Innovations Agronomiques (2007) 1, 47-61

Les apports de l'innovation variétale : Recherches menées pour améliorer la résistance du pommier à la tavelure

C.-E. Durel [(1)], F. Laurens [(1)], V. Caffier [(2)], B. Le Cam [(2)], N. Sapoukhina [(2)]

[(1)] UMR INRA/INH/UA Génétique et Horticulture – GenHort, Centre INRA d'Angers
[(2)] UMR INRA/INH/UA Pathologie Végétale – PaVé, Centre INRA d'Angers

Résumé

Toutes les grandes variétés commerciales de pommier sont sensibles à une maladie fongique majeure: la tavelure causée par le champignon *Venturia inaequalis*. De nombreux traitements sont nécessaires pour la combattre. Des variétés résistantes ont été créées par croisement avec un pommier sauvage, mais la résistance obtenue, basée sur la présence d'un seul gène, a été contournée par de nouvelles races virulentes du champignon. Dans ce cadre, le Centre INRA d'Angers mène à la fois un programme d'amélioration génétique visant à créer de nouvelles variétés de pommier portant une résistance durable à la tavelure, et des recherches d'amont pour mieux connaître la diversité génétique du champignon et les bases génétiques de la résistance du pommier. L'étude de la diversité et de la structuration du champignon *Venturia inaequalis* est menée tant au niveau mondial qu'au niveau régional. Elle permet de retracer l'historique de l'invasion du champignon et d'évaluer la capacité de dispersion de nouvelles virulences. L'étude du pouvoir pathogène en lien avec les phénomènes de contournement de gènes de résistance vise à évaluer la facilité/difficulté avec laquelle le champignon va pouvoir s'adapter aux nouvelles variétés résistantes. La cartographie génétique de nouveaux facteurs de résistance permet de mieux comprendre l'architecture génétique de variétés anciennes connues pour leur bonne résistance à la tavelure et ouvre la porte à la sélection assistée par marqueurs. Enfin, la modélisation mathématique permet de comprendre la dynamique invasive des populations virulentes en relation avec la composition génétique des peuplements de pommier et de leur organisation spatiale. L'ensemble de ces recherches vise à mieux optimiser la création et le déploiement des nouvelles variétés résistantes.

Introduction

Malgré une très grande diversité génétique au sein de l'espèce pommier (*Malus* x *domestica*), le choix des variétés de pomme proposé aux consommateurs reste aujourd'hui très limité : une dizaine de variétés représente plus de 90% de la consommation française. Elles sont toutes sensibles ou très sensibles à au moins l'un des principaux bioagresseurs du pommier. Elles doivent donc subir des traitements phytosanitaires fréquents pour atteindre une bonne qualité commerciale.

Les deux maladies fongiques, tavelure et oïdium (causées respectivement par les champignons nommés *Venturia inaequalis* et *Podosphaera leucotricha*), nécessitent à elles seules plus de 15 traitements par an en moyenne. Certains fongicides peuvent être contournés par des souches résistantes de ces champignons. La création de nouvelles variétés de pommier portant une résistance durable à ces principaux pathogènes est un objectif majeur dans les programmes d'amélioration génétique engagés par de nombreux instituts de recherche dans le monde (Laurens, 1999). Réduire le nombre de traitements phytosanitaires en vergers commerciaux permettrait à la fois de baisser le coût de production, de réduire la présence de résidus pesticides dans les eaux fluviales ou souterraines et de diminuer les impacts négatifs des fongicides sur l'environnement (faune sauvage en particulier). L'Union Européenne, à travers la politique agricole commune, incite fortement à la réduction de

l'utilisation de pesticides et doit se prononcer à brève échéance contre l'utilisation de certaines molécules et éléments simples comme le cuivre largement utilisé en arboriculture biologique. Une nouvelle directive européenne en préparation vise aussi à imposer la mise en œuvre de la Protection Intégrée ('Integrated Pest Management' – IPM) sur l'ensemble des productions agricoles européennes (grandes cultures, fruits et légumes). Dans ce contexte, les travaux de recherche finalisés menés sur le Centre INRA d'Angers ont pour objectif de fournir aux arboriculteurs à la fois des nouvelles variétés de pommier présentant une résistance accrue à la tavelure et les conditions de leur utilisation optimale pour limiter les risques de leur contournement par de nouvelles races du champignon.

1.) Création de variétés résistantes à la tavelure : démarche, résultats obtenus et limites

1.1) Les programmes d'amélioration menés au niveau mondial et à l'INRA

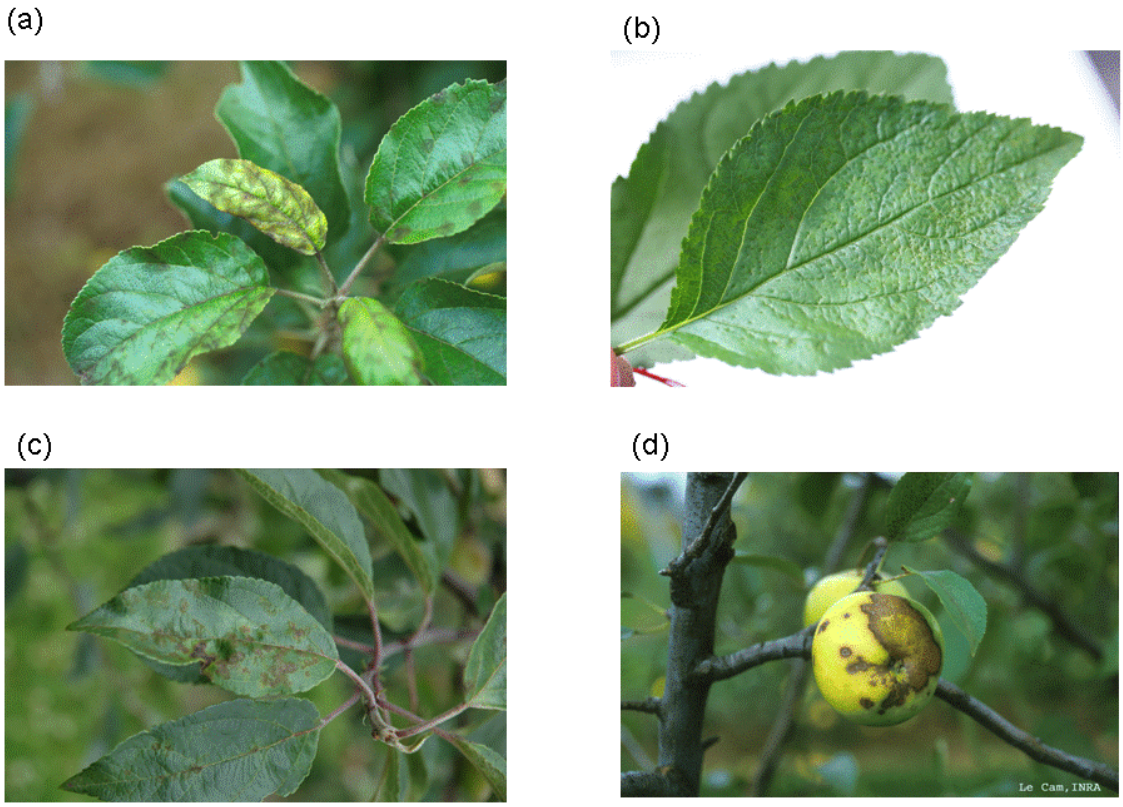
Les programmes d'amélioration génétique pour la résistance à la tavelure développés à travers le monde ont débuté il y a plus de 60 ans aux Etats-Unis surtout (Janick, 2006) et en Allemagne. Ils se sont pratiquement tous basés sur l'utilisation de résistances à contrôle génétique simple. Contrôlées par un seul gène (résistance monogénique) ou par un faible nombre de gènes (résistance oligo-génique), ces résistances assurent une immunité totale à la variété ; elles sont de plus faciles à sélectionner dans les descendances de croisement. Nous allons voir plus loin que ces résistances présentent un défaut majeur : elles peuvent souvent être « contournées » par de nouvelles races du champignon qui les rendent inefficaces.

