

**Mise au point d'une méthode
de conservation à long terme
de *Plasmopara halstedii*,
parasite obligatoire, agent du mildiou du tournesol.**

V. MOLINERO-DEMILLY¹, P. WALSER², C. GIROULT¹, O. HERBERT¹,
M. GUENARD¹, D. TOURVIEILLE de LABROUHE²

¹ GEVES-SNES, rue Georges Morel, 49071 Beaucouzé cedex 01

² INRA, Amélioration et Santé des Plantes (UMR 1095), Site de Crouël,
234, avenue du Brézat, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2

INTRODUCTION

Plasmopara halstedii (Farlow) Berlese et de Toni, qui appartient à la classe des Oomycètes et à l'ordre des Peronosporales, est un des agents économiques les plus importants de la culture de tournesol. Ce pathogène (parasite de quarantaine) apparaît comme très évolutif, comportant de nombreuses races physiologiques. En France si on reconnaissait la présence d'une race en 1980 (Lamarque, 1983), on n'en dénombre pas moins de 12 en 2003 (Tourvieille de Labrouhe, 2003). Ceci pose des problèmes de conservation des isolats, d'autant plus que cet oomycète est un parasite obligatoire qui ne se maintient que sur plante hôte. Cette conservation en laboratoire nécessite des repiquages fréquents et des contraintes fortes pour ne pas mélanger les pathotypes. Les travaux sur la cryoconservation déjà réalisés ne donnaient pas entière satisfaction, surtout à long terme. Ils étaient coûteux (protocole de conservation dans l'azote liquide, Gulya et al., 1993), complexes à mettre en œuvre et les résultats étaient aléatoires (cotylédons sporulés conservés à -18 °C, Vear et Tourvieille de Labrouhe, 1987). Or les phytopathologistes, qu'ils s'intéressent à la sélection végétale, à d'autres domaines de la pathologie ou à la biologie moléculaire, doivent être en mesure de s'assurer que les méthodes de conservation qu'ils utilisent permettent de maintenir la viabilité des souches suffisamment longtemps, sans altérer les caractéristiques du pouvoir pathogène et de la spécificité d'hôtes.

Dans cette optique, le GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences) et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) ont travaillé en collaboration pour mettre au point une méthode simple et fiable de conservation à long terme du *P. halstedii*. Ce travail entre dans un programme plus large de développement de méthodes de conservation des champignons « obligatoires » phytopathogènes soutenu financièrement par le Ministère de l'agriculture et de la pêche dans le cadre du CTPS (Comité Technique Permanent de la sélection).

MATERIELS ET METHODES

Isolats du parasite :

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec la race 710 de *P. halstedii* pour rechercher la meilleure méthode de conservation puis les essais ont été poursuivis avec neuf races supplémentaires : races 100, 300, 304, 307, 314, 700, 703, 704 et 714 afin de connaître l'existence possible d'une interaction isolat/cryoconservation. Nous n'avons pas pu travailler sur toutes les races de la même manière car, pour les races isolées en France mais non reconnues comme installées (300, 307, 314, 700, 704 et 714), nous devons utiliser des enceintes climatiques aux normes de confinement P3 très spécialisées.

Génotypes de tournesol :

Afin de vérifier le pouvoir pathogène des isolats après congélation, nous avons utilisé les hybrides Inagri 104, Pharaon, et Pérédovick (tableau n° 1), ces mêmes génotypes ont été utilisés pour multiplier l'inoculum.

L'appartenance aux différents pathotypes des souches utilisées avant et après cryoconservation a été définie en utilisant la gamme des lignées hôtes différentiels (tableau n° 1) tel qu'elle a été préconisée au niveau international (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

Tableau 1. Caractéristiques des génotypes de tournesol utilisés pour la multiplication et la caractérisation des souches de *Plasmopara halstedii*.

