Diagnostic moléculaire de la présence de mildiou (*Plasmopara halstedii*) dans les semences de tournesol

Molecular diagnosis of mildew (*Plasmopara halstedii*) infection in sunflower seeds

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 8, Numéro 3, 258-60, Mai - Juin 2001, Fondamental

Auteur(s) : Véronique SAYS-LESAGE, Cipta MELIALA, Paul NICOLAS, Patricia ROECKEL-DREVET, Denis TOURVIEILLE DE LABROUHE, UMR Inra-UBP Amélioration et Santé des plantes, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.

Résumé : Le mildiou du tournesol, causé par l'oomycète *Plasmopara halstedii*, est une maladie potentiellement dévastatrice et économiquement importante. Du fait du risque de propagation de la maladie par les semences infectées et de l'observation croissante de l'apparition d'isolats résistants au métalaxyl, il est apparu nécessaire de mettre au point une méthode de détection du parasite dans les graines ou les tissus de la plante. Nous avons donc développé un test moléculaire pour le diagnostic de la présence du mildiou dans les semences. Plusieurs méthodes d'extraction ont été comparées pour améliorer le rendement et la qualité de l'ADN du parasite présent en faible quantité. Des échantillons de graines contaminées entières et décortiquées ont été analysés par PCR, avec des amorces spécifiques de *Plasmopara halstedii*. L'ADN de l'agent pathogène est toujours détecté, notamment dans les coques. Ces données sont importantes pour le développement d'un kit de diagnostic.

Mots-clés : diagnostic, mildiou, tournesol, *Plasmopara halstedii*, PCR.

Summary : Sunflower downy mildew, caused by the fungus *Plasmopara halstedii*, is a potentially devastating disease with important economical implications. Because of the risk of propagation of the disease by infected seeds and of the regular observation of metalaxyl-resistant isolates of the fungus, there is a greater need for efficient method to detect the fungus in seed or plant tissue. Therefore, we develop-ed a molecular test to show the presence of sunflower downy mildew in seed samples. Several extraction methods were compared to improve quality and yield of the scanty DNA of the fungus. Both whole and hulled seeds of contaminated samples were analysed by PCR, using *Plasmopara halstedii* specific primers. We demonstrated that DNA of the pathogen is always detected, notably in the shell fraction. These data are important for the development of a diagnostic kit.

Keywords : diagnostic, downy mildew, sunflower, *Plasmopara halstedii*, PCR.

ARTICLE

Impact du mildiou du tournesol en France

Depuis le début des années 50, la culture du tournesol en France a connu une progression constante. Cependant, son essor s'est vu menacé par l'apparition du mildiou en 1966 puis de ses nouvelles races à partir de 1988 [1]. Le traitement des semences d'hybrides de tournesol a alors été rendu

obligatoire. Des variétés résistantes aux nouvelles races de mildiou ont par la suite été créées, ce qui a permis de réserver le traitement des semences aux variétés sensibles et ainsi de limiter la pression de sélection sur le parasite. Cependant, le traitement effectué de façon quasi exclusive avec du métalaxyl sur ces variétés a provoqué l'apparition de souches de mildiou résistantes à ce produit en proportions alarmantes : jusqu'à 80 % des isolats analysés en 1999 (source : SRPV Midi-Pyrénées). Un fongicide de contact a donc été autorisé en association avec le métalaxyl.

La présence diffuse de la maladie provoque des pertes souvent discrètes au niveau des cultures, mais a un impact économique non négligeable du fait des coûts dus aux traitements, à l'amélioration variétale et à la surveillance des cultures [2]. Ceci pourrait remettre en cause l'intérêt de la production de tournesol. Face aux nouvelles races, à d'autres pathotypes existant dans les pays tiers (Europe, Amérique, Afrique du Nord) et à un risque de voir s'étendre le phénomène de résistance aux anti-mildious, il est indispensable de disposer d'une méthode rapide permettant de diagnostiquer la présence de mildiou dans les lots de semences, et ainsi de limiter l'introduction de nouveaux pathotypes et la circulation des semences contaminées. Cette technique pourra également servir de méthodologie pour des certificats sanitaires à l'exportation.

Mise au point du diagnostic moléculaire

Pour répondre à ce besoin, au sein de l'UMR (Unité mixte de recherche) « Amélioration et Santé des plantes » de Clermont-Ferrand, nous avons élaboré un test de diagnostic moléculaire de la présence de mildiou dans les semences de tournesol.