Les résistances monogéniques sont peu présentes chez l'espèce cultivée *Malus* x *domestica*. Elles ont par contre été découvertes chez plusieurs espèces sauvages apparentées : *Malus micromalus*, *M. atrosanguinea*, *M. pumila*. Le gène de résistance le plus utilisé est le gène *Vf* apporté par l'espèce *Malus floribunda* : il est présent chez plus de 80 % des variétés résistantes à la tavelure aujourd'hui inscrites dans le monde (Laurens, 1999). Cette espèce possède des fruits impropres à la consommation et de très petit calibre (<1 cm de diamètre). La stratégie des améliorateurs pour introduire (« introgresser ») ce gène dans l'espèce cultivée a été de réaliser des cycles successifs de rétrocroisements avec des variétés commerciales et de sélectionner à chaque étape les individus résistants et de bonne qualité organoleptique. Le gène *Vf* a été mis en évidence en 1943 aux Etats Unis. Il a fallu une soixantaine d'années pour obtenir des hybrides portant ce gène et satisfaisant à toutes les exigences agronomiques et qualitatives d'une variété commerciale. Dès les années 70-80, des variétés portant le gène *Vf* telles que Prima ou Florina ont été lancées par différents instituts de recherche dont l'INRA, mais elles n'atteignaient pas encore un niveau agronomique suffisant pour qu'elles percent sur le marché.

L'objectif du programme d'amélioration développé à l'INRA d'Angers est de créer de nouvelles variétés de pomme à couteau de très grande qualité organoleptique (attrait et goût), résistantes aux principaux bioagresseurs du pommier. Ces variétés doivent également avoir une production forte et régulière. Le programme d'amélioration a été lancé il y a plus de 40 ans. Il s'est basé sur les hybrides issus des premiers cycles d'introgression du gène *Vf* dans le pommier domestique réalisés aux Etats-Unis. Il s'est ensuite diversifié en allant explorer d'autres sources de résistance que le seul gène *Vf* (Lespinasse, 1989), ceci afin de trouver des alternatives face aux risques de contournement de la résistance par le champignon (voir chapitre 1.3). Le programme d'amélioration fait depuis quelques années l'objet d'un partenariat avec les pépiniéristes français, regroupés au sein de la SARL NOVADI. L'objectif est de développer une gamme de variétés de pomme de bonne qualité gustative, à bon comportement vis-à-vis des principaux bioagresseurs du pommier. La stratégie est de les distribuer sous la marque générique LES NATURIANES® avec un positionnement marketing commun. La première variété de

cette gamme est 'Ariane' issue des programmes de création variétale de l'INRA. Pour mettre en place cette démarche de lancement, une nouvelle structure, la SAS POMALIA, a été créée en juillet 2001. Elle associe les pépiniéristes de NOVADI, des organisations de producteurs et six metteurs en marché regroupant les trois grands bassins de production (val de Loire, Sud-Ouest et Sud-Est).

***Photos**. Symptômes de tavelure sur variété sensible (a), symptôme de résistance (b), variété Ariane contournée en verger par une souche virulente (c), symptôme de tavelure sur fruit (d)*



Copyright :
photos (a) et (d) : B. Le Cam, INRA ; photo (b) : V. Soufflet-Freslon, INRA ; photo (c) : V. Caffier, INRA

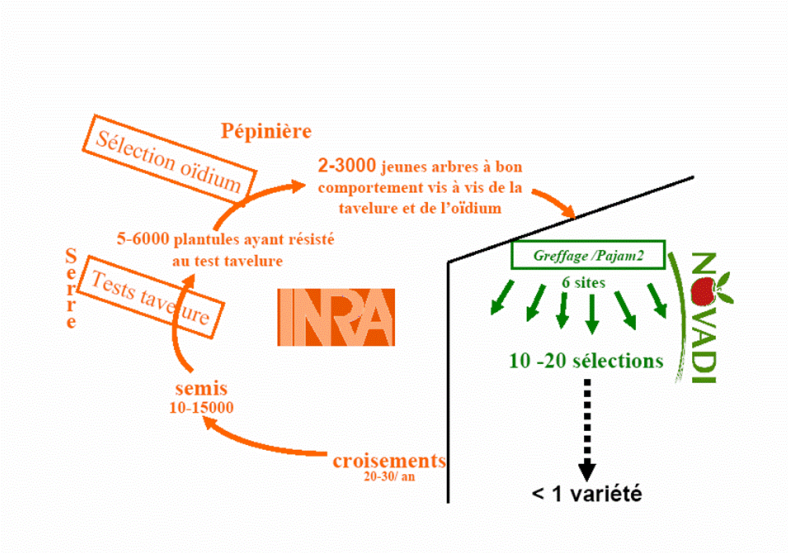
1.2) Un schéma de sélection avec de multiples étapes

La Figure 1 présente le cycle de sélection pratiqué à l'INRA d'Angers sur le pommier. Avant d'engager la sélection proprement dite, de nombreux croisements contrôlés (20 à 30) sont réalisés chaque année. Les étapes ultérieures du cycle de sélection consistent à éliminer progressivement, parmi les descendants de ces croisements, les individus qui ne satisfont pas aux critères de sélection cités précédemment.

Le déroulement des programmes de sélection variétale chez toutes les espèces fruitières ligneuses est lié aux contraintes morphologiques, physiologiques et culturales. La longueur de la phase juvénile est certainement la plus limitante pour la plupart des espèces. Chez le pommier, sa durée varie de 4 à 5 ans en fonction des génotypes et des modes de conduite. Cette période se manifeste par une forte croissance végétative des arbres et l'absence de floraison. L'arbre acquiert progressivement ses caractéristiques. L'évaluation des fruits et de l'arbre ne pouvant s'effectuer que sur des individus

adultes, les travaux de sélection sont centrés, pendant cette période, sur des tests précoces de résistance aux maladies.

