



**HAL**  
open science

## Méthodes de lutte contre les *Phytophthora* en cultures maraîchères : quel apport des core-collections microbiennes dans un processus de sélection ?

Marie-Line Kuhn, Anne Massire, Melissa Cantet, Rene Damidaux, Elvina Gibowski, Youna Ruellan, Véronique Lefebvre, Franck Panabières

### ► To cite this version:

Marie-Line Kuhn, Anne Massire, Melissa Cantet, Rene Damidaux, Elvina Gibowski, et al.. Méthodes de lutte contre les *Phytophthora* en cultures maraîchères : quel apport des core-collections microbiennes dans un processus de sélection ?. *Innovations Agronomiques*, 2013, 27, pp.47-58. hal-02642876

**HAL Id: hal-02642876**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02642876>**

Submitted on 28 May 2020

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

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



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

## Méthodes de lutte contre les *Phytophthora* en cultures maraîchères : quel apport des core-collections microbiennes dans un processus de sélection?

Kuhn M.L.<sup>1\*</sup>, Massire A.<sup>2\*</sup>, Cantet M.<sup>2</sup>, Damidaux R.<sup>2</sup>, Gibowski E.<sup>1</sup>, Ruellan Y.<sup>2</sup>, Lefebvre V.<sup>2†</sup>, Panabières F.<sup>1†</sup>

1 : UMR INRA/CNRS/UNS 1355 Institut Sophia Agrobiotech, 400 route des Chappes, 06903 Sophia-Antipolis

2 : INRA, UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine St Maurice, Allée des Chênes, BP 94, 84143 Montfavet cedex

\* : co-premiers auteurs

† : co-derniers auteurs

### Résumé

Parmi les Solanacées maraîchères, le piment et la tomate sont confrontés aux attaques de nombreux agents pathogènes, dont *Phytophthora capsici* et *Phytophthora infestans*. Des gènes majeurs de résistance ont été identifiés chez la tomate vis-à-vis de *P. infestans*, et sont fréquemment contournés par des populations virulentes. La résistance du piment à l'égard de *P. capsici* est conférée par des locus à effet quantitatif (QTL). Pour exploiter efficacement ces résistances quantitatives en sélection variétale, il est nécessaire d'évaluer leur spectre d'action pour prédire leur durabilité. Cette démarche nécessite une bonne connaissance de la diversité des populations pathogènes et de leurs capacités évolutives. La constitution de core-collections représentatives de la diversité intraspécifique de *Phytophthora* pourrait constituer un outil particulièrement utile pour évaluer a priori la durabilité des résistances variétales. Les résultats des recherches menées à l'INRA révèlent les limites de cette stratégie : elle est utilisable dans un contexte local, exige une bonne connaissance des populations d'agents pathogènes, dépend largement des propriétés épidémiologiques des espèces étudiées, et repose sur la mise en place de protocoles éprouvés de conservation des souches.

**Mots-clés** : Résistance, *Phytophthora* spp, piment, tomate, core-collection microbienne, sélection.

### Abstract: Methods for controlling *Phytophthora* in vegetable crops: inputs from microbial core collection in the plant breeding process

Among Solanaceous crops, pepper and tomato are damaged by numerous pathogens, including *Phytophthora capsici* and *Phytophthora infestans*. Major genes have been identified in tomato to confer resistance against *P. infestans*, which were rapidly overcome by virulent populations. Pepper resistance towards *P. capsici* is provided by several quantitative trait loci (QTLs). Efficient exploitation of these polygenic resistance sources in plant breeding requires a good evaluation of their spectrum and durability. This implies a precise knowledge of the genetic and pathogenic diversity of pathogen populations and their adaptive potential. In this context, the establishment of core-collections that would reflect the overall intraspecific diversity of *Phytophthora* spp. would be useful to assess the a priori durability of resistance sources. The results of the research conducted at INRA reveal the limitations of such a strategy: it may be efficiently developed only locally, requires more knowledge on the structure and epidemiological characteristics of natural pathogen populations, and mainly relies on robust strain storage protocols.

**Keywords**: Resistance, *Phytophthora* spp., pepper, tomato, microbe core-collection, plant breeding.

Christian 28/1/13 08:56

Commentaire [1]: Limitations or downsides?

## Introduction

Fléaux des principales cultures agricoles et des forêts, les maladies à Oomycètes ont un impact agronomique considérable au niveau mondial. Pourtant, elles sont dues à un nombre limité d'agents pathogènes, dont *Phytophthora* (Erwin et Ribeiro, 1996). Ce genre regroupe 100 espèces différant par leur physiologie et leur spectre d'hôtes. *P. infestans*, pathogène aérien, est responsable du mildiou de la pomme de terre et de la tomate. À l'inverse, certaines espèces telluriques comme *P. capsici* ou *P. parasitica* présentent des gammes d'hôtes beaucoup plus larges, intégrant la plupart des Solanacées maraîchères. Les bouleversements globaux découlant du changement climatique et de la généralisation des échanges mondiaux s'accompagnent d'une remise en cause de la gestion des maladies à *Phytophthora*. Ainsi, on assiste actuellement à la réémergence de certaines maladies précédemment maîtrisées, l'extension du spectre d'hôtes d'espèces connues ou l'apparition de nouvelles espèces de *Phytophthora*, voire d'hybrides interspécifiques à spectres d'hôte inédits.

