

Apport de l'innovation variétale dans la réduction des intrants phytosanitaires au vignoble :

exemple de la résistance au mildiou et à l'oïdium

Didier MERDINOGLU - Sabine MERDINOGLU-WIEDEMANN - Pedro. MESTRE

Emilie PRADO - Christophe SCHNEIDER

UMR 1131 Santé de la Vigne et Qualité du Vin Colmar
INRA-ULP, 28 rue de Herrlisheim, BP 20507, 68021 Colmar cedex
<http://www.colmar.inra.fr/pages/SVQV.html>

ENJEUX ET STRATÉGIES ASSOCIÉS À LA CRÉATION DE VARIÉTÉS DE VIGNE RÉSISTANTES AUX BIOAGRESSEURS

La protection contre les agents pathogènes de la vigne est actuellement essentiellement réalisée par des moyens de lutte chimique, la viticulture se situant au second rang sur le marché des produits phytosanitaires après les céréales. Malgré son efficacité pour limiter les pertes de récolte quantitatives et qualitatives, ce moyen de protection des plantes peut générer des effets directs ou indirects indésirables sur :

- 1) la qualité des vins (anomalies de goût, diminution de richesse en sucre et destruction des arômes variétaux...),
- 2) l'environnement (accumulation des résidus de pesticides dans le sol, perturbation des équilibres microbiens et de la flore auxiliaire),
- 3) la santé humaine (présence de résidus de matières actives dans le vin, l'eau, l'atmosphère),
- 4) le bénéfice du viticulteur, les traitements représentant jusqu'à 50 % des charges d'approvisionnement des exploitations.

L'un des enjeux majeurs pour la viticulture française est donc clairement la maîtrise des applications de produits phytosanitaires, tout en maintenant une haute exigence sur la qualité du produit. La réduction de l'usage des produits phytosanitaires dans la culture de la vigne est ainsi un enjeu qui va au-delà de la protection de l'environnement, se situant au carrefour de plusieurs politiques publiques : compétitivité de la filière, qualité de l'eau et des sols, biodiversité, santé humaine, développement durable. La création de variétés de vigne résistantes constitue une des voies pour répondre à cet enjeu, l'usage de variétés adaptées autorisant le développement d'une viticulture durable et plus respectueuse de l'environnement, sans effet préjudiciable pour sa rentabilité. En effet, la stratégie française actuelle du "tout pesticide" n'est pas forcément celle adoptée par d'autres pays viticoles tels que l'Allemagne qui a mis en œuvre des programmes de sélection depuis plusieurs dizaines d'années ayant, à ce jour, abouti à des nouvelles variétés réunissant des résistances à l'oïdium et au mildiou (variétés Regent, Solaris, Bronner, Jhanniter...) et qui sont expérimentées dans d'autres pays européens.

L'INRA de Colmar s'est engagé dans un programme de sélection visant à créer une gamme de 6 à 12 variétés rouges et blanches, sans défaut de flaveur, adaptées aux trois ensembles viticoles français et cumulant plusieurs sources de résistance au mildiou et à l'oïdium. Cependant, la connaissance des bases génétiques, moléculaires et physiologiques des résistances naturelles chez la vigne est un pré-requis pour optimiser le processus de création variétale. C'est pourquoi, en soutien au programme d'innovation variétale, l'INRA a également mis en place un programme de recherche dont les objectifs majeurs sont l'identification et la localisation sur le génome des gènes ou des régions chromosomiques impliqués dans les résistances aux bioagresseurs, la caractérisation des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place lors de

l'interaction plante-pathogène dans les diverses sources de résistances disponibles. Ces éléments sont primordiaux pour accélérer la sélection et pour choisir les combinaisons de gènes les plus complémentaires en terme d'efficacité et de durabilité de résistance. A travers la stratégie dite de pyramidage consistant à associer plusieurs facteurs génétiques dans une même variété, l'INRA cherche donc à créer des variétés possédant une résistance de haut niveau et limitant les risques de contournement par les populations de pathogènes.