***Figure 1** : Cycle de sélection appliqué dans le cadre du programme d'amélioration génétique du pommier à couteau mené en partenariat entre l'INRA et la SARL NOVADI.*



La première étape du cycle de sélection se déroule en serre. Les pépins issus des croisements réalisés l'année précédente sont semés (en moyenne 10 à 15 000/an). Quand les jeunes plantes ont atteint le stade 2-3 feuilles, elles sont inoculées avec une suspension de spores du champignon *Venturia inaequalis* (tavelure) récoltées sur des variétés sensibles dans les vergers de l'INRA. Ce mélange est donc constitué des races communes du champignon présentes en France. Après deux séries d'inoculation, les plantes sensibles sont éliminées. 6 000 jeunes plantes résistantes aux races communes de tavelure sont ainsi sélectionnées et transplantées en pépinière. Après 18 mois, une sélection pour la résistance à l'oïdium est effectuée. A l'issue de cette phase, 2 000 à 3 000 arbres sont en moyenne sélectionnés, greffés sur un porte-greffe et plantés en verger d'évaluation. Dès la deuxième année de fructification, la description des fruits et des arbres est effectuée. Trois années d'observation minimum sont alors nécessaires pour : (i) apprécier la qualité organoleptique des fruits - attrait, qualité de la chair, saveur, parfum - à la récolte et en cours de conservation, (ii) préciser le type d'architecture de l'arbre et (iii) détecter le comportement de chaque individu vis à vis des parasites et ravageurs du verger et des maladies et accidents physiologiques en conservation.

Depuis 1997, cette phase de sélection en verger d'évaluation est réalisée chez des pépiniéristes membres de la SARL NOVADI (6 sites) (Laurens et Pitiot, 2003). A l'issue de ces nombreux tests, une vingtaine d'hybrides sont sélectionnés pour être plantés dans des essais variétaux gérés par l'INRA et le Ctifl (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) dans le cadre de la charte nationale d'expérimentation. Ces essais permettent de caractériser (essais 'niveau 1') puis d'évaluer en vraie grandeur ('niveau 2') le comportement agronomique de ce nouveau matériel et d'apprécier son aptitude à la conservation. La quantité importante de fruits récoltés dans le cadre de ces essais est également destinée à divers tests (pré-commercialisation, marketing) pour apprécier leur acceptabilité auprès de la grande distribution et des consommateurs.

Ce cycle de sélection représente un long travail: il faut au minimum 15 à 20 ans pour le réaliser. Un objectif prioritaire est donc d'en réduire la durée et d'en améliorer l'efficacité. L'utilisation des marqueurs génétiques comme outil de sélection (Sélection Assistée par Marqueurs, Cf. chapitre 2.3) est une voie

qui devrait permettre de répondre à ces objectifs à la fois pour les caractères de qualité du fruit et de résistance aux bioagresseurs.

1.3) Les limites de la résistance monogénique

Les variétés porteuses du gène *Vf* sont encore très peu répandues dans les vergers commerciaux. Pourtant, dès la fin des années 1980, une race de *Venturia inaequalis* capable de contourner le gène *Vf* a été mise en évidence pour la première fois en Allemagne et caractérisée (Parisi *et al*., 1993). Cette nouvelle race, dénommée race 6, s'est montrée virulente vis à vis d'un grand nombre d'hybrides prometteurs portant le gène *Vf* mais n'attaquait pas l'arbre de l'espèce *Malus floribunda* à partir duquel le gène *Vf* avait été introgressé (Parisi et Lespinasse, 1996). Une autre race de tavelure virulente sur le gène *Vf* a parallèlement été découverte en Angleterre sur une espèce ornementale dans un jardin botanique. Cette race, dénommée race 7 attaquait l'arbre de *M. floribunda* et un nombre important d'hybrides porteurs du gène *Vf* mais n'était pas virulente sur Golden Delicious, variété considérée jusqu'à présent comme sensible à toutes les races connues de *Venturia inaequalis* (Bénaouf et Parisi, 2000) (Tableau 1). La race 7 est en réalité bloquée par un gène majeur de résistance porté par Golden Delicious, le gène *Vg*. Par la suite, des souches capables d'attaquer à la fois l'arbre de *M. floribunda*, les variétés porteuses du gène *Vf* et la variété Golden Delicious ont aussi été identifiées (Parisi *et al*., 2004). En France, la virulence vis à vis du gène *Vf* s'est déclarée dans un verger commercial sur la variété de pomme à jus Judeline, puis s'est propagée dans toute la Normandie pour atteindre ensuite la Bretagne (Guérin et Le Cam, 2004).

***Tableau 1** : Description des races du champignon Venturia inaequalis contournant les gènes de résistance Vg, Vf et Vfh.*

Variété de pommier	Résistance	race 1	race 6	race 7	race « 6+7 »
Gala	aucune	+	+	+	+
Golden Delicious	*Vg*	+	+	-	+
Priscilla	*Vf*	-	+	+	+
Prima	*Vf+Vg*	-	+	-	+
Malus floribunda 821	*Vf + Vfh*	-	-	+	+

+ développement de la maladie
- absence de développement de la maladie

Cette complexité des interactions entre les différentes souches du champignon et les différentes variétés de pommier traduit bien le fait que le champignon évolue génétiquement en fonction des variétés de pommier auquel il est confronté et des gènes de résistance portés par ces variétés. Ce mécanisme évolutif est très similaire au mécanisme d'évolution des bactéries pathogènes en milieu hospitalier qui deviennent progressivement résistantes aux antibiotiques par un phénomène de sélection des souches bactériennes les mieux adaptées à faire face aux contraintes du milieu dans lequel elle se trouve. En quelque sorte, le champignon *Venturia inaequalis* n'a pas d'autre issue que de contourner le(s) gène(s) de résistance porté(s) par la variété de pommier ou de disparaître. Les gènes de résistance du pommier apparaissent donc comme des forces évolutives qui « conduisent » l'évolution du champignon vers sa disparition du verger commercial ou vers sa modification génétique lui permettant de contourner ces gènes de résistance.

Ariane est l'une des dernières innovations variétales de l'INRA d'Angers. De très bonne qualité gustative, elle connaît un fort succès de plantation (Laurens *et al*., 2005). Ariane possède deux gènes de résistance à la tavelure (*Vf* et *Vg*). Au travers des tests réalisés en conditions contrôlées à l'INRA d'Angers, nous savons qu'elle est attaquée par la race 6 du parasite qui est présente dans plusieurs pays européens y compris dans le Nord-Ouest de la France (Parisi *et al*., 2004). Le développement commercial de cette variété, et de toute future variété portant le gène *Vf*, s'accompagne donc de préconisations pour limiter en verger les risques de développement de souches virulentes dans les régions où elles sont encore absentes ou peu fréquentes. Les préconisations insistent sur : (i) la destruction de la litière foliaire en hiver (pour réduire l'inoculum potentiel de la saison suivante) et (ii) la réalisation de traitements phytosanitaires ciblés sur les plus forts risques de contamination pendant la période végétative.

Face à cette situation, des programmes de recherche d'amont portant d'une part sur la diversité du champignon et d'autre part sur les bases génétiques du pommier ont été mis en place à l'INRA d'Angers depuis une dizaine d'années afin d'apporter des informations pour tenter de créer des variétés portant une résistance plus durable et de définir les conditions de leur déploiement sur le territoire pour prolonger cette durabilité. Depuis peu, nous modélisons l'impact du déploiement spatial des variétés résistantes sur la vitesse de progression de la maladie afin de prolonger la durée de vie des gènes de résistances.

