

Production de souches monospores d'un oomycète, parasite obligatoire, *Bremia lactucae* Regel

Loïc JEAN.¹, Brigitte Maisonneuve¹

Résumé : Pour disposer de souches pures de *Bremia*, nous avons adapté au mildiou de la laitue une méthode d'obtention de souches monospores. Des prélèvements de spores isolées sont effectués avec un cil sous loupe binoculaire ; ces spores sont cultivées sur cotylédons détachés en atmosphère humide. Après 8 à 12 jours de culture, une sporulation apparaît sur certains cotylédons. Ces cotylédons sont isolés, les spores obtenues sont inoculées à des plantules afin d'obtenir une souche monospore.

Cette méthode est utilisée avec succès au laboratoire avec deux objectifs : obtenir une souche monospore à partir de vingt cotylédons inoculés par des spores isolées, et isoler plusieurs souches à partir d'un isolat correspondant à un mélange de souches.

Mots clés : mildiou, parasite obligatoire, souches monospores, test de résistance, laitue, *Bremia lactucae*

Photo ©Inra / Loïc Jean
Prélèvement d'une spore



Introduction

Bremia lactucae Regel est l'agent du mildiou de la laitue, responsable de graves pertes dans les productions de laitues de toutes les zones tempérées. *B. lactucae* est un oomycète, parasite obligatoire, diploïde. Le *Bremia* a montré une grande capacité d'adaptation en Europe et a ainsi contourné toutes les résistances introduites dans les variétés de laitue depuis les années 60. Les isolats de *Bremia* sont évalués pour leurs virulences sur une gamme de 20 hôtes différentiels (van Ettehoven et van der Arend, 2003).

Pour étudier la diversité génotypique des souches présentes dans une culture, il est nécessaire de disposer de souches génétiquement homogènes. En raison de la grande diversité des spectres obtenus sur une année de collecte, il est possible que des populations prélevées soient hétérogènes. Il est donc utile de disposer de souches issues de cultures monospores produites à partir des populations prélevées sur des feuilles contaminées dans les cultures de laitues.

¹ INRA - UR1052 GAFL - Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes - F-84143 Montfavet

✉ loic.jean@avignon.inra.fr, maisonne@avignon.inra.fr

1. Matériel et méthodes

1.1 Préparation du matériel végétal

La production d'une souche monospore est réalisée sur des cotylédons détachés de plantules au stade "première feuille pointante". La variété utilisée comme multiplicateur des souches travaillées est de préférence le génotype hôte d'origine de l'isolat ; ceci minimise le risque de biaiser la diversité de la population récoltée comme isolat d'origine.

Pour obtenir ces cotylédons, des graines du multiplicateur sont semées en godet de terreau environ une semaine avant le prélèvement. Les godets sont mis 24 heures dans le noir au froid (5 à 10°C) pour favoriser la germination, puis placés dans une enceinte climatisée avec une photopériode de 16 heures et des températures de 22 à 24°C jour / 16 à 18 °C nuit.

Dès que le stade "première feuille pointante" est atteint, les cotylédons doivent être prélevés.

1.2 Préparation de l'isolat d'origine

Sept à huit jours avant la mise en culture des spores, des plantules de laitue sont inoculées par pulvérisation d'une suspension de spores selon les techniques habituelles.

Dans notre laboratoire, le multiplicateur est semé sur papier filtre avec une solution nutritive (7ml/l d'une solution mère réalisée avec 1 kg d'engrais soluble de type 18-6-26 et 50 g de fer pour 10L d'eau) additionnée d'un anti-botrytis, le Rovral (4 mg/l), dans des boîtes plastique Magenta (GA7 de Sigma). Après une nuit en réfrigérateur, les boîtes sont placées dans la chambre de culture utilisée pour les tests de résistance au *Bremia* (photopériode de 16 heures, 16°C jour / 12°C nuit). Après une semaine de croissance, les plantules sont au stade "cotylédons étalés", prêtes pour l'inoculation.

Une suspension de spores est obtenue en secouant énergiquement des plantules porteuses de spores dans de l'eau ultra-pure (eau milliQ) maintenue dans de la glace. Cette suspension est pulvérisée sur les plantules avec un pistolet à peinture. Une sporulation apparaîtra sur ces plantules après une semaine dans la chambre de culture (**figure 1b**).