Génotypes	Types	Races									
		100	300	304	307	314	700	703	704	710	714
Pérédovick	population	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
Pharaon	hybride	R	R	s	s	s	s	s	s	s	s
Inagri 104	hybride	R	R	R	R	R	s	s	s	s	s
D1 ¹	lignée	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s
D2 ¹	lignée	R	s	s	s	s	s	s	s	s	s
D3 ¹	lignée	R	R	R	R	R	s	s	s	s	s
D4 ¹	lignée	R	R	R	R	s	R	R	R	s	s
D5 ¹	lignée	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D6 ¹	lignée	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
D7 ¹	lignée	R	R	R	s	R	R	s	R	R	R
D8 ¹	lignée	R	R	R	s	R	R	s	R	R	R
D9 ¹	lignée	R	R	s	s	s	R	R	s	R	s
YVQ ²	lignée	s	s	s	s	s	R	R	s	R	s
XRQ ²	lignée	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rha340 ³	lignée	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

1. Lignées hôte différentielle (Gulya *et al.*, 1998)

2. Lignées INRA (France).

3. Lignée USDA (USA).

S : sensible. **R** : résistant.

Infection et coculture tournesol/*Plasmopara* :

La méthode utilisée a été décrite par Tourvieille de Labrouhe *et al.* (2000). Elle consiste à infecter des graines germées du tournesol avec une suspension de zoosporanges prélevés sur des plantules présentant des sporulations fraîches. L'inoculum prélevé après 48 heures d'humidité saturante est ajusté à 100 000 zoosporanges/ml. Les graines germées sont maintenues durant quatre heures dans la suspension puis elles sont repiquées dans du terreau et placées en chambre de culture. Les plantes sont maintenues 12 jours à 17-19 °C, sous 12 000 lux avec une photopériode de 12 heures. Ensuite, l'humidité saturante est maintenue durant 48 heures afin d'assurer la sporulation du parasite sur les organes aériens des plantules.

Méthodes de cryoconservation étudiées :

Les différents protocoles expérimentés sont regroupés dans le tableau n° 2. La congélation directe consiste à placer directement la suspension de zoosporanges ou les organes prélevés dans des tubes en matière plastique, dans les compartiments des différents congélateurs. La congélation avec palier est réalisée avec un cryostat HUBER CC245. Enfin la congélation après dessiccation consiste à placer les organes prélevés dans un dessiccateur au chlorure de calcium durant 24 heures avant congélation.

Critère de lecture :

La qualité de la cryoconservation est mesurée en calculant le taux de plantules présentant une sporulation sur les parties aériennes. La virulence est caractérisée selon les critères de lecture décrits par Tourvieille de Labrouhe (1999).

Tableau 2. Protocoles analysés pour la conservation des races de *Plasmopara halstedii*.

	-20 °C	-20 °C avec dessiccation	-80 °C	-80 °C avec palier à -40 °C	-80 °C avec dessiccation	avec dessiccation -80 °C (24 h) puis -180 °C	-180 °C	-180 °C avec palier à -40 °C
Suspension de zoosporanges								
Saccharose 5 %	N° 1		N° 8	N° 20			N° 26	N° 32
Saccharose 15 %	N° 2		N° 9	N° 21			N° 27	N° 33
Saccharose 20 %	N° 3		N° 10					
Saccharose 25 %			N° 11	N° 22			N° 28	N° 34
Saccharose 40 %			N° 12	N° 23			N° 29	N° 35
Saccharose 50 %			N° 13	N° 24			N° 30	N° 36
Lait écrémé 5 % + glycérol 10 %			N° 14	N° 25			N° 31	N° 37
Lait écrémé 5 % + glycérol 15 %	N° 4		N° 15					
Glycérol 5 %	N° 5		N° 16					
Glycérol 10 %	N° 6		N° 17	N° 19				
Biociphos plus	N° 7		N° 18					
Cotylédons sporulants								
Sans cryoprotectant	N° 38	N° 39	N° 40	N° 41		N° 42		
Saccharose 5 %			N° 43			N° 44		

RÉSULTATS

Avec la race 710, les observations réalisées à 2 semaines de cryoconservation nous ont conduit à ne conserver que les protocoles n° 2, 3, 8, 13, 24, 30, 38, 39, 40, 41, 42, 43 et 44 (tableau n° 2). En effet, les autres méthodes ne permettaient pas de maintenir la viabilité de notre matériel biologique. Après une année de cryoconservation, les méthodes n°2 et 3 ne nous ont pas permis de récupérer les souches, les méthodes sans dessiccation (8, 13, 24, 30, 38, 40 et 43) donnaient des taux de reprises fluctuants et souvent faibles. Pour des raisons de simplicité de manipulation nous avons conservé les méthodes avec dessiccation et sans cryoprotectant à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspondant respectivement aux numéros 39, 41 et 42. Le tableau n° 3 donne les taux de contamination obtenus avec ces méthodes après 36 mois de cryoconservation pouvant aller jusqu'à 98 % pour la race 710.