Facteurs de risque favorables au contournement des résistances dans le pathosystème « pommier x tavelure » :

- Relation de type « gène pour gène » : cela signifie que la mutation d'un seul gène chez le champignon (gène d'avirulence) peut conduire à la perte d'efficacité du gène de résistance majeur correspondant.
- Système de reproduction mixte :
  - une reproduction sexuée chaque année, obligeant le champignon à se recombiner ce qui peut lui permettre d'accumuler des niveaux supérieurs de virulence ou d'agressivité
  - une très forte reproduction clonale en cours de saison, permettant au champignon d'atteindre des tailles de populations gigantesques ce qui favorise les risques de mutation et son caractère invasif.
- Pérennité du système de culture permettant l'installation progressive des nouvelles souches virulentes même si celles-ci sont peu agressives
- Présence de nombreux hôtes potentiels dans le compartiment sauvage permettant de maintenir des sources d'inoculum voire de nouvelles virulences

2.) Des recherches d'amont au service de la création et du déploiement de nouvelles variétés résistantes

2.1) Diversité génétique, structuration et variabilité du pouvoir pathogène du champignon

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interaction entre le pommier et le champignon *Venturia inaequalis* est complexe et c'est seulement une fois confronté aux populations naturelles présentes au verger que le caractère durable de la résistance du pommier va pouvoir être effectivement évalué. Notre objectif est d'identifier le plus précocement possible les résistances qui pourront être les plus durables.

Ceci nécessite de bien connaître la biologie du champignon (diversité, dispersion) et ses capacités à contourner les facteurs de résistance.

Diversité :

Evaluer la diversité génétique d'un pathogène et comprendre son fonctionnement nécessitent de l'étudier dans son centre d'origine (« centre de diversité ») où il a co-évolué avec son hôte. En analysant plus de 1 500 souches de *V. inaequalis* échantillonnées sur les cinq continents, nous montrons que la tavelure du pommier est originaire d'Asie Centrale (Ouest de la Chine, Kazakhstan), qui est également le centre de diversité du pommier (domestiqué à partir de *Malus sieversii*). Nos résultats basés sur des analyses d'empreintes génétiques montrent que la tavelure aurait voyagé avec son hôte, le pommier, via les activités humaines par la route de la Soie pour coloniser l'Europe. L'Europe aurait ensuite servi de plaque tournante pour contaminer les autres continents via les activités économiques. La diversité génétique du champignon est maximale dans son centre d'origine, la forte diversité mise en évidence en Europe s'explique par les introductions répétées en provenance de l'Asie. Par exemple, pour 100 souches échantillonnées sur une variété de pommier sensible à la tavelure, il est très fréquent de pouvoir en différencier au moins 90 à l'aide d'empreintes génétiques (Figure 2). Ces informations sur l'historique de l'invasion du champignon nous sont très utiles lorsqu'il s'agit de comprendre le processus invasif de nouvelles virulences.

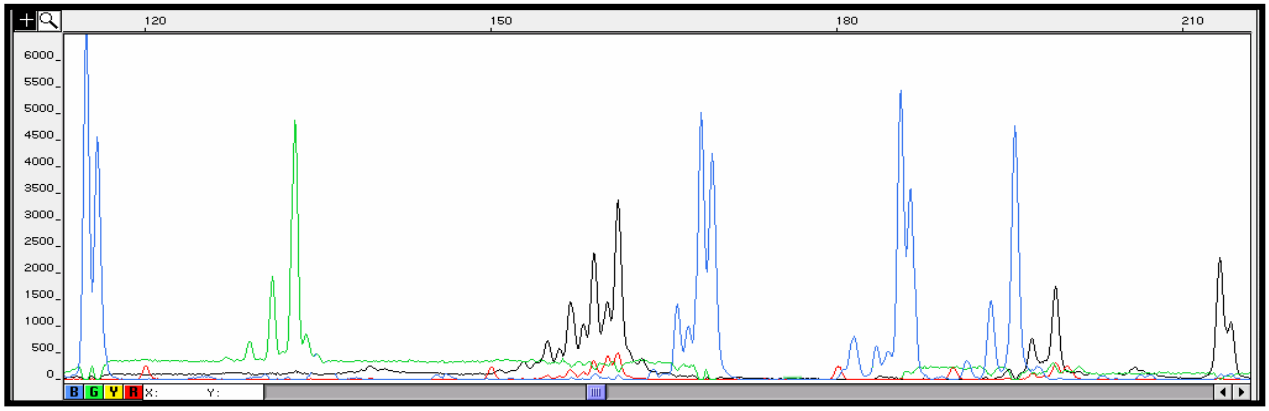
V. inaequalis a été identifié sur plusieurs espèces hôtes : des espèces sauvages apparentées au pommier, comme *Malus sylvestris* que l'on trouve dans les forêts européennes, ainsi que d'autres espèces de Rosacées (Pyracantha et Néflier du Japon, notamment) qui sont utilisées comme plantes ornementales. Nous nous posons donc la question du rôle de ces espèces hôtes dans les épidémies de tavelure en vergers de pommier et cherchons à déterminer si des facteurs de résistance chez le pommier cultivé peuvent être contournées par des souches qui seraient hébergées sur ces autres espèces d'hôtes. Pour cela, nous menons des études sur le spectre d'hôtes de *V. inaequalis* afin de déterminer si une souche présente sur un hôte donné est capable de se développer sur les autres hôtes ou s'il existe des barrières à l'infection. La prise en compte de la diversité de *V. inaequalis* dans le compartiment sauvage nous renseignera sur les risques épidémiologiques générés par la présence des plantes-hôtes non cultivées dans le maintien de sources d'inoculum voire dans l'apparition de nouvelles virulences.

Cette étude sur la diversité nous permet de choisir un panel de souches le plus représentatif possible de la diversité du champignon. Ces souches sont alors inoculées en conditions contrôlées sur des génotypes de pommier afin d'identifier les facteurs de résistance ou combinaisons de facteurs de résistance les plus intéressants, c'est-à-dire résistants à l'ensemble des souches testées.

Dispersion :

La tavelure est connue pour se disséminer sur de faibles distances, et nos études menées à l'échelle mondiale montrent qu'elle a besoin d'un vecteur - l'homme - pour voyager sur de longues distances, à la différence de certains champignons connus pour leur grande mobilité. A une échelle plus réduite, des travaux de recherche menés sur des populations contournant le gène de résistance *Vf* présent dans la variété Judeline montrent que la dispersion de la virulence en Normandie puis en Bretagne ne s'est pas faite de proche en proche mais de manière aléatoire. Sans pouvoir écarter la possibilité de migration rare sur de longues distances, une fois encore le rôle des activités humaines ne serait pas à négliger dans la dispersion de la maladie (Guérin et Le Cam, 2004 ; Guérin *et al*., 2007). L'évaluation la plus précise possible des modalités de dispersion de *V. inaequalis* est très importante dans nos réflexions sur la stratégie de déploiement spatial des résistances.

