

TEST DE RESISTANCE DU TOURNESOL AU MILDIOU (*Plasmopara halstedii*) EN CONDITIONS CONTROLEES

Sylvie Roche¹, Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹

Depuis 1966, date de la première apparition du mildiou (race 100) en France, l'INRA a développé un outil de sélection du tournesol pour lui faire face. Ce test effectué sur graines germées, révèle rapidement la présence ou l'absence d'une résistance monogénique (gènes *Pl*). Sa réalisation en chambre de culture le rend reproductible. Sa mise en œuvre sur les onze nouvelles races de mildiou apparues depuis 1988 permet une sélection du tournesol encore efficace. Cependant des résistances de type monogénique tendent vers leurs limites.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Matériel

Semences en cours de sélection et témoins différentiels. Boîtes de Pétri de différents diamètres selon les quantités de graines, papier filtre, hypochlorite de sodium à 12°Chloré, terrines, substrat, étiquettes, sac polyéthylène.

1.2. Méthode

Les graines sont mises à tremper (4 heures) dans les boîtes de Pétri préalablement numérotées et munies de leurs papiers filtres. Après le trempage, vider l'eau en excès, les placer à 18-20°C. Soixante-douze heures sont nécessaires pour obtenir des radicules ayant 0,5 cm de longueur en moyenne. Cette durée peut être réduite à 48h en plaçant les graines à 25°C (étuve). Cependant il est préférable d'éviter ces températures sur du matériel non désinfecté car de nombreux parasites peuvent alors se développer sur les graines. La désinfection est réservée pour du matériel précieux. Les graines sont plongées dans une solution d'hypochlorite de sodium durant trois minutes. Rincer abondamment à l'eau courante jusqu'à disparition de l'odeur « chloré ».

Levée de dormance

Durant les deux mois qui suivent la récolte des graines, un produit libérant de l'éthylène est ajouté à l'eau de trempage afin de lever la dormance (50µl d'éthéphon par litre).

1.3. Préparation du matériel fongique en laboratoire

L'inoculum est produit à partir de plantules âgées de deux semaines préalablement infectées (Cohen & Sackston, 1973). La sporulation est provoquée en maintenant une humidité saturante durant 48 heures à une température de 18°C. Les spores sont récupérées en immergeant les cotylédons dans de l'eau et en agitant fortement. Nos études ont montré que les zoospores (propagules contaminantes) sont libérées dans la demi-heure qui suit la mise en suspension. Peu de zoospores restent visibles après six heures. Après la mise en suspension, l'inoculum doit donc être utilisé rapidement, il ne peut pas être conservé plusieurs jours de

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

manière fiable. Pour conserver des spores viables quelques jours, les cotylédons sporulant sont mis à sécher à température ambiante puis placés au frais (4°C).

1.4. Préparation de l'inoculum, inoculation et repiquage (figure 1)

Pour préparer la suspension de spores, les cotylédons qui présentent une sporulation sont lavés à l'aide d'un petit jet d'eau (petit pulvérisateur réservé à cet usage) ou bien mis directement dans de l'eau dans un récipient qu'on agite (type shaker). La concentration de l'inoculum doit être voisine de 100 000 sporanges / ml. Dans la pratique, nous ne dosons l'inoculum que lorsqu'il y a un doute sur sa qualité (faible sporulation sur cotylédon).

Inoculation des semences.

Les graines germées sont mises à tremper dans cette suspension. Le trempage doit durer 3 à 4 heures pour que l'infection soit réussie et s'effectuer à une température ambiante se situant entre 16 et 18°C. A ce stade, la température doit être contrôlée. En effet, des températures trop faibles ou trop fortes présentent des risques pour la fiabilité du test (mauvaise germination ou destruction des spores). L'eau utilisée pour préparer la suspension est de l'eau du robinet car malgré les produits de traitement de cette dernière, nous n'avons à ce jour pas remarqué de problème. En cas de doute, il est recommandé d'utiliser de l'eau permutée. Il est important de veiller à l'immersion totale des graines durant le trempage.

