

TEST DE REISTANCE DU TOURNESOL A LA POURRITURE BLANCHE DU CAPITULE

Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹, Sylvie Roche¹

Cet outil développé à l'INRA de Clermont-Ferrand, depuis 1976 est utilisé dans le monde entier par l'ensemble de la profession. Ce test consiste à infester par pulvérisation d'une suspension d'ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum* la face fertile du capitule sous irrigation renforcée. Il reproduit à l'identique les attaques par spores de la face fertile du capitule lors de la floraison. Il s'inspire du cycle naturel du pathogène et reproduit la forme d'attaque la plus préjudiciable à la culture : la pourriture molle du capitule conduisant à la perte totale de la plante attaquée. Il permet de juger durablement de la résistance horizontale polygénique et partielle.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Matériel végétal

Outre le matériel en sélection, l'utilisation de deux témoins de référence est indispensable. Deux géotypes dont les comportements sont connus depuis de nombreuses années sont utilisés :

- SD est une lignée INRA mainteneur, mono capitulée au comportement partiellement résistant avec un délai de latence long malgré un taux d'attaque élevé.
- GU est une lignée INRA mainteneur, mono capitulé représentant l'archétype du sensible avec un délai de latence court et un taux d'attaque élevé.

La présence du témoin sensible permet de valider chaque infection. Le matériel en sélection sera jugé par rapport à la moyenne des deux témoins. Afin d'avoir pour chaque infection, une quantité suffisante de témoins nous réalisons des semis accélérés à l'aide de film de forçage de type P17, des semis à la même date que la pépinière et des semis décalés.

1.2. Matériel fongique

1.2.a. Production de l'inoculum.

La production d'ascospores est entièrement réalisée en laboratoire. Pour cela il faut récolter les sclérotés qui sont la forme de conservation caractéristique des *Sclerotinia sp.* Ils sont constitués d'un cortex brun noir entourant une médulla blanc rosé.

La germination sexuée (la carpogénèse) des sclérotés donne des germes (les stipes) qui portent des carpophores appelés apothécies (Photo 1). Ces carpophores portent des asques qui renferment 8 ascospores. La récolte des ascospores peut se faire de 2 manières différentes :

- Par récolte des apothécies mûres, qui une fois retournées sur boîtes de Pétri, crachent des nuages d'ascospores (Photo 2). Celles-ci adhèrent naturellement à la boîte à l'aide d'un mucilage. Après une dessiccation de 24 heures les boîtes sont conservées à -20°C et peuvent être utilisés durant dix années.
- Les sporées peuvent être également récoltées à l'aide d'un aspirateur muni d'un entonnoir de filtration analytique stérile Nalgene® 145. La membrane est en nitrocellulose seuil, 0,2 micron. Pour cela, quand les asques sont mûrs et que l'humidité relative des terrines baisse (le

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

matin entre 10 et 11 heures), il faut placer l'entonnoir au plus près des apothécies et aspirer les nuages. La conservation est identique à celle des boîtes de Pétri.

1.2.b. Préparation de l'inoculum

Avant de préparer l'inoculum, il faut réaliser un comptage des capitules fleuris. Il permet d'ajuster à la fois le volume d'eau total et de ne décongeler que l'inoculum nécessaire. La suspension de spores doit être préparée juste avant l'infection (2 heures au maximum) et maintenue au frais < 10°C. La récupération des ascospores varie selon la méthode de récolte :

- Sur les boîtes de Pétri, la récupération des spores est réalisée par simple grattage des amas d'ascospores suivi d'un court passage (10 secondes) aux ultrasons pour les séparer.
- Les filtres Millipore sont plongés dans un bain ultrasonique qui détache les spores adhérentes.

Un comptage est effectué au microscope à l'aide d'une cellule de Mallassez. La concentration de l'inoculum est ajustée à 5 spores par mm³.



Photo 1 : *Apothécies*



Photo 2 : *Sporées*



Photo 3 : *Inoculation stade F1*



Photo 4 : *Lecture*



Photo 5 : *Tâche de pourriture*

1.3 Méthode

1.3.a. Inoculation incubation

L'inoculation doit impérativement être réalisée à un stade morphologique précis F1 (Photo 3), c'est-à-dire début floraison (premier rang de fleurons avec étamines) à mi-floraison (fleurons épanouis sur la moitié du rayon). Selon les génotypes la floraison s'échelonne sur plus de 30 jours. Il faut un rythme de deux infections par semaine pour tester l'intégralité du matériel.

Nous apportons la suspension à l'aide d'un pulvérisateur manuel dont le débit est connu avec précision. Chaque capitule reçoit 5 cm³ de suspension soit 25 000 spores en 2 pulvérisations circulaires. Il est ensuite recouvert de son sac en papier sulfurisé attaché avec un lien. Le sac assure en plus de l'autofécondation, le maintien d'une hygrométrie favorable à la germination des spores. Une irrigation en couverture intégrale est indispensable pour apporter les conditions optimales au développement de la pourriture blanche. Nous apportons au minimum 20 mm par semaine ni la veille ni le lendemain d'une infection.