1.3 Inoculation par des spores isolées

Sur le fond d'une boîte en polystyrène (185 × 125 × 40 mm), deux feuilles de papier filtre sont déposées et humidifiées avec de l'eau ultra-pure. Puis les cotylédons des plantules au stade « première feuille pointante » sont détachés délicatement à la pince et sont placés sur le papier filtre face inférieure vers le haut, en 5 rangs de 4 cotylédons (**figure 1a**). Les cotylédons ne doivent pas être blessés au cours de ces manipulations. Les boîtes avec les 20 cotylédons sont humidifiées par brumisation avec de l'eau ultra-pure.

Un cotylédon porteur de spores est détaché d'une plantule inoculée 7 jours avant. Sous une loupe binoculaire, une spore est prélevée avec un cil monté sur un manche (**figure 1c**) ; puis la spore est déposée sur l'un des cotylédons de la boîte rectangulaire en passant le cil dans les microgouttes d'eau (**figure 1d**). Cette opération est réalisée pour les 4 cotylédons d'un rang à partir d'un même cotylédon contaminé. Après désinfection du matériel avec de l'alcool, un second cotylédon porteur de spores est prélevé sur une autre plantule pour isoler les 4 spores qui sont déposées sur chacun des 4 cotylédons du second rang de la boîte rectangulaire. Cette opération est répétée pour les 5 rangs de cotylédons.

Ensuite, le couvercle de la boîte est humidifié par brumisation et la boîte est placée dans la chambre climatisée utilisée pour les tests *Bremia*. L'hygrométrie dans les boîtes est régulièrement contrôlée visuellement et, si nécessaire, une légère brumisation des cotylédons,

ainsi que des couvercles, est réalisée tous les 2 à 3 jours. Pour assurer un bon développement du *Bremia*, les cotylédons ne doivent pas sécher.

Entre 7 et 15 jours après la mise en culture, les boîtes sont observées régulièrement pour repérer les sporulations dès leur apparition. Dès qu'une sporulation est visible (**figure 1e**) sur un cotylédon, celui-ci est isolé en boîte Magenta.