Repiquage.

Il s'effectue en terrines, préparées le temps du trempage des graines. Plusieurs substrats peuvent être utilisés (terreau, sable, vermiculite). Chaque utilisateur doit, avant de commencer des tests, s'assurer que son substrat est adéquat en cultivant un témoin sensible de référence. Par expérience, nous savons que le changement de substrat peut intervenir sur l'expression des symptômes de mildiou. A l'INRA de Clermont-Ferrand nous utilisons le support de culture Klasmann Seedlingsubstrat NF U 44-551.

Seules les graines ayant un germe de taille supérieure ou égale à 5 mm sont repiquées. Si des génotypes n'ont pas bien germé, elles peuvent être gardées 24 heures de plus et refaire une infection le lendemain, à condition d'avoir conservé des cotylédons sporulés afin de préparer un nouvel inoculum. Les graines repiquées sont placées avec soin dans des trous fait auparavant pour ne pas casser les germes ou le mildiou a pénétré. La graine est en surface, seule la radicule est enterrée. Ce repiquage en surface a l'avantage d'assurer un développement rapide de la partie aérienne afin d'obtenir les premières feuilles lors de la lecture du test. Après le repiquage, un arrosage est nécessaire car il permet de mettre la racine en contact avec le substrat.

Développement.

Alimentation hydrique : La quantité d'eau apportée durant les douze jours suivant, varie en fonction des chambres climatiques. Un excès d'eau est à éviter car le mildiou se développe trop vite, les sporulations apparaissent trop tôt et la maladie entraîne une fonte des semis. La lecture du test est alors impossible. Il est préférable que les plantules soient en situation de légère sécheresse huit jours après le repiquage.

Il est souhaitable d'avoir un taux d'humidité voisin de 70 %.

Photopériode : Il faut chercher à obtenir des plantules non étiolées mais nous savons qu'un excès de lumière est néfaste au bon déroulement du test. Avec une intensité de 12 000 lux, le test se déroule de manière optimale. La photopériode est de 16 heures.

Température : Pour un bon développement des plantules et pour ne pas gêner le bon déroulement de l'infection la température idéale dans la chambre de culture se situe entre 17 et 19°C au niveau des plantes.

2. SYSTEME DE NOTATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Douze jours après le repiquage, les terrines sont mises en conditions d'humidité saturante. Pour cela, nous les plaçons dans des sacs plastiques. La lecture s'effectue 48 heures après. Avec la diversification des sources de résistance, trois cas peuvent se présenter :

a - porte sporulation sur les feuilles et les cotylédons
= Sensible Type **S**

b - pas de spores sur feuilles mais sur les cotylédons avec ou sans nécroses
= Résistance Type **R II**

c - absence totale de spores sur les feuilles et les cotylédons
= Résistance type **R I**