L'utilisation de l'azote liquide est délicate et nécessite de disposer d'une source facilement accessible au niveau du laboratoire. Nous avons donc privilégié la méthode la plus simple (n° 41) : la congélation directe des cotylédons sporulant, à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ après dessiccation. Cette méthode a été utilisée avec 10 isolats appartenant aux pathotypes 100, 300, 304, 307, 314, 700, 703, 704, 710 et 714 (tableau n° 3). Après plusieurs années de conservation à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, la virulence des différentes souches a été vérifiée sur deux cycles : directement en sortie de cryoconservation puis après un cycle d'entretien, le comportement des 10 isolats analysées vis-à-vis des 12 lignées hôtes différentiels est identique à leur comportement avant cryoconservation.

Tableau 3. Taux de plantule de tournesol infectée par *Plasmopara halstedii*, en fonction de la durée de cryoconservation.

Protocole ¹	Race	15 jours	6 mois	12 mois	24 mois	36 mois
N° 39	300	35			2	
	703	17				0
	710	96				5
N° 41	100	100	100	100		
	300	95	12	85	97	
	304	100	100	98		
	307	93		93		
	314	100				
	700	95	95			
	703	22	18	30	77	55
	704	100		72		
	710	93	97	96	96	97
	714	90	90			
N° 42	710	90	82	97	100	98

1. Voir tableau n° 2.

CONCLUSION – DISCUSSION

Depuis 1988 de nombreuses races de mildiou sont apparues en France. Très rapidement il s'est révélé impossible d'entretenir simultanément toutes ces nouvelles races d'autant plus que son statut de parasite de quarantaine implique qu'il soit manipulé dans des enceintes ayant des normes de confinement strictes. Nous sommes parvenus à mettre au point une méthode simple de conservation des races de *Plasmopara halstedii* qui ne modifie pas le profil de virulence de nos isolats. Toutefois nous avons observé que la race 703 se conserve moins bien que les 9 autres races analysées, ce qui peut supposer que d'autres souches puissent poser ce type de problème.

Depuis l'an 2000, après 5 ans d'expérimentation appliquée à la conservation d'isolats de différents programmes avec cette méthode, nous avons récupéré plus de 200 isolats avec un taux de réussite supérieure à 99 % (un seul échec). Cette technique est aujourd'hui réalisée en routine à la fois à la Station Nationale d'Essais de Semences d'Angers et à l'INRA. Ces deux laboratoires travaillent régulièrement avec *Plasmopara halstedii*, le premier pour évaluer la résistance des nouveaux génotypes de tournesol au mildiou dans le cadre de l'inscription des variétés au catalogue français, le second pour caractériser et étudier les nouvelles races de mildiou. Le protocole utilisé est le suivant :

FICHE TECHNIQUE DU PROTOCOLE

Préparation de l'inoculum

Les cotylédons de plantules préalablement infectées (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000) et présentant une importante sporulation sont placés dans un dessiccateur contenant du CaCl₂ anhydre (hygrométrie relative de 35 %), à 20 °C pour une durée de 24 heures (ne pas dépasser 30 heures dans le dessiccateur). Les cotylédons desséchés sont ensuite placés dans des flacons correctement étiquetés.

Congélation

La congélation se fait sans précaution particulière en plaçant les flacons étiquetés directement dans un congélateur – 80 °C. Dans le cas de conservation pour une durée très longue (plus de 5 années) il semblerait intéressant de déplacer l'échantillon vers un bac de conservation à l'azote liquide (– 196 °C).