La lutte contre *Phytophthora* repose essentiellement sur l'emploi de pesticides chimiques et l'utilisation de variétés résistantes dans un nombre limité de productions agricoles. La lutte chimique atteint ses limites, du fait de l'érosion de l'efficacité des molécules existantes et l'apparition de souches résistantes, dans un contexte général de réduction programmée de l'usage de produits phytosanitaires (EcoPhyto).

Les approches de résistance variétale à *Phytophthora* ont longtemps reposé sur l'utilisation de gènes majeurs notamment contre *P. infestans* (gènes *R1* à *R11* pour la pomme de terre, *Ph-1*, *Ph-2*, *Ph-3* pour la tomate), qui ont été rapidement contournés par l'apparition de populations virulentes. L'exploitation de résistances polygéniques peut constituer une stratégie plus durable, à condition de pouvoir évaluer correctement ces résistances en termes d'efficacité et de durabilité. Des résistances polygéniques à *P. infestans*, *P. capsici* et *P. parasitica* ont été décrites chez le piment et la tomate (Brouwer et al., 2004 ; Thabuis et al., 2003 ; Bonnet et al., 2007 ; Danan et al., 2011). Or, ces espèces présentent une grande diversité en termes de gamme d'hôtes, de structuration génétique, et de virulence/agressivité (Lacourt et al., 1994 ; Colas et al., 1998 ; Fry et al., 2009 ; Lamour et al., 2011).

L'évaluation de l'efficacité des locus de résistance implique donc leur confrontation à une gamme de souches représentative de cette variabilité. Pour des raisons pratiques, il importe que cette gamme, maximisant la diversité génétique et pathogénique de l'espèce ou des espèces abordées, comporte un nombre limité de souches. Cela conduit à définir la notion de core-collection microbienne, à l'instar de celle qui fut développée dans le cadre de ressources végétales par O. Frankel et A. Brown au milieu des années 1980 (Brown, 1989). Une core-collection microbienne représente en théorie un outil particulièrement utile dans une démarche de sélection variétale, à condition de pouvoir conserver l'intégrité génétique et pathogénique des souches qui la composent.

Les études menées par l'INRA et ses partenaires dans le cadre de l'appel d'offre CTPS « durabilité des résistances » ont permis d'aborder cette problématique sous différents angles d'attaque. L'objectif de cet article est de pointer les éléments susceptibles d'alimenter la réflexion nécessaire à la mise en place de core-collections microbiennes. Nous illustrerons cette réflexion par quelques résultats obtenus au cours de ce projet axé sur l'évaluation de résistances quantitatives chez le piment et la tomate à deux espèces de *Phytophthora*, *P. capsici* et *P. infestans*. Cela impliquait i) une bonne connaissance de la diversité génétique et de la structuration de ces espèces dans le contexte de ce projet; ii) la maîtrise de tests d'évaluation de la résistance ; iii) l'évaluation du pouvoir pathogène de *Phytophthora*; iv) une estimation réaliste des limitations d'une telle approche.

## 1 - Diversité et évolution des populations de *Phytophthora*

La structure des populations de *Phytophthora* résulte de nombreux paramètres, tels que l'origine géographique, le climat local et ses changements éventuels, les espèces végétales et variétés

présentes, l'activité humaine, ainsi que certains paramètres intrinsèques aux espèces étudiées, tels que le type de reproduction ou le niveau de spécificité parasitaire.

### 1-1 *P. capsici*

*P. capsici* est responsable d'attaques sur racines, mais également sur parties aériennes de nombreuses plantes, essentiellement cucurbitacées et solanacées (piment, tomate, aubergine).



**Figure 1:** Attaques de *P. capsici* sur piment. A: premiers symptômes de flétrissement (culture sous tunnel plastique); B: symptômes dans un champ de piment en Turquie; C: collet de d'un plant de poivron greffé contaminé par *P. capsici*. (Photos A et B: V. Lefebvre, Photo C: photothèque INRA).

A

B

C

Cette espèce, identifiée sur tous les continents, est capable de reproduction sexuée (formation d'oospores) et asexuée. *P. capsici* est une espèce hétérothallique. En conséquence, la reproduction sexuée requiert la présence simultanée de souches de type de compatibilité sexuelle (mating type ou MT) A1 et A2. Les oospores constituent une forme de conservation particulièrement résistante et persistante dans le sol. La reproduction sexuée a donc deux conséquences dans l'épidémiologie de *P. capsici*: elle peut générer une importante diversification génétique, et favorise la dissémination.

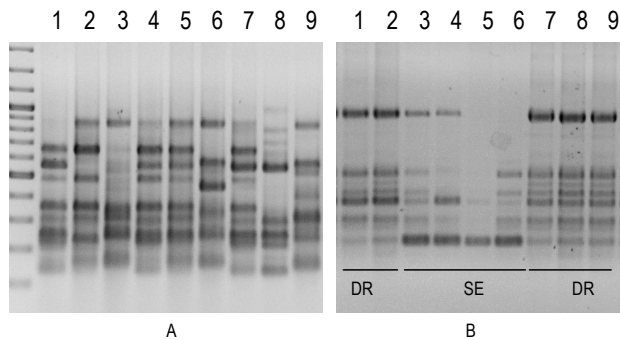
La structuration génétique de *P. capsici* varie d'une région à l'autre (Lamour *et al.*, 2011). Ainsi, on observe une importante diversité génétique aux USA et en Afrique du Sud, associée à la présence au champ de souches A1 et de souches A2 en proportions similaires, ce qui suggère un taux élevé de reproduction sexuée. Inversement, un mode de reproduction clonale et une faible diversité génétique semblent la situation dominante en Amérique du Sud. De telles observations sont à prendre en compte dans l'établissement de core-collections.