MOTIVATIONS, PRINCIPES ET OBJECTIFS DE L'INNOVATION VARIÉTALE

La sélection créatrice est un processus long et complexe qui vise à créer de nouvelles variétés à partir de ressources génétiques possédant des caractéristiques originales. En général, ce processus nécessite la mise en œuvre de deux étapes qui se succèdent, parfois plusieurs fois de suite en alternance : une étape de croisement ou d'hybridation, dont l'objectif est le brassage des gènes qui détermineront les caractéristiques des descendants ; une étape de sélection dont l'objectif est le choix des descendants qui présentent les caractéristiques les plus intéressantes. Avant d'engager un programme de sélection créatrice pour améliorer un caractère dans une espèce donnée, plusieurs critères doivent être remplis : la nécessité technique et/ou socio-économique d'améliorer le caractère ; la disponibilité de ressources génétiques possédant des formes favorables du caractère à améliorer ; la possibilité d'hybrider les ressources génétiques entre elles ; la maîtrise d'une méthode de caractérisation fiable pour évaluer le caractère à améliorer. Concernant le mildiou et l'oïdium, l'existence de ressources génétiques et la maîtrise de tests de résistance performants rendent l'amélioration génétique de la vigne possible pour la résistance à ces deux maladies. La question des maladies du bois est plus difficile à aborder car la mise au point de tests permettant d'évaluer les ressources génétiques est très récente et réalisée uniquement pour un nombre restreint de pathogènes. Pour les viroses graves, aucune résistance aux virus n'a été, à ce jour, identifiée dans les ressources génétiques disponibles. Dans ce dernier cas, la seule voie actuellement envisageable est la création de plantes génétiquement modifiées par l'utilisation de la stratégie de résistance dérivée du pathogène. En revanche, des résistances au nématode *Xiphinema index* vecteur du court-noué sont en cours d'étude.

Pour l'ensemble des raisons précédemment présentées, l'INRA a pris la décision en 2000 de relancer des programmes d'innovation variétale. L'objectif général de ce projet est de favoriser le développement d'une viticulture durable, économe et plus respectueuse de l'environnement. Il vise à réduire l'emploi des fongicides nécessaires au contrôle des deux maladies majeures de la vigne que sont le mildiou et l'oïdium par la création de variétés de vigne possédant une résistance efficace et durable et ayant une bonne qualité organoleptique. Afin d'éviter la déconvenue des hybrides producteurs directs créés dans la première moitié du XX^e siècle et d'augmenter les chances d'un succès rapide, ces programmes de sélection doivent s'appuyer sur des fondements scientifiques solides, notamment en ce qui concerne les bases génétiques des sources de résistance utilisées.

Ces recherches visent notamment à évaluer, d'une part, les ressources génétiques de la vigne et à caractériser les facteurs génétiques impliqués dans les résistances aux bioagresseurs, d'autre part, la diversité génétique des pathogènes et leur potentiel évolutif et à identifier les facteurs impliqués dans l'interaction avec la plante-hôte. Elles nous permettront de mieux appréhender l'efficacité des résistances et leur durabilité. Le déterminisme génétique de la qualité du raisin et des autres caractéristiques agronomiques importantes est également étudié. De ces connaissances découleront des méthodes qui permettront, d'une part, d'accélérer le processus de sélection en le réduisant de plusieurs années et d'autre part, de mieux orienter le choix des variétés durablement les plus résistantes et possédant également le meilleur potentiel qualitatif.

LES BASES GÉNÉTIQUES ET MOLÉCULAIRES DE LA RÉSISTANCE AU MILDIOU

L'étude des bases génétiques et moléculaires de la résistance de la vigne à *Plasmopara viticola*, Oomycète responsable du mildiou, constitue, à ce jour, notre principal objectif scientifique. Ce programme tente de prendre en compte le pathosystème « vigne-mildiou » comme un ensemble étudié via ses deux composantes. Les connaissances acquises sur d'autres pathosystèmes nous ont amenés à faire l'hypothèse que l'association de facteurs génétiques

différents ou complémentaires est susceptible de conférer une résistance plus efficace et plus durable. Le choix le plus pertinent des facteurs génétiques à combiner dans un même génotype nécessite alors la connaissance de leur fonction moléculaire et cellulaire, de leur spécificité, des mécanismes de réponse à l'infection et de leur effet biologique en prenant en compte les dimensions spatiales, temporelles et phénologiques.