1.3.b. Lecture notation

Les premiers symptômes apparaissent en moyenne deux à trois semaines après l'infection (une semaine dans le cas de génotypes extrêmement sensibles et sous conditions climatiques favorables). L'observation s'effectue en appuyant avec les doigts sur le capitule à travers le sac (Photo 4). Ceci permet de détecter les symptômes de pourriture. Le sac est ouvert pour vérifier qu'il s'agit bien de *Sclerotinia sp.* (Photo 5). Nous en déduisons un délai de latence (temps écoulé entre l'infection et le symptôme) et un taux de réussite (nombre de plantes malades par rapport au nombre de plantes total).

2. RESULTATS

Code lignée expérimentale 3SC 227						Date	couleur	nombre
						178	noir	5
						182	bleu	15
Quantités	178	182	185	189	192	196	199	203
SD	45.97	47.00	39.09	42.76	42.68	41.33	34.25	39.67
GU	22.50	23.29	22.28	20.71	23.05	22.77	18.40	29.80
moyenne	34.24	35.15	30.69	31.74	32.87	32.05	26.33	34.74
N° Plante	Date d'infection en quantités	Date des symptômes en quantités	Délai de latence en jours	Indice	Taille	Poids	Huile	remarques
1	178	209	31	0.91	95			
2	182	223	41	1.17	100	6.1	45.3	
3	182	244	62	1.76	110	6	37.4	
4	182	212	30	0.85	100	8.6	49.5	
5	182	237	55	1.56	110	11.8	43.5	
6	182	244	62	1.76	115	12	42	
7	182	212	30	0.85	120	13.7	39.7	
8	182	244	62	1.76	110	9	45.1	
9	182	216	34	0.97	100	15.4	48.5	
10	182	sain			110	7.1	38.9	
11	182	216	34	0.97	110	7.2	38.3	
12	182	209	27	0.77	115			
13	182	216	34	0.97	115	10.5	42.9	
14	178	205	27	0.79	100			
15	182	244	62	1.76	115	9	44.4	
16	178	sain			105	8.1	39.4	
17	178	237	59	1.72	110	11.3	47.5	poursuivi
18	178	219	41	1.20	105	13.5	42.3	
19	182	244	62	1.76	110	4	36	
20	182	212	30	0.85	115	3		
Infectés		20						
Malades		18						
Taux d'attaque		90						

Tableau de résultats

2.1. Interprétation des résultats

Dans notre exemple dont les résultats figurent dans le tableau ci-dessus, nous testons la descendance d'une lignée F4 en cours de sélection généalogique. Nous remarquons que les infections ont eu lieu sur deux jours notés en quantièmes (178 = 27 juin 2003, 182 = 01 juillet 2003). Chaque descendance réagit différemment face au bio agresseur. Les dates de symptômes s'échelonnent du 24 juillet (205) au 1^{er} septembre (244).

Le délai de latence renseigne sur le temps écoulé entre l'infection et l'apparition du symptôme ex : Plante 17 (237-178 = 59 jours)

L'indice de latence correspond au rapport entre le délai du génotype et la moyenne des témoins de références. Exemple plante 17 (59/34.24 = 1.72)

Seul le matériel végétal dont l'indice est supérieur à 1.50 (cases grisées) peut être poursuivi en sélection. D'autres critères tels que la taille, la productivité (poids) et la teneur en huile (%), interviendront pour choisir le génotype définitif.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test ascospore est très bien corrélé avec les observations des attaques semi naturelles réalisées dans les essais multi locaux pour le CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection). Il est également employé en sélection par l'ensemble de la profession depuis 30 ans. Il est fiable quelles que soient les conditions météorologiques à condition d'avoir une irrigation en couverture intégrale. Il faut savoir, qu'aucun génotype ne montre de résistance absolue. En effet la résistance du tournesol vis-à-vis de la pourriture blanche est partielle, polygénique et de nature horizontale. Cependant ce test a permis d'améliorer sensiblement le comportement des hybrides actuellement commercialisés.

La biologie moléculaire développe des outils permettant de cartographier des régions génomiques impliquées dans la résistance aux attaques de *S. sclerotiorum*. Ces programmes de recherche de QTL (Quantitative Trait Loci) révèlent une organisation des facteurs de résistance du tournesol à *S. sclerotiorum* complexe. Ces nouvelles voies viennent compléter les études de génétique classique. A ce jour les deux outils demeurent complémentaires pour une sélection rapide.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Vear F., Guillaumain J.J., 1977. Etude de méthodes d'inoculation du tournesol par *Sclerotinia sclerotiorum* et application à la sélection. Ann. Amélior. Plant., 27, 523-537.

Tourvieille D., 1985. Contamination du capitule du tournesol par les ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum*. Agronomie, 5, 564.

Vear F., Tourvieille D., 1988. Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. Agronomie, 8, 503-508.