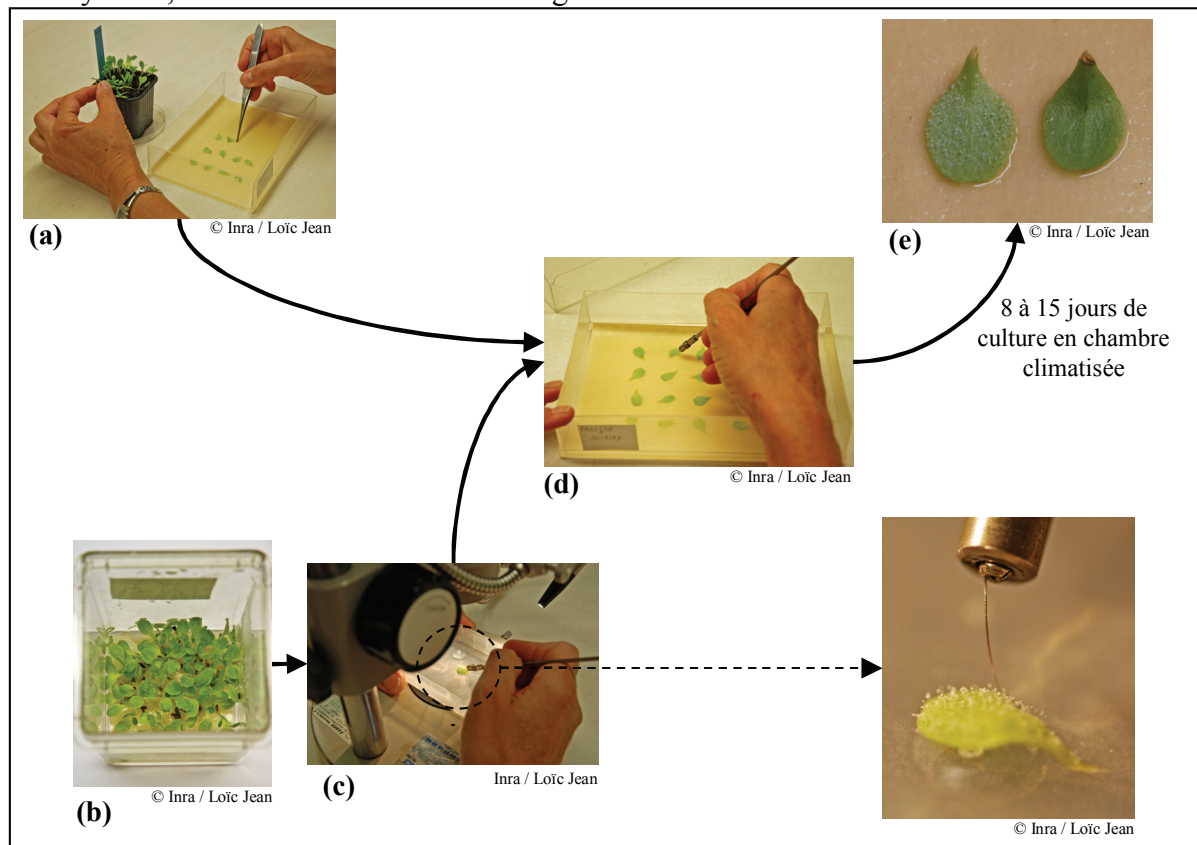


Figure 1 : culture de spores isolées de *Bremia*

- (a) Prélèvement des cotylédons,
- (b) Plantules avec *Bremia* dans une boîte Magenta,
- (c) Prélèvement d'une spore avec un cil sous loupe,
- (d) Dépôt d'une spore sur un cotylédon,
- (e) Sporulation sur 2 cotylédons après 8 jours en chambre climatisée

1.4 Multiplication des souches monospores

Un cotylédon porteur de spores est prélevé avec une pince et frotté délicatement sur des plantules de 7 jours obtenues selon la méthode classique de production de multiplicateur (**cf. § 1.2**) en boîtes Magenta dans la chambre climatisée. Les plantules sont ensuite humidifiées par brumisation d'eau ultra-pure ; puis les boîtes sont remises dans la chambre climatisée. Une légère brumisation des plantules est renouvelée tous les 3 à 4 jours pour maintenir une humidité nécessaire à la sporulation du *Bremia*.

Après 7 à 10 jours, une sporulation apparaît sur au moins quelques plantules ; elle est suffisante pour obtenir une suspension de spores utilisée comme inoculum. Les plantules porteuses de sporulations sont mises dans environ 5 ml d'eau ultra-pure fraîche dans un tube de 50 ml qui est secoué afin de détacher les spores des sporangiophores. La solution de spores obtenue est alors pulvérisée sur le multiplicateur utilisé pour la souche d'origine dans une à

deux boîtes Magenta. Ces souches monospores sont ensuite inoculées sur des séries d'hôtes différentiels en vue de leur caractérisation et conservées par congélation selon les techniques habituelles utilisées au laboratoire.

1.5 Caractérisation sur hôtes différentiels

Les graines des hôtes différentiels sont semées sur terreau (type Seedling Substrat de Klamann) humidifié par sub-irrigation avec de l'eau de ville dans des boîtes en polystyrène (260 × 130 × 77 mm). Après une nuit en réfrigérateur, les boîtes sont placées dans la chambre climatisée pour la germination puis la croissance des plantules. Après une semaine de culture, les plantules sont au stade "cotylédons étalés" et peuvent être inoculées par pulvérisation d'une suspension de spores de concentration ajustée à 2×10^5 spores par ml.

2. Résultats et Interprétation

2.1 Taux de production de souches monospores

Une synthèse des résultats de 63 expériences réalisées de 2004 à 2009, au laboratoire par 3 expérimentateurs (**figure 2**) donne les taux de réussite de ces manipulations. Lors des premières expériences le nombre de cotylédons inoculés a varié de 12 à 30 cotylédons par expérience et par boîte. Au total, 285 des 1119 cotylédons inoculés ont produit des sporulations (26 %) soit une réussite dans 58 des 63 expériences (92 %). Les différents expérimentateurs ont réalisé 20, 32 et 11 manipulations ; ils ont respectivement obtenus des isolats monospores dans 90 %, 97 % et 82 % de leurs expériences (**figure 2**). De plus, lors d'un apprentissage, sur 20 cotylédons inoculés par des techniciens découvrant la technique, 3 cotylédons ont donné une sporulation. Ainsi, en dépit d'une légère différence de réussite entre expérimentateurs (**figure 2**), la technique est validée.