Décongélation

La décongélation se fait très rapidement en versant directement dans le récipient contenant les cotylédons de l'eau à 4 °C et en secouant l'ensemble durant quelques secondes.

Infection

Cet inoculum est ensuite versé dans des piluliers contenant des graines germées (radicule de 3 à 10 mm de longueur). Les germes sont maintenus en contact avec l'inoculum pendant 4 heures à température ambiante. Ensuite, les graines sont repiquées, puis élevées selon le protocole utilisé pour le jugement des génotypes (Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 2000).

Remarques

En France, Plasmopara halstedii, étant un parasite de quarantaine, sa manipulation exige l'obtention d'une autorisation émanant des Service de la Protection des Végétaux.

Il est préférable d'effectuer la reprise de l'inoculum en sortie de cryoconservation sur un génotype vigoureux (hybride ou population) ne possédant aucun gène *Pl* de résistance. Ceci permet d'obtenir un inoculum abondant pour les manipulations suivantes.

Il est indispensable de réaliser régulièrement des contrôles de profil de virulence en utilisant les lignées hôte différentiels officielles (Gulya *et al.*, 1998).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- O'BRIEN R.G. & WEINERT M., 1994 — A storage technique for cucurbit powder mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). *Australasian Plant Pathology* 23: 86-87.
- VEGH J., KONIDARIS J., LEBERRE A., CHAMPION R., BONNET P. & BESSON P., 1988 — Conservation des champignons phytopathogènes dans l'azote liquide après congélation progressive obtenue avec le Minicool. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 23(1-2): 81-93.
- GUÉNARD M., MOLINERO DEMILLY V., GIROULT C., CASSAGNE S. & TARA-BEUX G., 2000 — *Mise au point de techniques de conservation à long terme des agents phytopathogènes - application à la conservation de 2 champignons obligatoires : Plasmopara halstedii (Farl.) Berl. et de Toni, agent du mildiou du tournesol, Bremia lactucae Regel, agent du mildiou de la laitue.* 6^e Conférence Internationale sur les Maladies des Plantes, Tour (France), 6-8 décembre, 1: 157-165.
- GULYA T.J., MASIRECIC S. & THOMAS E., 1993 — Reservation of air-dried downy mildew sporangia in liquid nitrogen without cryoprotectants or controlled freezing. *Mycology res.* 97(2): 240-244.
- GULYA T.J., TOURVIEILLE de LABROUHE D., MASIREVIC S., PENAUD A., RASHID K. & VIRANYI F., 1998 — *Proposal for standardized nomenclature and identification of races of Plasmopara halstedii (Sunflower Downy Mildew).* Isa Symposium II "Sunflower Downy Mildew", Fargo (USA), 13-14 January, 130-136.
- LAMARQUE C., 1983 — Fréquence épidémique des principales maladies du tournesol observées en France pendant cette dernière decade (1972-1982) et leur symptomatologie évolutive en relation avec le climat. *Garcia de Orta, Derie de Estudos Agronomicos* 10(1-2), 123-130.
- MOLINERO-DEMILLY V., CASSAGNE S., GIROULT C. & GUENARD M., 2002 — *Mise au point d'une méthode de conservation à long terme de deux parasites obligatoires : Bremia lactucae et Plasmopara halstedii.* Aussois, IV^e Rencontres phytopathologie/mycologique, 13-17 mars.
- TOURVIEILLE 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.
- TOURVIEILLE de LABROUHE D., DUCHER M., PHILIPPON J., MELIALA C. & WALSER P., 2000 — *Les méthodes d'analyse du mildiou.* In : Le mildiou du tournesol. Inra - Editions, RD 10 Versailles (France), 176 p.
- TOURVIEILLE de LABROUHE D., 2003 — *El mildiu del girasol : manejo de estrategias de control para una eficacia durable.* 2^o Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires (Argentina), 12 y 13 de Agosto. http://www.asagir.org.ar/2_congreso/P06.-TOURVIEILLE.pps
- VEAR F. & TOURVIEILLE de LABROUHE D., 1987 — Test de résistance au mildiou chez le tournesol : nouvelles techniques de conservation de l'inoculum. *Inf. tech. CETIOM*, 98: 19-20.