#### **Stabilité génétique de *P. capsici* dans les Bouches-du-Rhône**

Nous avons étudié la diversité génétique d'un échantillon de *P. capsici* (70 isolats), constitué de 3 lots distincts. Deux lots correspondent à des isolats collectés sur piment dans les Bouches-du-Rhône à 35 ans d'intervalle (1972-1975 et 2010). Le lot d'isolats "anciens", conservé depuis 1995 en azote liquide, contient un groupe de 5 souches de référence qui présentent des niveaux d'agressivité variés sur différentes variétés de poivron. Cette gamme de souches, élaborée par l'INRA d'Avignon est utilisée en routine, et a été précédemment distribuée à plusieurs sélectionneurs. Un troisième lot, regroupant des souches issues de plantes variées et isolées dans diverses régions du monde, apporte une dimension internationale à l'analyse. Ce lot comporte également des souches anciennes et des souches récentes.

La diversité génétique de cet échantillonnage a été étudiée en évaluant le polymorphisme lié à des marqueurs de type ISSR (Internal Simple Sequence Repeat) ou RAMS (Random Amplification of Microsatellite Sequence, Cohen *et al.*, 2003), la variation du nombre de séquences répétées (variable number of tandem repeats ou VNTR) à plusieurs locus (polyubiquitine et mucines), et le polymorphisme de gènes appartenant à la classe des effecteurs RxLR (Schornack *et al.*, 2009). L'ensemble de ces marqueurs neutres ou soumis à sélection a permis d'attribuer à chaque individu analysé un génotype multilocus (MLG). L'analyse révèle une très grande diversité génotypique, généralement liée à l'origine géographique de souches (illustrée figure 2A). Cependant, la plante hôte joue également un rôle très

structurant, et les souches isolées de piment sont aisément distinguables d'isolats prélevés sur d'autres plantes. Les isolats collectés dans les Bouches-du-Rhône en 2010 sont caractérisés par 4 MLGs spécifiques des Bouches-du-Rhône, dont les profils sont proches (Figure 2B). Cette homogénéité semble indiquer une reproduction clonale, malgré une représentativité des types A1 et A2 (60% et 40% de l'effectif, respectivement) propice à la reproduction sexuée.



**Figure 2:** Exemple de profils d'amplification obtenus avec une amorce ISSR (CCG<sub>3</sub>) sur un échantillon de souches de *P. capsici* provenant de diverses origines géographiques (A) ou collectées dans les Bouches-du-Rhône en 2010 dans deux exploitations agricoles (DR et SE) (B). (Photos: M.L. Kuhn).

L'échantillon de souches de 2010 correspond à des isolements effectués dans deux exploitations (DR et SE, Figure 2). Il est intéressant de noter que ces exploitations ont été attaquées par deux isolats génétiquement proches, mais distincts, et que ces isolats ont des profils semblables à ceux des anciennes souches, dont celles constituant la gamme de référence de l'INRA d'Avignon. L'ensemble de ces résultats suggère que la production de piment dans les Bouches-du-Rhône est affectée par des populations locales de *P. capsici*, établies depuis au moins 35 ans, régies par un mode de reproduction clonale qui limite la diversification génotypique. La conséquence directe de ces résultats est que la constitution d'une core-collection de *P. capsici* est tout à fait envisageable dans un programme d'évaluation de résistance quantitative, et dans la perspective d'une utilisation locale, à condition d'évaluer le pouvoir pathogène des souches analysées.

### 1-2 *P. infestans*

Les études épidémiologiques concernant *P. infestans* sont intimement liées à l'histoire de la phytopathologie, depuis les ravages provoqués par ce parasite sur la production européenne de pomme de terre au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle et leur conséquence la plus emblématique, la Grande Famine, qui décima l'Irlande en termes de mortalité et d'émigration (Fry et al., 2009).

Les connaissances sur la dynamique des populations de *P. infestans* au plan mondial ont longtemps reposé sur les données épidémiologiques obtenues sur pomme de terre. Ainsi jusqu'au début des années 1980, les populations mondiales (à l'exception notable du Mexique, centre d'origine supposée de *P. infestans*) étaient majoritairement représentées par la lignée clonale US-1 de type A1 (Fry et al., 2009). L'identification en Europe du type sexuel A2 en 1981, probablement introduit lors d'importantes importations de tubercules en provenance du Mexique, est le premier épisode d'un bouleversement complet de la situation mondiale, accompagnée d'une forte augmentation des épidémies de mildiou. L'importance croissante du marché de la pomme de terre, la mondialisation, les événements

géopolitiques et l'émergence de nouveaux marchés ont conduit à une forte accélération des échanges de tubercules souvent contaminés, cause possible de la dispersion de nouvelles populations pathogènes. Depuis une dizaine d'années, l'étude des populations de *P. infestans* pathogènes de pomme de terre a bénéficié du développement structuré d'outils et de ressources spécifiques, tels que bases de données, protocoles, ou marqueurs de géotypage ([www.euroblight.net](http://www.euroblight.net)).