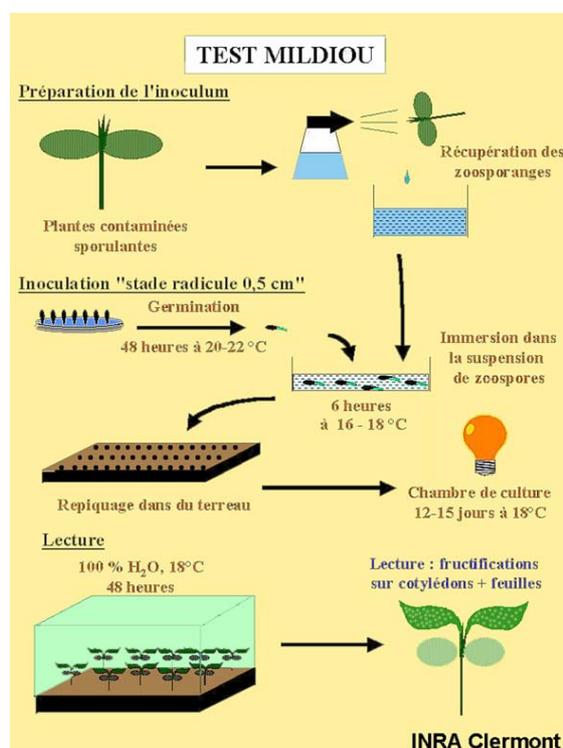
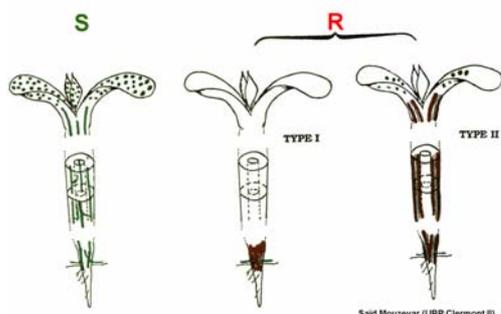
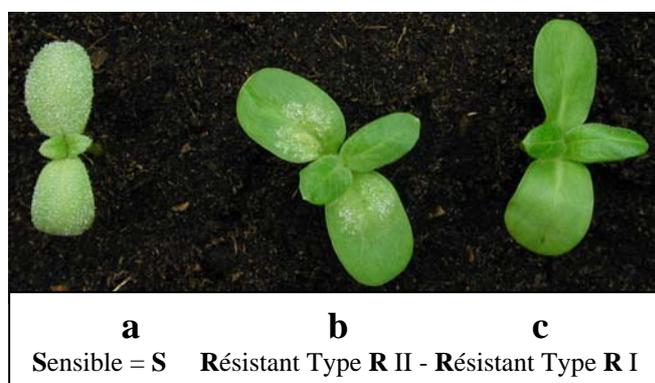


Figure 1 : Préparation de l'inoculum, inoculation et repiquage

Remarque

Si une même équipe doit travailler avec plusieurs races de mildiou, quelques précautions sont à prendre. Il est nécessaire de séparer les races en lieu et temps. Il faut disposer de chambres de culture distinctes et si possible, faire sporuler ces races à des jours différents. Aucun matériel n'est à utiliser en commun entre ces différentes races de mildiou (pulvérisateur, terrines, boîtes de germination...).

Il faut penser à utiliser des lignées discriminantes pour vérifier qu'un mélange de races n'a pas eu lieu. De plus, les témoins de sensibilité sont différents d'une race à l'autre.

3. CONCLUSION

Lors de sa mise au point en 1966, ce test répondait à l'exigence du moment qui était le contrôle de la seule et unique race présente en France. Dès 1988 un nouveau pathotype de mildiou a contourné le gène de résistance. Depuis, avec ce test, de nouveaux gènes ont été trouvés pour chaque nouvelle race. Celui-ci permet toujours de sélectionner en fonction de l'évolution de ces races. La manipulation des races devient lourde à gérer (organisme de quarantaine, chambres S3). En effet une race implique une chambre de culture climatisée spécifique et plusieurs personnes. A ce jour 4 races sont utilisées en sélection. Il est peu probable que la multiplication des installations puisse perdurer, sachant que les races présentes sur le territoire sont au nombre de huit.

4. PERSPECTIVES

L'évolution rapide des races de mildiou nous amène à orienter les recherches sur les résistances durables. Le contournement systématique des gènes des nouveaux hybrides mis sur le marché est une réalité. L'ensemble de la profession est conscient de la problématique. En effet il faut raisonner sur le long terme afin de ne pas favoriser le bio agresseur et se priver de toute parade. Plusieurs stratégies sont étudiées à l'heure actuelle :

- rotation longue avec alternance des sources de gènes.
- utilisation de variétés composites cumulant toutes les sources de gènes la même année.
- une résistance de type horizontale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cohen Y., Sackson W.E., 1973. – Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. Can. J. Bot., 15-22
- Tourvielle de Labrouhe, D. (1999) La nouvelle nomenclature des races de *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol, appliquée aux races françaises. OCL, 6 : 219-221.
- Tourvielle de Labrouhe, D., (2000) et al. Le mildiou du tournesol. Points techniques. Paris – France : CETIOM-INRA Editions 2000. 176 p.