Figure 2 *: Empreinte génétique d'une souche de Venturia inaequalis obtenue à l'aide de marqueurs de type 'microsatellite' développés sur séquenceur capillaire.*



Structuration des populations :

Ces études de « structuration » visent à comprendre comment, dans la nature, les gènes de résistance agissent sur les populations pathogènes. On cherche à évaluer si les gènes de résistance filtrent les souches capables de les attaquer ou si au contraire ils n'exercent aucune pression sélective. A titre d'exemple, la variété Gala connue comme étant très sensible à la tavelure nous apparaît être une variété n'exerçant pas de pression de sélection sur les populations, elle semble être capable d'héberger l'ensemble des souches présentes dans son environnement. Elle représente un bon révélateur de la diversité existante dans un verger donné. En revanche, si on s'intéresse aux souches capables de surmonter le gène de résistance *Vf*, on s'aperçoit qu'elles ne représentent qu'une sous-population de *V. inaequalis*. Cette population est dite « structurée ». Cette structuration s'observe aussi bien à l'échelle régionale qu'européenne (Guérin *et al*., 2004 ; Guérin *et al*., 2007).

A présent, dans le cadre de la construction de génotypes résistants, nous cherchons à savoir si certains gènes de résistance à effet partiel ont également un effet structurant sur les populations telles que nous l'avons mis en évidence avec le gène majeur *Vf*. Identifier et caractériser des gènes qui auraient des impacts qualitatifs différents sur les populations nous permettraient d'orienter le choix de gènes à effets complémentaires afin de les cumuler dans un même génotype et ainsi augmenter leur durabilité.

Relation entre pouvoir pathogène et capacité de contournement :

Une question se pose régulièrement dans les cas de contournement de gènes de résistance par des pathogènes : « est-ce que la capacité du pathogène à contourner un gène de résistance se traduit corrélativement par une moindre capacité à se multiplier pour ce pathogène ? ». En effet, le fait que le champignon ait acquis (probablement par mutation) la capacité à contourner le gène X pourrait se traduire par un coût au niveau de son métabolisme qui le limiterait dans sa capacité à se multiplier. Une souche incapable de contourner le gène X pourrait ainsi en moyenne produire des milliers de spores après infection d'une variété sensible, alors qu'une souche virulente infectant cette même variété pourrait ne produire que des centaines de spores ou encore des spores moins viables en moyenne. Cette question du coût de la virulence est une question qui devient centrale dans les approches actuelles pour lutter contre les pathogènes au moyen des variétés résistantes. En effet, cumuler plusieurs gènes de résistance dans une même variété par un jeu de croisements successifs comme décrit dans le chapitre 2.3 peut s'avérer rapidement inefficace si le champignon a la capacité de se croiser chaque année et de cumuler des facteurs de virulence comme dans le cas du champignon *V.*

inaequalis. Ceci est vrai sauf si le cumul de facteurs de virulence finit par coûter trop cher au champignon dans sa capacité à se multiplier. Dans ce cas, la variété résistante, même si elle finit par être contournée par une nouvelle race multi-virulente, pourrait rester peu attaquée pendant plus longtemps. Ce thème de recherche est abordé depuis quelques années sur notre Centre de recherche et va prendre de l'ampleur dans les années qui viennent.

Ainsi, explorer et mieux caractériser la variabilité génétique du champignon, connaître son spectre d'hôte, les sources d'inoculum, la manière dont les souches se dispersent et s'adaptent aux gènes de résistances représente un ensemble d'informations extrêmement utile pour mieux réfléchir au type de nouvelles variétés résistantes à créer et à la manière dont il faut les déployer dans l'espace.

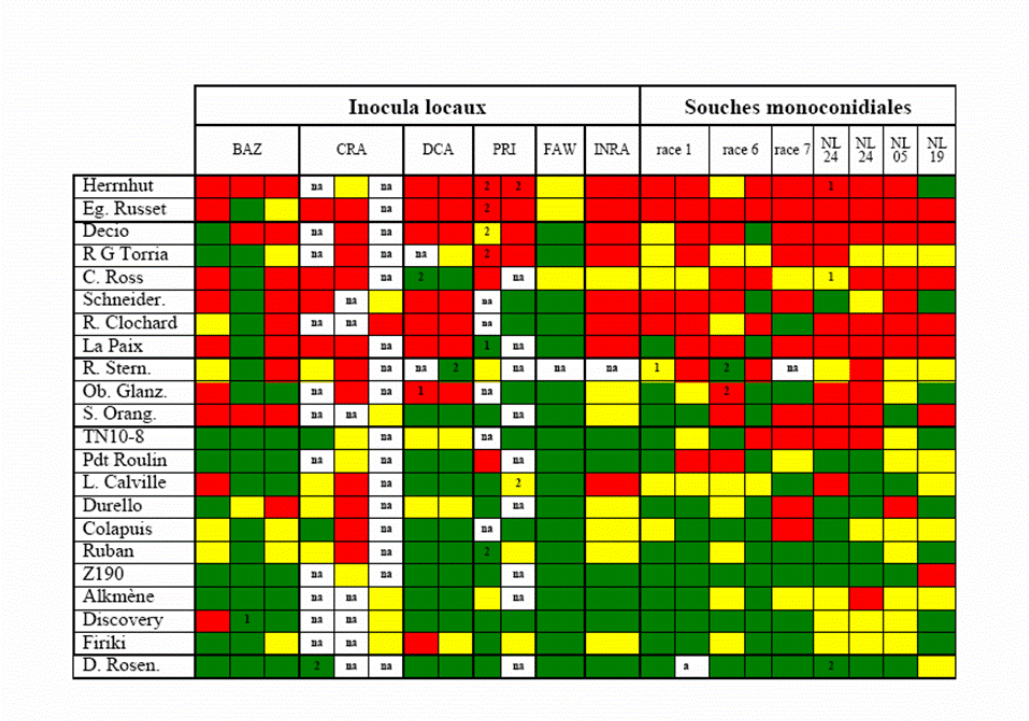
2.2) Recherche de nouveaux facteurs de résistance à la tavelure et localisation sur le génome

Deux grands types de résistance à la tavelure existent chez le pommier domestique et les espèces de pommier sauvage apparentées : la résistance de type « tout ou rien » conférée par un gène 'majeur' (résistance monogénique), et la résistance partielle généralement sous contrôle polygénique. En plus du gène majeur *Vf* cité ci-dessus, d'autres gènes majeurs de résistance à la tavelure ont été identifiés au sein du genre *Malus* (gènes *Vm, Vh2, Vh4, Vb, Vbj, Vg, Vfh,* …). Ils confèrent en général une résistance totale vis-à-vis de certaines souches du champignon, mais peuvent être contournés par d'autres souches qui correspondent à une (ou plusieurs) race(s) différente(s). On parle alors de résistance spécifique. Des variétés de pommier portant une résistance partielle à la tavelure sont aussi connues (Rouchetaude, Antonovka, …). On considère souvent que leur résistance repose sur l'effet conjoint de plusieurs gènes de résistance à effet partiel, ce qui rendrait cette résistance plus durable vis-à-vis de l'évolution potentielle du champignon. On parle alors de résistance générale.