La situation épidémiologique est très variable d'une région du monde à l'autre, et peut varier énormément au cours du temps. Les populations de type A2 introduites en Europe ont, dans certains cas, remplacé des populations existantes, ou ont co-existé, aboutissant ponctuellement à des événements de reproduction sexuée. On peut actuellement observer, selon les zones étudiées, la dissémination de quelques lignées qui, par leur prédominance pendant quelques saisons, structurent fortement les populations de façon temporaire, avant d'être remplacées par d'autres géotypes. En règle générale, les nouvelles populations présentent une pathogénicité (virulence et agressivité) accrue et sont fréquemment résistantes aux fongicides classiquement utilisés tels que le metalaxyl.

Comparativement aux études menées sur le mildiou de la pomme de terre, peu de données sont disponibles concernant la nature, la structure et l'évolution des populations de *P. infestans* attaquant la tomate. Cependant, elles mettent en évidence une certaine adaptation, voire spécialisation, de *P. infestans* à la tomate, ainsi qu'une structuration différente des populations isolées sur une culture ou l'autre (Legard *et al.*, 1995 ; Lebreton et Andrivon, 1998 ; Vega-Sanchez *et al.*, 2000 ; Knapova et Gisi, 2002, Wangsomboondee *et al.*, 2002).



**Figure 3** : Vue générale d'une attaque de *P. infestans* sur cultures de tomate conduites sous tunnel plastique (Photo: V. Lefebvre).

Les populations pathogènes sur tomate semblent encore plus dynamiques que celles attaquant la pomme de terre, et des épidémies observées sur cette culture peuvent provenir de la dissémination d'une seule lignée clonale éphémère qui ne sera pas forcément observée ailleurs (Fry *et al.*, 2009). De plus, elles présentent un cycle biologique sensiblement différent de celui observé sur pomme de terre, caractérisé par un stade biotrophe plus prononcé (moins de biomasse, peu ou pas de nécroses), et une sporulation précoce et abondante (Fry *et al.*, 2009). Ce phénomène d'adaptation physiologique s'accompagne d'une difficulté accrue pour isoler ces souches à partir de matériel végétal infecté, et de pouvoir les conserver en collection *in vitro*.

Nous ne disposons pas d'information concernant une éventuelle distinction génétique des souches attaquant la pomme de terre et celles attaquant la tomate. Une telle information est indispensable avant d'évoquer la possibilité de constituer une core-collection de *P. infestans* destinée à évaluer les résistances quantitatives chez la tomate. Nous avons donc développé sur un échantillonnage réduit (36 souches, dont 18 isolées de pomme de terre et 18 de tomate) une combinaison de marqueurs

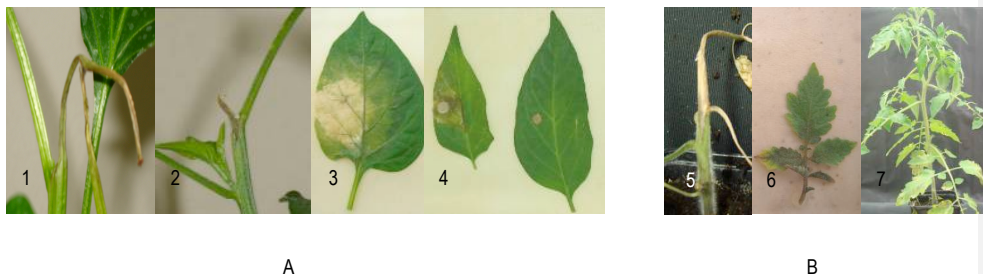
mitochondriaux et nucléaires (glucose-6-phosphate isomérase ou GPI, VNTR polyubiquitine, marqueurs RAMS, effecteurs RxLR<sup>1</sup>). Nous avons également déterminé le MT.

Cette analyse révèle deux lignes fortes de structuration, malgré un effectif réduit. D'une part, les marqueurs distinguent les souches isolées de tomate et celles isolées de pomme de terre. D'autre part, les souches de type A1 présentent des MLGs distincts des souches de type A2. Or, 50% des souches isolées de pomme de terre sont de type A2, alors que ce type est absent de l'échantillon "tomate" actuel. Ces résultats préliminaires indiquent que la problématique "*P. infestans*-tomate" est probablement très différente de la problématique "pomme de terre". La constitution d'une core-collection de *P. infestans* à des fins d'évaluation de résistances quantitatives chez la tomate reste donc pertinente, mais nécessite une connaissance approfondie de la diversité génétique des souches pathogènes, et le développement de marqueurs moléculaires adaptés, ainsi qu'une prise en compte des problèmes techniques inhérents au cycle biologique particulier des souches adaptées à la tomate.

## 2 - Mise en place de tests d'évaluation de la résistance

La constitution d'une core-collection de *Phytophthora* dans une optique de sélection variétale implique la maîtrise de tests biologiques permettant de décomposer un caractère complexe, la résistance quantitative, en composantes quantitatives. La diversification de ces tests, développés sur différents organes et ciblant différentes étapes du processus infectieux, permet une meilleure prise en compte des différentes composantes de la résistance. Cette approche permet également d'aborder les différents composants du pouvoir pathogène de *Phytophthora*. En l'absence de gènes majeurs de résistance décrits chez une espèce végétale vis-à-vis d'un agent pathogène donné, il importe d'effectuer ces tests sur une gamme de génotypes (gamme d'hôtes) incluant la plupart des sources de résistance disponibles.