Plusieurs sources naturelles de résistance au mildiou et à l'oïdium, sur lesquelles peut s'appuyer l'innovation variétale, ont été décrites dans les espèces de *Vitis* d'origines américaine et asiatique apparentées à la vigne cultivée européenne (*Vitis vinifera*). Afin d'aborder la caractérisation génétique de ces sources, une première phase du projet a consisté à développer un test biologique en conditions contrôlées permettant d'évaluer de façon reproductible et quantitative la résistance à *Plasmopara viticola*.

A l'aide de ce test, une collection de ressources génétiques comprenant des espèces de *Vitis* d'origines asiatique et américaine a été évaluée pour la résistance au mildiou. Une grande diversité de comportement a été observée tant au niveau interspécifique qu'au niveau intraspécifique, montrant que différentes espèces tant américaines qu'asiatiques possèdent des mécanismes de résistance au mildiou allant jusqu'à la résistance totale.

Des espèces résistantes au mildiou ayant été identifiées, nous avons entrepris l'étude de leur déterminisme génétique pour connaître le nombre de facteurs génétiques qui gouvernent la résistance, leur position sur le génome de la vigne, la manière dont ils agissent, seuls ou en interaction. Cette question est abordée par l'étude de descendances issues de croisements entre deux plantes aux caractéristiques opposées pour le trait étudié, en examinant à la fois leur phénotype, c'est-à-dire leurs caractéristiques pour le caractère étudié – ici, la résistance au mildiou – et leur génotype à l'aide de marqueurs moléculaires répartis sur le génome. L'analyse conjointe de ces deux éléments, phénotype et génotype, permet de localiser sur le génome, les gènes ou les régions chromosomiques impliquées dans le caractère étudié. Ces régions quand elles agissent sur des caractères quantitatifs sont appelées en anglais Quantitative Trait Loci (QTL), soit en français « loci ayant un effet sur un caractère quantitatif ». Dans un premier temps, l'espèce *Muscadinia rotundifolia*, apparentée aux vrais *Vitis*, a été étudiée du fait de son haut niveau de résistance et des populations disponibles à l'INRA de Montpellier. Après évaluation du niveau de résistance d'une population issue d'un croisement entre un descendant résistant de *Muscadinia rotundifolia* et la variété Syrah, un QTL expliquant 75 % de la variation totale du niveau de résistance observé a été identifié et cartographié sur le chromosome 12 du génome de la vigne. Cette région, du fait de son effet important sur la résistance, a été considérée comme un gène majeur et appelé *Rpv1*. *Rpv1* est situé au même locus que le gène *Run1* de résistance à l'oïdium précédemment décrit par Alain Bouquet. Afin d'isoler et de comprendre la fonction de ces deux gènes, l'INRA a initié l'isolement par clonage positionnel et l'étude de la fonction des gènes *Run1* et *Rpv1*, en collaboration avec une équipe australienne du CSIRO d'Adélaïde. A l'aide d'une seconde population de cartographie également dérivée de *Muscadinia rotundifolia*, un deuxième QTL majeur de résistance au mildiou, appelé *Rpv2*, a été identifié et localisé sur le chromosome 18. Par ailleurs, une nouvelle population issue d'une autre source de résistance au mildiou, *Vitis riparia*, a permis la mise en évidence de deux QTL à effet modéré répartis sur différents chromosomes.

Après avoir mis en évidence l'existence de ces facteurs génétiques de résistances, nous avons entrepris l'étude de leur effet spécifique sur le développement du pathogène et les mécanismes de réponse à l'infection mis en place. Les premières observations faites sur les effets respectifs de *Rpv1* et *Rpv2* nous ont amenés à penser que ces QTL ont un mode d'action différent sur *Plasmopara viticola* ou qu'ils agissent à des stades distincts de son développement. L'analyse cytologique de la progression de *P. viticola* dans les étapes précoces de l'infection permet de montrer que ces deux loci gouvernent des modes de résistances distincts : *Rpv2* provoque un arrêt rapide du développement de *P. viticola*, souvent 24 heures post-inoculation, ce qui inhibe toute possibilité de sporulation, alors que *Rpv1* ralentit sa progression sans la stopper. Pour comprendre les mécanismes de défense associés à ces QTL, nous avons entrepris d'effectuer l'analyse globale du transcriptome, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes exprimés dans une situation déterminée, visant à comparer différents génotypes sensibles et résistants au cours des stades successifs de l'infection par le pathogène. Ces données sont en cours d'analyse mais elles permettent dès à présent de montrer qu'un grand nombre de gènes voient leur expression

induite ou réprimée en réponse à l'attaque par *Plasmopara viticola* spécifiquement en présence de *Rpv1*, de *Rpv2* ou des deux QTL, alors que très peu de gènes voient leur expression modifiée spécifiquement dans les individus sensibles.