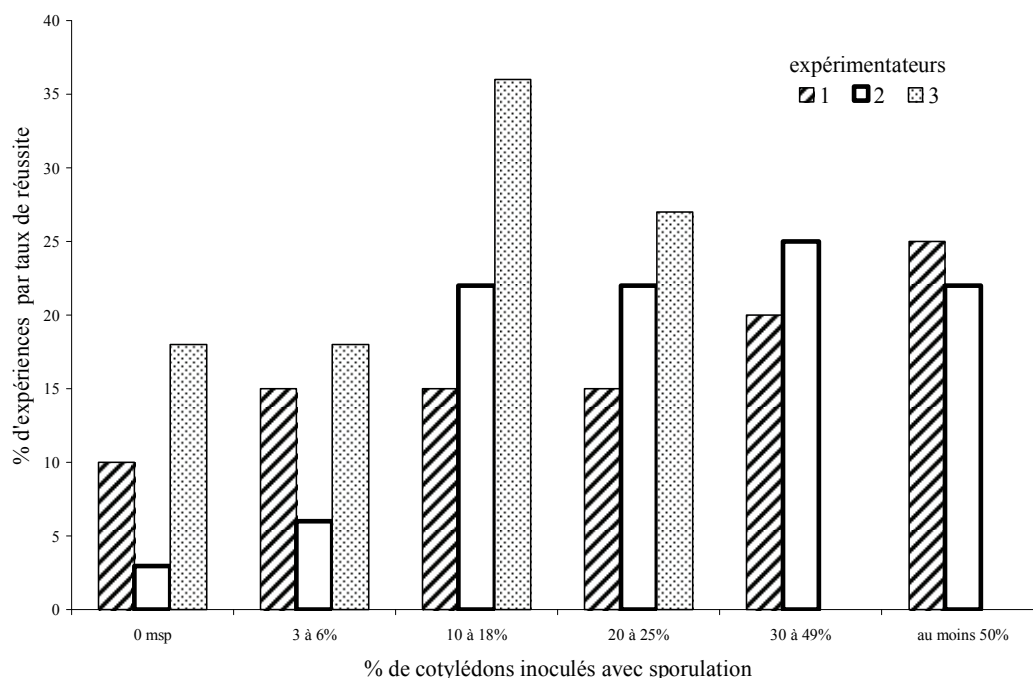


Figure 2 : taux d'obtention de souches monospores après inoculation de cotylédons par des spores isolées ; bilan de 63 expériences réalisées par 3 expérimentateurs (1-2-3) entre 2004 et 2009

Le taux maximum de cotylédons avec une sporulation a été de 75 % (expérimentateur 1 sur 12 cotylédons). Pour plus de 80 % des expériences, des cotylédons ont présenté une sporulation. Lors de la préparation des cotylédons, il est important de ne pas utiliser des plantules trop âgées ; ainsi, si la première feuille des plantules atteint plusieurs mm, les cotylédons sont moins réceptifs pour la germination des spores et il devient fréquent de ne pas avoir de sporulation (résultats non présentés).

Les deux essais réalisés sur des boîtes de 30 cotylédons par l'expérimentateur 3 ont donné des taux d'obtention de sporulation de 3 et 7 % contre un taux de réussite de 5 à 25 % sur 7 expériences avec 20 cotylédons inoculés ; ainsi, l'inoculation de 30 cotylédons ne semble pas améliorer le nombre de souches monospores obtenues pour une seule manipulation. Pour obtenir un grand nombre de souches monospores, il faut inoculer plusieurs boîtes de 20 cotylédons plutôt que 30 à 40 cotylédons par boîte ; dès qu'une boîte est inoculée, il est conseillé de la placer en chambre de culture du *Bremia* avant de commencer la suivante, afin de limiter les risques d'altération des cotylédons ou des spores déposées par une déshydratation ou une température ambiante trop élevée.