Pour rechercher et caractériser ces sources de résistance, une première étape consiste à cribler les collections de pommier domestique et sauvage dont nous disposons à l'INRA d'Angers pour identifier des individus résistants. Ce screening est réalisé en prenant en compte la variabilité du pathogène. A titre d'exemple, le screening d'une vingtaine de variétés européennes connues pour leur bonne résistance à la tavelure sur le terrain a été réalisé en les inoculant en serre avec des souches de *V. inaequalis* venant de différents pays européens (Tableau 2 ; Laurens *et al*., 2004). Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet de recherche européen appelé DARE ('Durable Apple Resistance in Europe' ; Lespinasse *et al*., 2000). Grâce à ce screening, quelques variétés sont apparues complètement résistantes ou très légèrement sensibles aux différentes souches inoculées (par exemple, Discovery ou Dülmener Rosenapfel). Ces variétés étaient donc des cibles d'étude particulièrement intéressantes pour deux objectifs de recherche : (i) identifier et caractériser les gènes de résistance (majeure ou partielle) portés par ces variétés, (ii) étudier les éventuelles interactions entre ces gènes pour comprendre si la résistance de ces variétés tient à la combinaison des gènes en jeu ou à l'effet propre de ces gènes.

Ces deux objectifs correspondent à l'étude du déterminisme génétique de la résistance du pommier à la tavelure. Pour un ensemble de variétés de pommier, on cherche à connaître le nombre de gènes impliqués dans le niveau de résistance à la tavelure, l'effet relatif de ces différents gènes, leur position sur les chromosomes, leurs interactions potentielles (effets synergiques de la combinaison de certains gènes). Une des particularités du travail que nous réalisons à Angers est de mener cette étude de déterminisme en prenant largement en compte la variabilité du pathogène (Cf. chapitre 2.1): ceci nous amène par exemple à observer que certains gènes à effet partiel sont actifs vis-à-vis de toutes les souches de *V. inaequalis* inoculées (gènes de résistance à spectre large), alors que d'autres gènes à effet partiel sont efficaces vis-à-vis de certaines souches mais inefficaces vis-à-vis d'autres (gènes de résistance à spectre plus étroit).

Tableau 2 *: Synthèse des résultats des tests de résistance à la tavelure d'une gamme de variétés de pommier réalisés en serre dans le cadre du programme DARE de 1998 à 2001 (d'après Laurens et al., 2004). Le code couleur indique le niveau de résistance/sensibilité des variétés par rapport aux souches testées : rouge = forte sensibilité, jaune = faible sensibilité, vert = résistance totale (na : données non disponibles).*



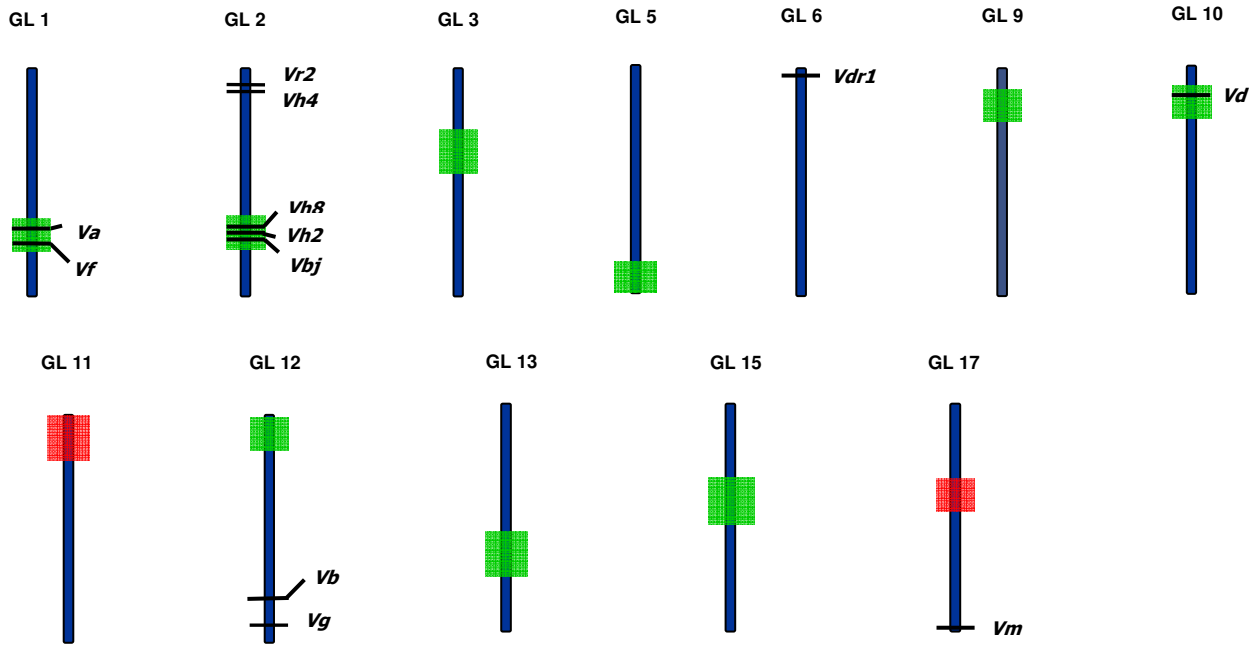
Pour réaliser une étude de déterminisme génétique, nous réalisons un croisement contrôlé entre une variété résistante et une variété sensible à la tavelure (ou éventuellement entre deux variétés qui résistent à des souches différentes du champignon). Les pépins issus du croisement contrôlé forment une descendance d'individus frères. Après semis des pépins et croissance des plantes qui en sont issues, nous réalisons deux activités en parallèle : (i) d'une part nous multiplions chaque individu par greffage pour réaliser des tests en serre ou en verger (phénotypage), (ii) d'autre part nous prélevons un échantillon de feuilles sur chaque individu pour en extraire l'ADN et réaliser des empreintes génétiques propres à chaque individu (génotypage). Les tests en serre (respectivement en verger) sont réalisés par inoculation artificielle (resp. naturelle) avec différentes souches du champignon et nous permettent de classer les individus « frères » les uns par rapport aux autres en terme de niveau de résistance à la tavelure. Les tests ADN nous fournissent des marqueurs génétiques dont la combinaison est propre à chaque individu. En reliant (en corrélant) les données de tests en serre ou en verger et les données de marqueurs génétiques, nous pouvons obtenir les informations de déterminisme génétique que nous souhaitons. En effet, les données de marqueurs moléculaires peuvent être traitées par des logiciels informatiques spécifiques pour construire une carte génétique du pommier : cette carte correspond à un balisage des chromosomes grâce aux marqueurs moléculaires, comme des bornes kilométriques qui jalonneraient une route sur une carte routière. Si on observe que les individus les plus résistants à la tavelure présentent aussi un marqueur particulier, alors que les individus les plus sensibles ne présentent pas ce marqueur, alors c'est qu'il y a au voisinage de ce marqueur sur la carte génétique (donc sur le chromosome ainsi marqué) un gène qui contrôle le niveau de résistance des descendants du croisement. Inversement si un marqueur est présent ou absent autant chez les individus résistants que chez les sensibles, alors on peut conclure qu'il n'y a pas de gène de résistance au voisinage de ce marqueur sur ce chromosome. Ici encore, des logiciels informatiques spécifiques permettent de traiter

ces données de terrain et de marqueurs moléculaires pour conclure sur le nombre, l'effet et la position des gènes de résistance sur la carte génétique du pommier.