CRÉATION DE VARIÉTÉS DE VIGNE À RÉSISTANCE DURABLE AU MILDIU ET À L'OÏDIUM POUR LA PRODUCTION DE VINS DE QUALITÉ

Ce programme d'innovation variétale s'inscrit dans le prolongement des recherches poursuivies par l'INRA sur les pathosystèmes vigne-bioagresseurs et des collaborations engagées avec des équipes étrangères dans ce domaine. Il s'agit tout d'abord de valider les résultats relatifs aux bases génétiques et moléculaires de la résistance au mildiou et à l'oïdium, ainsi qu'à la diversité et au potentiel évolutif de ces agents pathogènes. L'objectif est aussi de valoriser ces recherches, en proposant à la filière viticole française des variétés adaptées à la réduction des intrants phytosanitaires.

La stratégie adoptée est focalisée sur l'efficacité et la durabilité des résistances et la qualité des produits. Elle repose en conséquence sur :

- 1) l'association par hybridation de plusieurs sources de résistance issues de *Vitis* sauvages, afin d'obtenir des résistances peu susceptibles d'être contournées ;
- 2) l'utilisation de géniteurs possédant majoritairement un fond génétique cultivé, afin de limiter les caractères agronomiques et technologiques défavorables pouvant provenir des espèces sauvages ;
- 3) la mise en œuvre d'un schéma de sélection mêlant génotypage, phénotypage et évaluation multilocale des génotypes créés.

Trois sources de résistance ont été retenues au démarrage du programme : *Muscadinia rotundifolia*, des *Vitis* américaines, *Vitis amurensis* (espèce asiatique). La première source est représentée par des génotypes de 4^e ou 5^e croisement par des variétés cultivées (BC4 ou BC5), obtenus par Alain Bouquet à l'INRA à Montpellier. Les deux autres correspondent à des variétés inscrites récemment au catalogue allemand ou à des géniteurs conservés par des instituts de recherche allemands. Le déterminisme génétique des résistances portées par ces espèces peut être monogénique (*Rln1*), oligogénique (par exemple *Rpv1* et *Rpv2*) ou polygénique. Il n'est pour l'instant pas possible de connaître avec précision quelles espèces de *Vitis* américaines interviennent réellement, car l'ascendance des géniteurs retenus fait intervenir jusqu'à 7 espèces et le déterminisme génétique des caractères de résistance mobilisés n'est pas connu dans sa totalité.

Le schéma de sélection a été largement revisité afin :

- 1) de tirer parti des possibilités offertes par la sélection assistée par marqueurs (sam),
- 2) de confronter les génotypes à des populations diversifiées de mildiou, d'oïdium et de pathogènes secondaires dans des conditions variées d'infection naturelle,
- 3) d'évaluer les aptitudes agronomiques et technologiques en deux stades seulement, de manière à raccourcir le processus.

Il est désormais organisé en 3 étapes, qui requièrent 16 années, soit une économie de 8 années par rapport à la procédure classiquement utilisée en amélioration de la vigne :

- Etape a : en serre (2 ans), la sélection s'opère principalement sur la résistance au mildiou et à l'oïdium et s'appuie sur un génotypage avec les marqueurs disponibles (sam), ainsi qu'un phénotypage complémentaire basé sur des tests de résistance.
- Etape b : une première évaluation au vignoble (6 - 8 ans), sur la base d'un dispositif en réseau avec 4 lieux (INRA Angers, Bordeaux, Colmar, Montpellier). Outre l'appréciation du niveau de résistance et de sa stabilité, il est possible dès ce stade d'évaluer les aptitudes culturales, le groupe de précocité, les caractéristiques gustatives du vin sur la base de microvinifications.
- Etape c : l'étude de la valeur agronomique et technologique (6 ans), conformément au règlement technique d'inscription au catalogue des variétés.