*P. capsici* pouvant attaquer aussi bien les racines que les parties aériennes de son hôte, la résistance polygénique du piment a donc été évaluée sur racine, tige, feuille et pétiole (Figure 4), sur une gamme d'hôtes de 6 génotypes, classés de très sensible (Yolo Wonder ou YW) à très résistant (CM334). Une bonne corrélation est obtenue entre les données issues des différents tests de nature quantitative, concernant le classement des souches et des génotypes hôtes.



**Figure 4:** Mise en œuvre de tests d'évaluation de la résistance polygénique du piment à *P. capsici* et de la tomate à *P. infestans*. A: la souche P450 (Pc197), est utilisée pour inoculer la variété Yolo Wonder (1, 3) et l'accession CM334 (2, 4). L'inoculation est effectuée sur tige décapitée de piment (1, 2), et le test est conduit sur une période totale de 21 jours. L'agressivité est estimée à travers l'envahissement de la tige en mm. La mesure de l'AUDPC (mesure d'aire sous la courbe) est également effectuée. 3, 4: test sur feuille détachée de piment. B:

<sup>1</sup> Face aux difficultés rencontrées pour disposer de souches de *P. infestans* isolées sur tomate qui soient facilement cultivables et présentant un niveau de pureté biologique suffisant, nous avons effectué une partie de cette analyse sur des échantillons d'ADN fournis par différents partenaires.

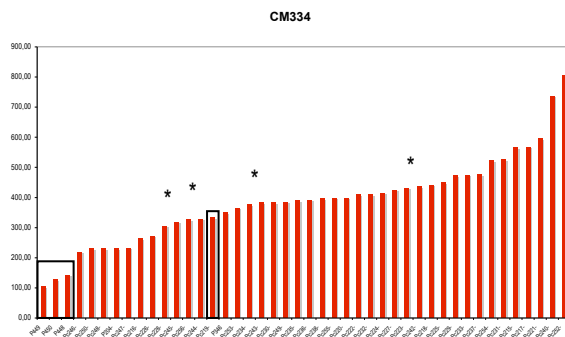
évaluation de l'agressivité de *P. infestans* sur tomate, selon un test sur tige décapitée (5), sur pétiole (6) ou par dispersion de sporanges sur plante entière (7). (Photos: V. Lefebvre).

Les gènes majeurs de résistance à *P. infestans* actuellement exploités en sélection variétale proviennent d'espèces apparentées à la tomate, et ils sont aujourd'hui contournés. Il est important de considérer ces gènes dans la mise au point des tests d'évaluation de résistance polygénique, afin de caractériser les isolats pour leur virulence vis-à-vis de ces gènes, et d'appréhender au mieux l'apport des composantes quantitatives par rapport aux réponses liées à l'expression des gènes majeurs. Nous avons donc constitué une gamme d'hôtes rassemblant 11 accessions intégrant celles portant les gènes majeurs *Ph-1*, *Ph-2*, *Ph-3*, ainsi que celles caractérisées par des résistances quantitatives. Malheureusement, la présence des gènes majeurs de résistance dans les accessions de la gamme repose uniquement sur des données bibliographiques, et il est particulièrement difficile de disposer de souches de *P. infestans* permettant de valider ces informations. Nous avons donc considéré des souches provenant de collections existantes, et collecté de nouveaux isolats prélevés sur tomates infectées. Les tests d'évaluation de résistance ont été développés sur tiges, folioles et pétioles, ainsi que sur plantes entières.

### 3 - Evaluation du pouvoir pathogène de *Phytophthora*

#### 3-1- *P. capsici*-piment

Nous avons évalué le pouvoir pathogène (virulence et agressivité) des isolats de *P. capsici* collectés sur piment dans les Bouches-du-Rhône. Un test d'inoculation sur tige a été effectué sur trois accessions représentatives de la gamme d'hôtes, intégrant les isolats récemment récoltés et des souches maintenues en collection. Il révèle que tous les isolats testés sont virulents (Figure 5), et que le classement de la gamme d'hôtes précédemment établi par l'INRA d'Avignon est inchangé, ce qui renforce la notion de stabilité des populations de *P. capsici*.



**Figure 5** : Evaluation de l'agressivité d'un échantillon de *P. capsici* vis-à-vis de CM334. L'agressivité est évaluée par mesure de l'envahissement de la tige sur une période de 21 jours. Les valeurs en ordonnées correspondent à la moyenne de l'AUDPC déterminée à partir de l'envahissement caulinaire. Les souches issues de la core-collection P346 (Pc107), P448 (Pc101), P449 (Pc15) et P450 (Pc197) sont encadrées. Les souches isolées en 2010 dans le tunnel SE (voir texte) sont indiquées par un astérisque (\*).

Le nombre de marqueurs déployés et le nombre d'isolats analysés ne permettent pas d'établir une corrélation absolue entre les MLG identifiés et le niveau d'agressivité. Bien que les souches issues du tunnel SE présentent un niveau d'agressivité intermédiaire (Figure 5), il n'est pas possible d'établir une relation entre niveau d'agressivité et l'exploitation d'origine des isolats.

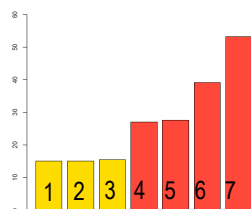
L'observation principale de ces tests est que les souches constituant l'ancien échantillonnage présentent un taux d'agressivité nettement inférieur à celui des isolats récents. L'explication la plus logique est qu'elles ont perdu leur agressivité au cours du temps, probablement en fonction des conditions de conservation au laboratoire. Considérant que les nouveaux isolats présentent les mêmes MLGs que les anciens, et que la gamme d'agressivité est particulièrement large, on peut considérer



qu'il est possible de reconstituer une core-collection de *P. capsici* représentative des populations existant dans les Bouches-du-Rhône.