Les délais de sporulation observés sont généralement compris entre 7 et 10 jours, mais il arrive que quelques cotylédons sporulent tardivement au-delà de 10 jours. Il est donc important de contrôler l'apparition de spores quotidiennement et d'isoler les souches obtenues dès leur apparition afin de limiter les éventuelles contaminations entre cotylédons.

Quand l'expérience vise à révéler la diversité des souches d'un isolat multisouche, des souches issues de plantules différentes sont gardées ; un seul cotylédon porteur de spores est utilisé parmi les 4 cotylédons inoculés à partir d'un même cotylédon source. Il a ainsi été obtenu jusqu'à 8 souches monospores sur 10 rangs de 4 cotylédons inoculés.

2.2 Analyse d'une série de souches monospores

Un seul exemple de comparaison de souches obtenues à partir de spores isolées au laboratoire a été choisi pour illustrer l'intérêt de la technique. L'isolat d'origine a été prélevé sur une plante de la variété Rosinski dans un champ près d'Angers en 2008. Quatre boîtes de 20 cotylédons ont été contaminées avec des spores isolées ; sur 9 des 80 cotylédons inoculés des sporulations ont été obtenues. Comme deux souches venaient du même cotylédon source, seulement 8 souches monospores ont été gardées et multipliées. Nous présentons ici les spectres de virulences de l'isolat d'origine et de 5 des souches monospores produites à partir de cet isolat.

La comparaison des spectres obtenus montre une diversité (**tableau 1**) pour 3 des 17 hôtes différentiels attaqués par l'isolat d'origine (Dandie, UCDM14, Discovery). Trois spectres de virulence différents ont été obtenus à partir de l'isolat nommé FR03b/08 prélevé sur une feuille en culture : phénotype de msp2, msp3 et msp5. Les souches msp4 et msp6 sont similaires à msp2 (Dandie et Discovery sont résistantes) ; ces 3 souches viennent de boîtes différentes. La souche msp3 ne sporule pas sur UCDM14 mais sporule sur Dandie et Discovery et la souche msp5 sporule sur Dandie et UCDM14 (Discovery est résistante). La souche msp3 vient de la même boîte que msp2 et la souche msp5 de la boîte où a été isolé msp4.

Hôtes différentiels	Dandie	UCDM14	Discovery
Dm / R	3	14	37
FR03b/08	s	s	s
msp 2	R	s	R
msp 3	s	R	s
msp 4	R	s	R
msp 5	s	s	R
msp 6	R	s *	R

R : HD résistant (pas de sporulation ou très faible sporulation tardive) ;
s : HD sensible (sporulation) ; * : nécroses

Tableau 1 : virulence sur 3 hôtes différentiels (HD) d'un isolat de *Bremia* (FR03b/08) et de cinq souches monospores (msp) obtenues à partir de cet isolat. Les 16 autres HD avaient la même réaction à la souche d'origine et aux 5 msp : 2 HD étaient résistants et les 14 autres sensibles aux 6 souches.

Conclusions et perspectives

Grâce à cette technique nous obtenons des souches monospores assez régulièrement (dans 58 des 63 expériences présentées). Afin d'améliorer ce taux de réussite, nous inoculons désormais, avec un seul isolat, 40 cotylédons répartis en deux boîtes de 20 cotylédons. Cette technique de purification des isolats est utilisée dans notre laboratoire quand l'analyse de plusieurs isolats venant d'une même culture montre une diversité de spectres de virulences comme dans l'exemple présenté en **tableau 1**. En revanche, quand il ne s'agit que de purifier un isolat pour avoir des résultats stables ou pour extraire l'ADN pour des études moléculaires, une seule souche monospore est produite ; dans ce cas, nous inoculons, dans un premier temps, une seule boîte de 20 cotylédons.

Cette technique permet soit de révéler la diversité de souches d'un isolat, soit de disposer rapidement en laboratoire d'une souche de référence stable, soit d'avoir des souches pures pour des études de leurs génomes.

Bibliographie

van Ettekoven K, van der Arend AJM (1999) Identification and denomination of "new" races of *Bremia lactucae*. In: *Eucarpia Leafy Vegetables*, A. Lebeda, E Kristkova (Eds), Olomouc (République Tchèque), 171-175