Une descendance de cartographie génétique classique comprend 150 à 200 individus pour chacun desquels il faut générer un minimum de 100 marqueurs génétiques bien répartis sur les chromosomes (soit 15 000 à 20 000 points de génotypage). En parallèle, les tests en serre sont réalisés sur plusieurs copies greffées de chaque individu de manière à avoir des répétitions pour mieux apprécier les différences de niveau de résistance entre les individus. La prise en compte de la variabilité du champignon implique de répéter ces tests plusieurs fois avec des souches différentes (aussi contrastées que possible). Enfin, les tests en serre ne suffisent pas et l'évaluation du niveau de résistance des individus sur le terrain est nécessaire pour se situer dans des conditions réelles de culture et pour évaluer le niveau de résistance des fruits (les tests en serre étant réalisés uniquement sur pousses en croissance, c'est-à-dire sur les feuilles). C'est donc un travail lourd et de long terme qui est à réitérer lorsque l'on veut analyser le déterminisme génétique d'une nouvelle variété résistante.

Le travail que nous avons réalisé jusqu'à présent a surtout porté sur une première descendance issue d'un croisement entre une variété anglaise connue pour son excellent niveau de résistance à la tavelure (variété 'Discovery') et un hybride créé à l'INRA d'Angers ('TN10-8') qui dérive d'un croisement entre une variété locale tolérante à la tavelure ('Reinette Clochard') et une variété russe elle aussi connue pour sa très bonne résistance ('Antonovka') (Lespinase, 1989). Un gène majeur porté par Discovery a été localisé sur l'un des chromosomes, et plusieurs gènes à effet partiel portés soit par Discovery soit par TN10-8 ont été localisés sur d'autres chromosomes (Calenge *et al*., 2004). En particulier, un gène de résistance partielle hérité d'Antonovka a été localisé sur la même région chromosomique que celle où se situe le gène *Vf*. D'autres co-localisations similaires de gènes majeurs cartographiés par ailleurs et de gènes à effet partiel ont aussi été observées sur d'autres chromosomes. Ces différentes informations nous permettent ainsi de mieux comprendre l'organisation génomique des facteurs de résistance à la tavelure. Le travail actuel se poursuit sur d'autres descendances issues de croisements contrôlés entre d'autres variétés résistantes et sensibles. En regroupant l'ensemble des travaux menés à l'INRA d'Angers et ceux menés par d'autres équipes de recherche qui travaillent sur le même sujet dans le monde, on peut représenter schématiquement la position et les caractéristiques des gènes de résistance sur une carte génétique synthétique du pommier (Figure 3).

Figure 3 *: Représentation schématique des chromosomes du pommier avec localisation des gènes de résistance à la tavelure : résistance majeure (Va, Vf, etc) et résistance partielle (rectangles verts ou rouges selon leur spectre d'action étroit ou large, respectivement). La position des gènes de résistance partielle est plus imprécise que celle des gènes majeurs, d'où la localisation représentée par des rectangles. Voir aussi la synthèse faite par Gessler et al. (2006).*



2.3) Combinaison de nouveaux facteurs de résistance dans une même variété

L'ensemble des informations acquises sur le déterminisme génétique de la résistance du pommier à la tavelure doit ensuite nous permettre de créer par croisement de nouvelles combinaisons génétiques inédites. Grâce aux marqueurs génétiques, on peut suivre la transmission héréditaire des gènes de résistance depuis les parents vers les descendants et ne retenir parmi ceux-ci que les individus qui cumulent un nombre souhaité de gènes. Cette approche, couramment appelée Sélection Assistée par Marqueurs (SAM), est en cours de mise en œuvre à l'INRA d'Angers.

Nous avons initié la sélection assistée par marqueurs en travaillant sur un pedigree à 3 générations : nous avons croisé les meilleurs individus de la descendance 'Discovery x TN10-8' par les meilleurs individus d'une seconde descendance cartographiée 'Prima x Fiesta' (Durel *et al*., 2003). Discovery, TN10-8, Prima et Fiesta représentaient ainsi les grands-parents du pedigree. Leurs meilleurs descendants, qui cumulaient tous les gènes de résistance (majeure ou partielle) détectés chez leurs parents respectifs, représentaient les parents du pedigree. Les pépins, puis les jeunes plants, qui résultaient de ces croisements représentaient les enfants de 3ème génération.

La transmission des gènes depuis les grands-parents, à travers les parents vers les enfants, pouvait être suivie grâce aux marqueurs génétiques. Ceux-ci nous ont permis de sélectionner quelques individus (enfants) qui cumulaient un maximum de gènes de résistance hérités de leurs différents grands-parents.

La même démarche a été engagée sur un autre plan de croisement impliquant des parents portant d'autres facteurs de résistance. L'objectif de ce plan de croisement est de générer un maximum de combinaisons différentes de gènes de résistance au niveau des descendants pour disposer d'un

ensemble de « prototypes » génétiques dont la composition est suivie grâce aux marqueurs génétiques. L'étude de ces prototypes devrait nous permettre de mieux comprendre les interactions entre les gènes de résistance au sein des différentes combinaisons et leur influence sur le niveau de résistance à la tavelure.

L'évaluation du niveau de résistance de ces différents individus va être engagée dès l'an prochain en les confrontant à une gamme de souches de *V. inaequalis* aussi large et diverse que possible. L'objectif sera alors de chercher à identifier des combinaisons de facteurs de résistance difficilement contournables par le champignon. Ces études seront menées en articulation étroite avec les études menées sur la variabilité du pouvoir pathogène et décrites dans le chapitre 2.1.

Pour acquérir suffisamment de données, il est bien sûr nécessaire de pouvoir générer les marqueurs génétiques avec des technologies de haut-débit. Ces technologies haut-débit de marquage génétique sont accessibles en particulier au niveau de plateformes de génotypage comme celles de l'INRA de Clermont-Ferrand et de OUEST-genopole à l'INRA de Rennes. Elles sont basées sur une robotisation des opérations et sur l'utilisation de suite de logiciels permettant de générer de manière rapide et fiable les données de génotypage. Face à cette accélération de la production d'information génotypique, le challenge est aujourd'hui de pouvoir acquérir plus rapidement des données de tests pathologiques.

2.4) Modélisation de l'évolution du champignon et conséquence pour la création variétale et le déploiement de nouvelles variétés

Une autre approche est développée au niveau du Centre INRA d'Angers. Il s'agit de l'utilisation de la modélisation mathématique qui permet de simuler différentes situations biologiques et d'analyser les résultats de simulation pour mieux réfléchir aux stratégies de cumul de gènes de résistance et de déploiement des nouvelles variétés résistantes sur le terrain, au niveau du verger, de l'exploitation ou du bassin de production.

L'objectif est de comprendre la dynamique invasive des populations virulentes en relation avec la composition génétique des peuplements de pommier et de leur organisation spatiale. Nous avons ainsi construit un modèle général sur le processus invasif des pathogènes, ainsi qu'un logiciel permettant d'analyser des données épidémiologiques. La dynamique évolutive du champignon est modélisée à partir d'équations mathématiques qui prennent en compte différents paramètres :

(i) la diffusion des souches dans l'espace,
(ii) leur croissance et leur mortalité,
(iii) leur recombinaison génétique cyclique (reproduction sexuée entre les souches),
(iv) la répartition spatiale et la croissance pluri-annuelle des variétés hôtes,
(v) la présence/absence de plusieurs gènes majeurs de résistance chez les variétés hôtes,
(vi) le coût de virulence pour les souches combinant plus ou moins de facteurs de virulence contournant ces gènes de résistance.

