

TEST DE RESISTANCE DU TOURNESOL AU PHOMOPSIS

Dépôt d'un explant mycélien de *Diaporthe helianthi* sur feuille

Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹, Sylvie Roche¹

Apparu en 1981 en ex-Yougoslavie, *Diaporthe helianthi*, agent du *Phomopsis*, peut provoquer des dégâts considérables sur tournesol. En condition favorable, les attaques peuvent détruire totalement la culture. Le Sud-ouest de la France demeure la région la plus favorable à son développement. Ce test, développé en 1987, utilisé en sélection, permet d'évaluer de manière fiable la résistance du tournesol à *D. helianthi*. Il reproduit à l'aide de mycélium, la contamination naturelle par spore sur feuille. Effectué précocement, il révélera le comportement du matériel végétal à la progression du champignon. Les symptômes apparaissent tout d'abord sur feuilles, puis sur tige et stoppent totalement l'alimentation générale de la plante.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Matériel

1.1.a. Préparation du matériel fongique en laboratoire

L'unité dispose d'une collection de 250 isolats *D. helianthi*. Cette mycothèque est conservée à -80 °C. Chaque isolat est stocké sous forme de carrés gélosés avec le mycélium baignant dans un cryoprotecteur* dans des cryotubes de 2 ml. Deux mois avant les tests au champ, cinq isolats sont choisis parmi les plus agressifs.

Ces isolats sont remis en culture en boîte de Pétri de 90 mm sur milieu gélosé Agar (15g/l) avec malt (1%).

Après sept jours de croissance dans une étuve à 22 °C, les mycéliums obtenus de *D. helianthi* suffisamment développés sont utilisés pour infecter un génotype de tournesol sensible. Cette première infection permet de contrôler leur agressivité et de retenir la meilleure souche pour la saison.

1.1.b. Préparation du matériel végétal

Pour les sorties de cryoconservation une vingtaine de plantes suffit. Quarante jours avant décongélation des souches, des semis de tournesol sont effectués en serre. Ils sont réalisés en godet. Dès l'apparition de la première paire de feuille, les tournesols sont repiqués en pots de 5 litres. L'arrosage est assuré par un système de goutte à goutte avec solution nutritive (Hydrokani C2).

Pour les tests en plein champ, les génotypes en cours de sélection sont testés sur deux lignes de 10 plantes (cf. tableau). Deux témoins, 74F sensible et AGRISOL très peu sensible, sont semés en plusieurs dates. Ces derniers valident les infections et permettent d'effectuer le rapport génotype/moyenne des témoins.

*Cryoprotecteur

Glycérol

(RP normapur bidistillé
99,5% min 15g/l)

Sel de sodium

(MOPS-Na2) à 20mM/l
pH 7 avant stérilisation
20min à 120°C.

¹ UMRE INRA ASP - Université Blaise Pascal 234 Avenue du Brézet 63039 Clermont-Ferrand cedex 02

1.2. Méthodes

1.2.a. Description du test

Ce test a pour principe de suivre la rapidité d'évolution de la nécrose le long de la nervure principale de la feuille, à partir du dépôt d'un explant mycélien à l'extrémité du limbe. Le tournesol doit être au stade « bourgeon étoilé » pour effectuer l'infection. Pour chaque série de test les lignes sont préalablement repérées à l'aide d'étiquettes de couleur. Il faut choisir les feuilles adultes les plus jeunes. En effet des feuilles trop jeunes se développent encore et rendent la lecture difficile. Les feuilles âgées limitent la réussite de l'infection. L'explant mycélien de 6 mm de diamètre, est prélevé sur la zone de croissance 2/3 mycélium 1/3 gélose dans la boîte de Pétri (photo 1). Il est déposé à l'extrémité de la nervure principale sur la face supérieure de la feuille (photo 2), de manière à ce que le mycélium soit en contact direct avec le limbe. L'explant est ensuite couvert d'un papier aluminium² qui permet un maintien optimum limbe/mycélium ainsi que des conditions favorables au développement du bio agresseur. L'ensemble est fixé par 2 agrafes de part et d'autre de l'implant, pour éviter la perte de l'explant.

Pour optimiser la réalisation de ce test, l'idéal est de travailler par équipe de 3 personnes. La répartition du travail s'effectue de la manière suivante.

- une personne dépose l'explant mycélien, préalablement découpé, au bout de la feuille
- deux autres de part et d'autre de la plante, choisissent les feuilles, réceptionnent l'explant, plient et agrafent le papier aluminium.



Photo 1 : *Explants – scalpel – emporte pièce*



Photo 2 : *Dépôt d'explant*

1.2.b. Mise en place du test en plein champ

Ce test n'est réalisable en plein champ que si l'on dispose d'une irrigation en couverture totale. Il faut apporter dès la réalisation du test 2.5 mm d'eau 3 fois par jour. L'eau ainsi apportée permet d'avoir sous le couvert végétal une humidité élevée. Ces conditions facilitent un excellent développement du pathogène.