La première population de sélection a été créée en 2000, en collaboration avec un institut de recherche allemand. Elle combine deux sources de résistance, représentées par un géniteur BC4 de *M. rotundifolia* et la variété Regent N. inscrite au catalogue allemand en 1995. Les génotypes

ayant satisfait au tri précoce en serre ont été installés dans le réseau d'évaluation au vignoble (b) en 2004 et 2005. Grâce aux géniteurs regroupés à l'INRA Colmar, des populations d'effectifs beaucoup plus élevés ont été obtenues en 2005 et 2006, dont l'installation dans le réseau (b) est en cours. Ces dernières combinent trois sources de résistance.

Les premiers résultats enregistrés dans le dispositif en réseau montrent que les tests de résistance utilisés dans l'étape (a) pour quantifier la résistance au mildiou et à l'oidium sont relativement fiables, avec un taux de correspondance d'environ 75 %. La fiabilité des marqueurs de QTL de résistance est au moins aussi bonne pour le mildiou. Pour l'oidium en revanche, le marqueur du QTL issu de la variété Regent est associé à des niveaux de résistance plus variables. Il apparaît également que les individus porteurs des marqueurs de résistance des deux parents ne se distinguent pas phénotypiquement des individus porteurs de l'un ou l'autre seulement. Cela est cohérent avec l'effet majeur conféré par les seuls gènes *Rln1* et *Rpv1*, et met en évidence l'apport du marquage pour le pyramidage de résistances. Nous notons en outre que pour quelques génotypes, le niveau de résistance au mildiou observé à Bordeaux et à Colmar est sensiblement différent, ce qui témoigne d'une interaction particulière entre souches de mildiou présentes et facteurs de résistance. Enfin, les suivis de maturation réalisés en 2006 et 2007 indiquent que la gamme de précocité observée dans les descendance est très large (1^e à 3^e époque). Cela est conforme à la grande différence de précocité des géniteurs utilisés et permet d'envisager la sélection de variétés adaptées aux possibilités thermiques actuelles et à venir des grands ensembles viticoles français (Septentrion, Façade atlantique, Rhône-Méditerranée). L'évaluation technologique a démarré en 2007, avec les premières vinifications en petits volumes (10l) pour les génotypes les plus résistants.

PERSPECTIVES À COURT ET MOYEN TERMES

Les études génétiques en cours à l'INRA en collaboration avec les instituts étrangers vont permettre d'identifier de nouveaux gènes ou QTL de résistance, avec les marqueurs associés. Une part grandissante pourra ainsi être donnée à la sélection assistée par marqueurs pour le tri précoce (pyramidage de gènes ou QTL de résistance) et les effectifs en sélection pourront augmenter. La connaissance des interactions moléculaires des bioagresseurs avec la vigne durant l'infection va également progresser. La construction de géniteurs de résistance assistée par marqueurs, combinant des mécanismes de défense complémentaires, pourra alors être entreprise.

Les variétés en cours de sélection, et dont l'inscription pourrait intervenir à partir de 2016, supposent une révision du niveau de protection phytosanitaire et l'adaptation des itinéraires techniques. Bien que ces obtentions associent au moins deux sources de résistance, qui reposent sur des gènes ou QTL différents, il faut étudier les itinéraires techniques de protection phytosanitaire les mieux adaptés à leur utilisation. Ceux-ci peuvent aller de l'absence totale de protection à la réalisation d'un ou deux traitements positionnés à des moments clés du cycle des pathogènes, en fonction de la pression parasitaire. Il faut par ailleurs définir des protections spécifiques vis-à-vis des bioagresseurs dits secondaires et qui n'auraient pas pu être pris en compte par l'amélioration génétique, comme l'excoriose, l'antracnose ou le brenner.

Le travail d'innovation variétale qui a été initié par l'INRA sera envisagé dans un futur proche en partenariat et avec l'implication de l'IFV et des organismes régionaux, notamment dans la réalisation des expérimentations nécessaires aux derniers stades de la sélection.