Ce modèle nous a déjà permis de montrer le rôle très important que joue la répartition spatiale de variétés de pommier portant des gènes de résistance majeurs différents pour limiter le développement de souches multi-virulentes du champignon. Le type de distribution spatiale des variétés influence fortement l'efficacité même des gènes de résistance qu'ils portent. Nous montrons en effet qu'il influence directement la structure génétique de la population pathogène. Par exemple, notre étude démontre qu'un mélange aléatoire de variétés portant différents gènes majeurs de résistance a une efficacité équivalente à une variété portant une combinaison de ces gènes. Ces premiers résultats permettent d'enrichir notre réflexion sur des stratégies innovantes de déploiement optimum de gènes de résistance pour prolonger leur durabilité et prévenir l'apparition de nouvelles races de pathogènes.

Conclusion

Pour des raisons de simplicité de mise en œuvre, la création de variétés de pommier résistantes à la tavelure s'est jusqu'à présent majoritairement appuyée sur l'utilisation de résistances monogéniques, principalement le gène *Vf* issu de *Malus floribunda*. La simplicité de mise en œuvre a été toute relative puisqu'il a fallu près de 60 ans pour dériver des variétés commerciales de haut niveau agronomique à partir du croisement initial. Le contournement de ce gène par des souches virulentes du champignon *V. inaequalis* semble remettre en cause des années d'effort de sélection. En réalité, le gène Vf combiné à d'autres gènes de résistance (partielle en particulier) doit pouvoir être valorisé dans la suite des programmes de sélection. Le contournement de *Vf* confirme en tout cas les risques encourus à n'utiliser qu'un ou deux gènes de résistance majeurs dans une nouvelle variété, en particulier chez une espèce pérenne comme le pommier conduite en culture monoclonale pour 15 à 20 ans minimum en verger commercial. Pour les variétés de très bonne qualité agronomique et porteuses de résistances « simples » qui sortent actuellement sur le marché, il est important de mettre en œuvre des stratégies de lutte et de conduite de verger permettant de limiter les risques de contournement.

Créer des variétés à résistance durable ne peut se faire aujourd'hui sans l'apport scientifique conjoint de recherches d'amont portant sur la compréhension des interactions plante x pathogène, la connaissance de la diversité génétique et du pouvoir pathogène du champignon, l'exploration du déterminisme génétique de la résistance et son exploitation par cumul de gènes de différents types, la mesure des pressions de sélection exercées par ces gènes ou combinaisons de gènes de résistance, la recherche de scénario optimum de création et de déploiement spatiale des variétés par modélisation mathématique. La tâche peut paraître difficile, mais les outils modernes à disposition des chercheurs, comme les marqueurs génétiques, les logiciels d'analyse de données ou de simulation mathématique, l'accès à plus ou moins court terme aux séquences du génome des deux espèces doivent permettre de relever ce défi.

En particulier, la modélisation mathématique s'appuyant sur les connaissances biologiques et génétiques doit permettre de raisonner sur les stratégies optimales en terme de constructions de variétés résistantes avant de les répercuter concrètement au niveau du programme d'amélioration du pommier. A plus long terme, ces stratégies doivent aussi intégrer les consignes qui seront à donner aux arboriculteurs en terme de déploiement variétal et d'itinéraires techniques pour ces nouvelles variétés sur le terrain, au niveau du verger, de l'exploitation ou du bassin de production. Cette phase devra bien évidemment se faire en concertation étroite avec la profession et nécessiter les compétences d'économistes et de spécialistes en aménagement du paysage.

Références bibliographiques

Bénaouf G., Parisi L., 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* races 6 and 7 and *Malus* species. Phytopathology 90: 236-242.

Calenge F., Faure A., Goerre M., Gebhardt C., Van de Weg W.E., Parisi L., Durel C.-E., 2004. Quantitative Trait Loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 94: 370-379.

Durel C.E., Parisi L., Laurens F., van de Weg W.E., Liebhard R., Jourjon M.F., 2003. Genetic dissection of partial resistance to race 6 of *Venturia inaequalis* in apple. Genome 46: 224-234.

Gessler C., Patocchi A., Sansavini S., Tartarini S., Gianfranceschi L., 2006. *Venturia inaequalis* resistance in apple. Critical Rev Plant Sci. 25: 473-503.

Guérin F., Gladieux P., Le Cam B., 2007. Origin and colonization history of newly virulent strains of the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. Fungal Genet. Biol. 44: 284-292.

Guérin F., Franck P., Loiseau A., Devaux M., and Le Cam B. 2004. Isolation of 21 new microsatellite loci in the phytopathogenic fungus *Venturia inaequalis*. Molecular Ecology Notes 4: 268-270.

Guérin F., Le Cam B., 2004. Breakdown of the scab resistance gene *Vf* in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. Phytopathology 94: 364-369.

Janick J., 2006. The PRI Apple Breeding Program. Hortscience 41: 8-10.

Laurens F., 1999. Review of the current apple breeding programmes in the world: objectives for scion cultivar improvement. Acta Hort. 484: 163-170.

Laurens F., Pitiot C., 2003. French apple breeding program: a new partnership between INRA and the nurserymen of Novadi. Acta Hort. 622: 575-582.

Laurens F., Chevalier M., Dolega E., Gennari F., Goerre M., Fischer C., Kellerhals M., Lateur M., Lefrancq B., Parisi L., Shouten H.J., Tartarini S., 2004. Local European cultivars as sources of durable scab resistance in apple. Acta Hort. 663: 115-122.

Laurens F., Lespinasse Y., Fouillet A., 2005. A new scab-resistant apple: 'Ariane'. Hortscience 40: 484-485.

Lespinasse Y., 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. Genes, resistance mechanisms, present work and prospects. In: Integrated Control of Pome Fruit Diseases. Vol II. C. Gessler, D.J. Butt and B. Koller, eds. pp 100-115.

Lespinasse Y., Durel C.-E., Parisi L., Laurens F., Chevalier M., Pinet C., 2000. A European project: D.A.R.E. - Durable Apple Resistance in Europe. Acta Hort. 538: 197-200.

Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J., Krüger J., 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene. Phytopathology 83: 533-537.

Parisi L., Lespinasse Y., 1996. Pathogenicity of *Venturia inaequalis* strains of race 6 on apple clones (*Malus* sp.). Plant Disease 80: 1179-1183.

Parisi L., Fouillet V., Schouten H.J., Groenwold R., Laurens F., Didelot F., Evans K., Fischer C., Gennari F., Kemp H., Lateur M., Patocchi A., Thissen J., Tsipoudiris C., 2004. Variability of pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. Acta Hort. 663: 107-113.

Roberts A.L., Crutes I.R., 1994. Apple scab resistance from *Malus floribunda* 821 (Vf) is rendered ineffective by isolates of *Venturia inaequalis* from *Malus floribunda*. Norw. J. Agric. Sci. 17: 403-406.