### 3-2 *P. infestans*-tomate

Des essais de classification des isolats de *P. infestans* disponibles en races ont été entrepris, mais doivent être confirmés, et l'obtention de souches supplémentaires, isolées sur tomate est impérative pour valider ces résultats. Nous avons pu cependant identifier quelques isolats intéressants et des sources de résistance prometteuses. De plus, on observe un fort effet structurant de la plante hôte, illustré par la Figure 6.



**Figure 6:** Agressivité relative de 7 isolats de *P. infestans*, évaluée par mesure de l'envahissement moyen (en mm) de tiges décapitées de tomate 14 jours après inoculation. Les valeurs observées pour les souches isolées de pomme de terre sont indiquées en jaune, et celles relatives à l'agressivité des souches isolées de tomate sont indiquées en rouge.

En règle générale, les isolats collectés sur tomate sont plus agressifs sur cette plante que ceux provenant de pomme de terre. Ces résultats confirment des observations antérieures (Lebreton et Andrivon, 1998), et sont cohérents avec les données de génotypage obtenues au cours de ce programme. Le génotypage de cette gamme de *P. infestans* a été initié, afin de confronter les résultats des approches pathologiques et moléculaires.

## 4 - Les limitations d'une core-collection de *Phytophthora*

Au cours de ce projet, nous avons identifié plusieurs critères limitant l'utilisation de core-collections de *Phytophthora* dans le cadre de processus de sélection, ou nécessitant un investissement important.

### 4-1 Echantillonnage, contaminations et représentativité

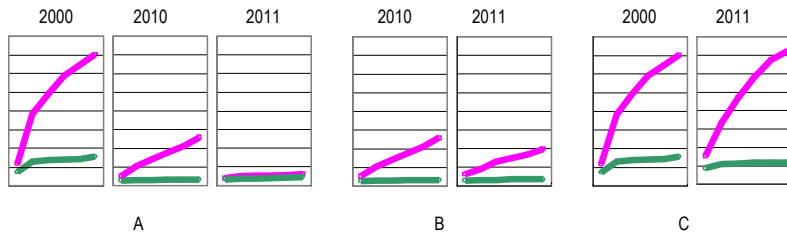
La première étape de la constitution d'une core-collection est évidemment la collecte d'isolats, qui peuvent provenir de collections existantes, ou être prélevés directement sur le terrain. La pureté biologique des isolats est primordiale, et ce critère, apparemment trivial, s'est avéré particulièrement impactant sur la conduite du projet. Face à l'incapacité de plusieurs laboratoires internationaux à nous fournir des isolats indemnes de contaminations bactériennes persistantes et à la perte de nombreux échantillons fournis par les partenaires privés du projet au cours de tentatives de purification, la dimension internationale nécessaire à cette étude a été réduite à des souches de *P. capsici* déjà disponibles et conservées en azote liquide et à un ensemble d'isolats collectés en 2010 dans les Bouches-du-Rhône. De même, une grande partie de l'analyse moléculaire de la diversité de *P. infestans* a été faite sur des échantillons d'ADN fournis par des collègues de l'INRA. La conservation à long terme des souches isolées de tomate s'avère plus difficile encore que dans le cas de souches isolées de pomme de terre. Elle nécessite un nombre accru de repiquages, ce qui entraîne une augmentation de la variabilité des souches et une baisse de leur agressivité.

### 4-2-Conditions de conservation et dérive des core-collections

Les procédés de conservation constituent une étape-clé dans la mise en place d'une core-collection. En effet, une conservation prolongée dans de mauvaises conditions entraîne souvent une diminution de

leur capacité de sporulation et une perte de virulence et/ou d'agressivité au cours du temps. En règle générale, les souches de *Phytophthora* sont conservées selon trois modes: i) sur milieu gélosé en boîte de Pétri à température contrôlée ; ii) en pastilles gélosées sous eau à température contrôlée ; iii) en cryoconservation dans l'azote liquide (ou à  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Ces modes de conservation ne sont pas exclusifs, mais nécessitent un entretien différent des collections. Ainsi, la conservation sur milieu gélosé nécessite des repiquages fréquents, ce qui favorise la dérive des souches. A l'inverse, la cryoconservation est davantage mise en place dans une démarche de stockage à long terme, et les repiquages sont peu fréquents.

La diminution d'agressivité des anciennes souches de *P. capsici* nous a conduits à estimer l'influence des différents modes de conservation sur l'intégrité pathogénique de *Phytophthora*. Nous avons inoculé deux variétés de piment avec une ancienne souche fortement agressive, et stockée selon différents modes de conservation. Les résultats sont présentés sur la Figure 7.



**Figure 7** : Influence des procédés de conservation et de propagation d'une souche de *P. capsici* sur son niveau d'agressivité à l'égard de la variété Yolo Wonder (◆) et de l'accession CM334 (◆) de piment. L'agressivité de la souche P450 (Pc197) est évaluée selon un test sur tige décapitée, en mesurant la longueur de nécrose (en mm, ordonnée) sur une période de 21 jours (abscisse). A : la souche a été maintenue sur milieu synthétique et milieu V8 (6-10 repiquages/an) sur une période de 11 ans. B : la souche a été conservée depuis 2010 sous eau à basse température et a subi 2 repiquages. C : la souche a été conservée en azote liquide pendant 11 ans. L'ensemble des données a été obtenu à l'INRA GAFL.