² La marque ALBAL nous a donné les meilleurs résultats, elle s'oxyde moins rapidement que les autres.

1.2.c. Lecture du test

Que ce soit en sortie de mycothèque ou lors du test en plein champ la notation demeure identique. Selon les conditions météorologiques la lecture s'effectue entre 10 et 20 jours après infection. Celle-ci est réalisée dès que les témoins très sensibles montrent des longueurs de nécroses d'une moyenne de 10 cm.

Comme pour l'infection il faut une équipe de trois personnes pour réaliser la lecture.

Pendant que l'une note les deux autres cherchent les deux feuilles infectées et mesurent les nécroses. Chacun des notateurs est muni d'une règle plate et mesure la longueur de la nécrose sur la face inférieure de la feuille. Les nécroses dues à *D. Helianthi* ont la particularité d'attaquer plus rapidement la nervure principale avant de détruire le limbe (photo 3). Il faut impérativement repérer au delà du limbe détruit, la dépression nécrotique de la nervure atteinte. Placer le 0 de la règle sur la pointe de la feuille et noter la longueur totale de la nécrose (photo 4).



Photo 3 : Nécrose et papier d'aluminium

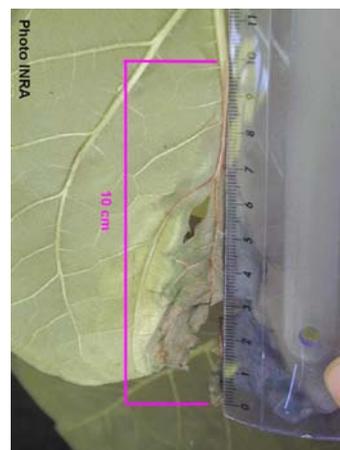


Photo 4 : Mesure nécrose face inférieure

2. RESULTATS

Comme il s'agit d'une résistance horizontale, polygénique et partielle, aucune variété ne possède une résistance absolue. Le tableau de notation (ci-dessous) rassemble tous les éléments nécessaires du jugement variétal pour sélectionner le matériel ayant un bon comportement.

Toutes les plantes ayant une nécrose supérieure à la moyenne des témoins ne sont pas conservées (destruction du bourgeon terminal) par exemple n°2, 3, 4, 5.... Seules les plantes dont la nécrose est significativement inférieure à la moyenne des témoins peuvent être conservées : par exemple les plantes n° 1, 9, 10... D'autres critères interviendront pour déterminer la plante à poursuivre en sélection : résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*, au mildiou, teneur en huile (35% mini), taille, productivité, aptitude à la combinaison ...

Code génotype (étiquette)	2 PH 15
Décodage matériel	(PF63xSR1)
Date d'infection	15-juin-02
Date notation	29-juin-02
Couleur étiquette	Bleu
Moyenne 74 F Très Sensible	10 cm
Moyenne AGRISOL Très Peu Sensible	4 cm
Moyenne des deux témoins	7 cm

n° plante	Feuille 1	Feuille 2	Moyenne	n° plante	Feuille 1	Feuille 2	Moyenne
1	4	2	3	11	8.5	9	8.75
2	11	6	8.5	12	7	8	7.5
3	9	11	10	13	7	9	8
4	9	9	9	14	Non infectée	9	9
5	9.5	10	9.75	15	4	4	4
6	5	5	5	16	8	8	8
7	8.5	8	8.25	17	9.5	8.5	9
8	12	10	11	18	2	2	2
9	3	2	2.5	19	6	9	7.5
10	3	3.5	3.25	20	6	6.5	6.25

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le test mycélium révèle un facteur de résistance généralement bien corrélé aux attaques semi naturelles réalisé à l'INRA de Toulouse où l'inoculum est endémique. Ce site a été retenu pour étudier le comportement du matériel pour l'aptitude à la combinaison. A la station de Clermont-Ferrand, le programme spécifique de sélection pour la résistance au *D. Helianthi* a du être abandonné conformément aux nouvelles orientations de l'INRA.

Un test réalisable à partir d'ascospores serait idéal. Malheureusement les productions d'ascospores en condition contrôlée au laboratoire ne sont pas maîtrisées. De nombreux points restent à explorer au niveau du déterminisme sexuel de *D. helianthi*.

La sélection vise à rassembler un maximum de gènes dans un même génotype. Le niveau de tolérance atteint en quelques années demeure encore aujourd'hui très satisfaisant. Les attaques catastrophiques des années 90 ne se sont plus reproduites. Les sélectionneurs et pathologistes ont mis au point rapidement du matériel végétal performant. Aujourd'hui les agriculteurs disposent de variétés de tournesol portant l'appellation officielle **Très Peu Sensible** (TPS).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Viguié A., (1999) Etude du pathosystème *Phomopsis helianthi*/*Diaporthe helianthi* Munt. – Cvet. – tournesol (*Helianthus annuus* L.).

Meliala C., (1995) Etude des relations hôte/parasite chez le couple tournesol/phomopsis.