conditions contrôlées constitue une avancée vers la quantification du niveau d'expression des résistances quantitatives, sous réserve d'améliorer sa précision. Le développement d'une méthode d'estimation du potentiel de production d'inoculum par mesure de surface rend possible de caractériser les variétés sur ce caractère, en vue de les sélectionner si une variabilité existe. La compréhension des processus reliant le potentiel de production d'inoculum à l'expression de la résistance quantitative permettra d'affiner les caractérisations.

## Remerciements

Magali Ermel, Henri Miteul, Patrick Vallée, Claude Domin, Hervé Picault sont remerciés pour leur aide technique. Ces travaux ont bénéficié du soutien de l'INRA département SPE, du Ministère de l'Agriculture convention C05/02 61.21.43 et de l'ANR programme « Agriculture et Développement Durable », contrat « ANR-05-PADD-05, CEDRE ».

## Références bibliographiques

- Agrios G., 2005. Plant Pathology (5<sup>th</sup> edition). Elsevier-Academic Press, San Diego, USA.
- Ansan-Melayah D., Balesdent M.H., Delourme R., Pilet M.L., Tanguy X., Renard M., Rouxel T., 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. Plant Breeding 117, 373-378.
- Aubertot J.N., Schott J.J., Penaud A., Brun H., Doré T., 2004. Methods for sampling and assessment in relation to the spatial pattern of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*) in oilseed rape. European Journal of Plant Pathology 110, 183-192.
- Aubertot J.N., West J.S., Bousset-Vaslin L., Salam M.U., Barbetti M.J., Diggle A.J., 2006. Improved resistance management for durable disease control: A case study of phoma stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). European Journal of Plant Pathology 114, 91-106.
- Brun H., Chèvre A.M., Fitt B.D.L., Powers S., Besnard A.L., Ermel M., Huteau V., Marquer B., Eber F., Renard M., Andrivon D., 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. New Phytologist 185, 285-299.
- Brun H., Levivier S., Ruer D., Somda I., Chèvre A.M., Renard M., 2000. A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans/Brassica napus* pathosystem. Phytopathology 90, 961-966.
- Colonges T., 2009. Initiation et caractérisation d'épidémies induites par les ascospores et les conidies de *Leptosphaeria maculans* sur le colza. Rapport Master 2, Agrocampus Rennes.
- Daverdin G., 2011. Evolution moléculaire sous pression de sélection et implication dans la reconnaissance AvrLm3/Rlm3 du gène d'avirulence AvrLm4-7 chez *Leptosphaeria maculans*. Thèse de doctorat Université Paris XI Orsay.
- Delourme R., Chèvre A.M., Brun H., Rouxel T., Balesdent M.H., Rimmer R., Salisbury., 2006. Major genes and polygenic resistance to *L. maculans* in oilseed rape. European Journal of Plant Pathology 114, 41-52.
- Hossard L., Lannou C., Papaix J., Monod H., Lô-Pezler E., Souchère V., Jeuffroy M.H., 2010. Quel déploiement spatio-temporel des variétés et des itinéraires techniques pour accroître la durabilité des résistances variétales ? Innovations Agronomiques 8, 15-33
- Janzac B., Fabre F., Palloix A., Moury B., 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. Molecular Plant Pathology 10, 599-610.
- Johnson R., 1984. A critical analysis of durable resistance. Annual Review of Phytopathology 22, 309-330.
- Leach J.E., Vera Cruz C.M., Bai J., Leung H., 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. Annual Review of Phytopathology 39, 187-224.
- Li H., Sivasithamparam K., Barbetti M.J., 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* ssp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. Plant Disease 87, 752.
- Lô-Pelzer E., Aubertot J.N., David O., Jeuffroy M.H., Bousset L., 2009. Relationship between severity of blackleg (*Leptosphaeria maculans/L. biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. Plant Pathology 58, 61-70.
- Lô-Pelzer E., Bousset L., Jeuffroy M.H., Salam M.U., Pinochet X., Boillot M., Aubertot J.N., 2010. SIPPOM-WOSR: A simulator for integrated pathogen population management of phoma stem canker on

winter oilseed rape. I. Description of the model. *Field Crops Research* 118, 73-81.

Marcroft S.J., Sprague S.J., Pymer S.J., Salisbury P.A., Howlett B.J., 2004. Crop isolation, not extended rotation length, reduces blackleg (*Leptosphaeria maculans*) severity of canola (*Brassica napus*) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 601-606.

McDonald B.A., Linde C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.

Mendes-Pereira E., Balesdent M.H., Brun H., Rouxel T., 2003. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans* - *L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* 107, 1287-1304.

Pierre J.G., Regnault Y., 1982. Contribution à la mise au point d'une méthode de plein champ destinée à mesurer la sensibilité des variétés de colza au phoma. *Informations Techniques CETIOM* 81, 3-18.

Pinochet X., 2011 *Le point sur le phoma*. Editions Quae (à paraître en 2011).

Rouxel T, Penaud A., Jain L., Pinochet X., Brun H., Gout L., Delourme R., Schmit J., Balesdent M.H., 2003. A ten-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* 109, 871-881.

Salisbury P.A., Ballinger D.J., Wratten N., Plummer K.M., Howlett B.J., 1995. Blackleg disease on oilseed *Brassica* species in Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35, 665-672.

Sprague S.J., Balesdent M., Brun H., Hayden H.L., Marcroft S.J., Pinochet X., Rouxel T., Howlett B.J., 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* 114, 33-40.

Stoate C., Báldi A., Beja P., Boatman N.D., Herzog I., van Doorn A., de Snoo G.R., Rakosy L., Ramwell C., 2009. Ecological impacts of early 21<sup>st</sup> century agricultural change in Europe – a review. *Journal of Environmental Management* 91, 22-46.

Stukenbrock E.H., McDonald B.A., 2008. The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 46, 75–100.

Travadon R., Bousset L., Saint-Jean S., Brun H., Sache I., 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* 56, 595-603.

Travadon R., Marquer B., Ribule A., Sache I., Masson J.P., Brun H., Delourme R., Bousset L., 2009. Systemic growth of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to hypocotyls in oilseed rape: influence of number of infection sites, competitive growth and host polygenic resistance. *Plant Pathology* 58, 461-469.

van den Bosch F., Gilligan C.A., 2003. Measures of durability of resistance. *Phytopathology* 93, 616-625.

Williams P.H. Delwiche P.A. 1979. Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. *Eucarpia 'Cruciferae 1979' Conference*. Wageningen, pp. 164-170.