Nous pouvons observer que l'échantillon conservé sur milieu synthétique et ayant subi de fréquents repiquages associés a perdu son pouvoir pathogène (Figure 7A). Le maintien sous eau semble, à court terme, une solution acceptable (Figure 7B) dans la mesure où la souche conservée selon ce mode conserve son niveau d'agressivité sur la période appréhendée lors du test (1 an), mais doit être validé sur des périodes plus longues. La cryoconservation apparaît d'après ce test (Figure 7C) le meilleur mode de conservation, car l'isolat stocké pendant 11 ans dans l'azote liquide a conservé tout son potentiel infectieux. Cependant, cette technique est délicate et onéreuse. De plus, malgré la disponibilité de protocoles applicables à un certain nombre d'espèces, elle ne résout pas le problème de souches/espèces problématiques comme les populations de *P. infestans* pathogènes de tomate.

#### 4-3- Durabilité et champ d'application d'une core-collection, l'exemple de *P. parasitica*.

Pour être utile dans un processus de sélection, une core-collection doit être représentative de la diversité de l'agent pathogène, mais il faut, particulièrement dans le cas de *Phytophthora*, anticiper sur l'évolution de cette diversité, y compris sur d'éventuels remplacements de populations et d'espèces pathogènes. Nous avons vu que le piment et la tomate sont des plantes hôtes pour d'autres espèces de *Phytophthora*, dont *P. parasitica*. Cette espèce, globalement polyphage, avait été écartée de notre étude, sur la base d'informations fournies par les partenaires privés indiquant sa faible incidence au

champ par rapport à *P. capsici* ou *P. infestans*. Or, de nombreuses observations effectuées témoignent d'une augmentation inquiétante des maladies directement imputées à *P. parasitica* sur piment, en Tunisie et en Espagne (Allagui et Lepoivre, 2000 ; Andres et al., 2003 ; B. Allagui, communication personnelle) et sur tomate, dans plusieurs pays du Bassin méditerranéen (Espagne, Italie, Maroc) et aux USA (communications personnelles des partenaires privés de PhyCor). Il faut donc intégrer cette espèce dans le processus d'évaluation de résistances quantitatives à *Phytophthora*. L'étude de la diversité génotypique de cette espèce, initiée à l'INRA (Lacourt et al., 1994 ; Colas et al., 1998), est à présent entreprise au niveau de génomes entiers (Russ et al., 2012), en particulier sur des souches isolées de Solanacées, dont le piment, afin d'identifier les mécanismes moléculaires régissant la spécificité parasitaire chez une espèce globalement polyphage, et de comprendre les mécanismes structurant cette espèce.

## Conclusion

Les résultats acquis et la réflexion menée lors de la conduite de ce projet permettent d'affirmer que le développement d'une core-collection de *Phytophthora* et son utilisation dans un processus de sélection variétale sont envisageables dans le cas de *P. capsici*, et peut être dans le cas de *P. infestans*, mais dans un champ d'application précis.

Ces collections ont une utilisation limitée dans l'espace. En effet, les populations pathogènes sont soumises à des pressions de sélection qui dépendent en grande partie des conditions environnementales, biotiques et abiotiques, de la nature de la plante hôte et des pratiques culturales *sensu lato* qui sont souvent spécifiques d'une localisation particulière. La stabilité génotypique de *P. capsici* dans les Bouches-du-Rhône peut être exploitée pour développer une core-collection dont l'utilité sera limitée à cette région.

Elles peuvent être limitées dans le temps. Les études concernant le mildiou de la pomme de terre, décrivent un phénomène extrêmement dynamique d'invasions successives et temporaires de lignées clonales ([www.euroblight.net](http://www.euroblight.net)), et d'évolution de l'agressivité de populations existantes. De même, on ne peut pas exclure que les souches de *P. capsici* isolées sur piment dans les Bouches-du-Rhône en 2010 présentent un niveau d'agressivité accru vis-à-vis du piment, illustrant un phénomène d'adaptation aux plantes hôtes.

Le succès de la constitution d'une core-collection repose sur la maîtrise des méthodes d'isolement et des modes de conservation. La cryoconservation est une solution coûteuse, nécessitant un équipement adapté et un savoir-faire technique important. Cependant, elle semble parfaitement adaptée dans le cas d'une collection de *P. capsici*. La question reste ouverte dans le cas de *P. infestans*, en l'absence de données de génotypage complémentaires, mais le processus se heurterait, dans ce cas précis, à plusieurs difficultés techniques, dont l'étape de cryoconservation, qu'il ne faut pas sous-estimer.

La durabilité d'une core-collection repose sur une démarche de veille concernant l'évolution des populations pathogènes au champ. Dans le cadre précis de notre étude, une surveillance nécessaire permettra de déterminer si l'émergence de *P. parasitica* comme problème sanitaire sur la production et de tomate est un phénomène éphémère et/ou localisé, mais cette situation indique qu'il faut considérer les populations de *Phytophthora* comme un cortège d'espèces dont la représentation relative peut être fluctuante au cours de la période de culture. Une core-collection, surtout destinée à évaluer les résistances polygéniques quantitatives, devrait donc englober plusieurs espèces.

## Remerciements

Nous tenons à remercier A. Bachellez, E. Dorieux, K. Régnier, P. Signoret, et l'ensemble des agents de l'équipe expérimentale de l'UR GAFL pour leur participation à cette étude, ainsi que les sélectionneurs privés Gautier semences, Sakata seeds, Syngenta, Rijk Zwaan, et Clause-Vilmorin.

Nous remercions également D. Andrivon (INRA Rennes) et M. Pitrat (INRA Avignon) pour leurs commentaires, suggestions et conseils tout au long de ce projet, R. Corbière et H. Magalon (INRA Rennes) pour les échantillons d'ADN de *P. infestans* et Kurt Lamour (Tennessee University) qui a réalisé avec Véronique Lefebvre la prospection dans les exploitations agricoles des Bouches du Rhône en 2010. Cette étude a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (Convention MAP-Solanacées C2008/29-Projet PhyCor).

### Références bibliographiques

- Allagui M.B., Lepoivre P., 2000. Molecular and pathogenicity characteristics of *Phytophthora nicotianae* responsible for root necrosis and wilting of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Tunisia. *European Journal of Plant Pathology* 106, 887-894.
- Andres J.L., Rivera A., Fernandez J., 2003. *Phytophthora nicotianae* pathogenic to pepper in northwest Spain. *Journal of Plant Pathology* 85, 91-98.
- Bonnet J., Danan S., Boudet C., Barchi L., Sage-Palloix A.-M., Caromel B., Palloix A., Lefebvre V., 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical and Applied Genetics* 115, 253-264
- Brown A.D.H., 1989. Core-collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31, 818-824.
- Brouwer D.J., Jones E.S., St Clair D.A., 2004. QTL analysis of quantitative resistance to *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato and comparisons with potato. *Genome* 47, 475-492
- Cohen S., Allasia V., Venard P., Notter S., Vernière C., Panabières F., 2003. Intraspecific variation in *Phytophthora citrophthora* from citrus trees in Eastern Corsica. *European Journal of Plant Pathology* 109, 791-805.
- Colas V., Lacourt I., Ricci P., Valenberghe-Masutti F., Venard P., Poupet A., Panabières F., 1998. Diversity of virulence in *Phytophthora parasitica* on tobacco, as reflected by nuclear RFLPs. *Phytopathology* 88, 205-212.
- Danan S., Veyrieras J.-B., Lefebvre V., 2011. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. *BMC Plant Biology* 11, 16
- Erwin D., Ribeiro O., 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, MN, American Phytopathological Society
- Fry W.E., Grünwald N.J., Cooke D.E.L., McLeod A., Forbes G.A., Cao K., 2009. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Lamour and Kamoun (Eds), *Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools*. pp. 139-164
- Knapova G., Gisi U., 2002. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. *Plant Pathology* 51, 641-653.
- Lacourt I., Panabières F., Marais A., Venard P., Ricci P., 1994. Intraspecific polymorphism of *Phytophthora parasitica* revealed by analysis of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Mycological Research* 98, 562-568.
- Lamour K.H., Stam R., Jupe J., Huitema E., 2011. The oomycete broad host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology* doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00754.x.
- Lebreton L., Andrivon D., 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. *European Journal of Plant Pathology* 104, 583-94.
- Legard D.E., Lee T.Y., Fry W.E., 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato. *Phytopathology* 85, 1356-1361.
- Russ C., Tyler B., Panabières F., Shan W., Tripathy S., Grünwald N., Machado M., Galagan J., Walker B., Young S., Zeng Q., Gargeya S., Fitzgerald M., Haas B., Abouelleil A., Alvarado L., Arachchi H., Berlin A., Chapman B., Gearin G., Goldberg J., Griggs A., Gujja S., Hansen M., Heiman D., Howarth C., Larimer J., Lui A., MacDonald P., McCowen C., Montmayeur A., Murphy C., Neiman D., Pearson M., Priest M., Roberts A., Saif S., Shea T., Sisk P., Stolte C., Sykes S., Wortman J.,

Nusbaum C., Birren B., 2012. *Phytophthora parasitica* INRA-310 Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT.

Schornack S., Huitema E., Cano L.M., Bozkurt T.O., Oliva R., Van Damme M., Schwizer S., Raffaele S., Chaparro-Garcia A., Farrer R., Segretin M.E., Bos J., Haas B.J., Zody M.C., Nusbaum C., Win J., Thines M., Kamoun S., 2009. Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology* 10, 795-803.

Thabuis A., Palloix A., Pflieger S., Daubèze A.M., Caranta C., Lefebvre V., 2003. Comparative mapping of *Phytophthora* resistance loci in pepper germplasm: evidence for conserved resistance loci across *Solanaceae* and for a large genetic diversity. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 1473-1485

Vega-Sanchez M.E., Erselius L.J., Rodriguez A.M., Bastidas O., Hohl H.R., Ojiambo P.S., Mukalazi J., Vermeulen T., Fry W.E., Forbes G.A., 2000. Host adaptation to potato and tomato within the US-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya. *Plant Pathology* 49, 531–539.

Vernière C., Cohen S., Raffanel B., Dubois A., Venard P., Panabières F., 2004. Variability in pathogenicity among *Phytophthora* spp. isolated from citrus in Corsica. *Journal of Phytopathology* 152, 476-483.

Wangsomboondee T., Groves C.T., Shoemaker P.B., Cubeta M.A., Ristaino J.B., 2002. *Phytophthora infestans* populations from tomato and potato in North Carolina differ in genetic diversity and structure. *Phytopathology* 92, 1189-1195.