Plusieurs méthodes d'extraction de l'ADN (contenu dans 300 à 500 mg de graines broyées finement) ont été comparées afin de déterminer celle qui permet d'obtenir le meilleur compromis entre rendement et qualité de l'ADN. Il faut, en effet, se mettre dans les meilleures conditions pour mettre en évidence l'ADN du parasite, présent en faible quantité par rapport à celui de la semence.

Après extraction de l'ADN avec un protocole dérivé de celui décrit par Dellaporta *et al.* [3] et faisant intervenir une résine de purification (Amersham RPN 8511), une amplification par PCR est réalisée avec des amorces spécifiques du mildiou du tournesol (*Plasmopara halstedii*) [4]. Après 30 cycles, le produit d'amplification est déposé sur un gel d'agarose et soumis à une électrophorèse qui sépare les fragments présents dans l'amplifiat. Le gel est ensuite observé sous UV, après coloration au bromure d'éthidium.

Graines entières

Le protocole décrit précédemment a été appliqué sur des lots de graines contaminées.

La contamination de ces graines a été avérée au préalable par observation en microscopie optique selon le protocole indiqué dans l'*encadré*.

La *photo 1* montre que la bande spécifique du mildiou (taille de l'ordre de 1kb) est présente dans tous les lots de graines contaminées, notés GM. Elle est absente, en revanche, de l'extrait de feuilles saines de tournesol (TF) ainsi que du lot de graines saines (GT).

Le deuxième fragment de l'ordre de 400 pb, visible sur la photo, est spécifique de tournesol : en effet, afin d'avoir un témoin interne d'amplification pouvant révéler une éventuelle inhibition de la réaction, nous avons ajouté un couple d'amorces spécifiques de la plante dans chaque réaction.

Sur ces lots, la contamination variait de 70 à 100 %. D'autres travaux réalisés sur 23 lots, contenant 0, 1, 10, 50 et 100 % de graines issues de plantes présentant des symptômes de mildiou, nous ont permis de montrer que le seuil de détection est de 10 % de graines dites contaminées. Mais il faut noter que toutes les graines provenant d'une plante avec symptômes ne contiennent pas nécessairement le parasite.

Graines décortiquées

Pour vérifier l'efficacité de ce protocole, nous avons également testé cette méthode sur des lots de graines contaminées décortiquées. Le décortiquage a été réalisé mécaniquement dans un appareil Techmachine. Le choc subi par la graine entraîne la cassure du péricarpe mais aussi une fragmentation de l'amande. Deux fractions ont donc été récupérées, d'une part, les coques libres (C) et, d'autre part, le mélange fines + amandes (F) constitué d'amandes brisées ou non et de fragments du tégument interne du péricarpe. L'ADN a été extrait de ces deux types de fractions, puis amplifié et soumis à électrophorèse, de la même manière que précédemment.

Comme le montre la *photo 2*, le fragment spécifique du mildiou apparaît avec une intensité variable selon les échantillons, mais il est présent dans tous et notamment toujours dans les coques (C). Le fait que nous mettions en évidence la présence de mildiou dans la fraction fines + amandes ne remet pas en cause les résultats publiés précédemment [5] selon lesquels le mycélium n'est pas présent dans l'amande. L'ADN de mildiou amplifié dans cette fraction provient probablement du tégument interne obtenu en mélange avec les amandes.

Perspectives

La détection constante du mildiou dans les coques est une donnée qui sera utile pour la mise au point de l'échantillonnage, nécessaire à la détection dans des lots de semences de grand volume. L'extraction d'ADN pourra, en effet, être conduite uniquement sur les coques, ce qui permettra, à poids d'échantillon constant, d'analyser un plus grand nombre de graines.

CONCLUSION

Remerciements

Nous remercions le GNIS (Groupement national interprofessionnel des semences et plants) pour son soutien financier.

REFERENCES

1. PENAUD A, LAFON S, TOURVIEILLE J (2000). Les enjeux, Plus de trente ans de mildiou en France. In : TOURVIEILLE DE LABROUHE D, PILORGÉ E, NICOLAS P, VEAR F, eds. *Le mildiou du tournesol*. Cetiom et Inra éditions : 23-9.

2. JOUFFRET P, PILORGÉ E, PINOCHET X (2000). Les enjeux, nuisibilité et enjeux économiques du mildiou du tournesol en France. In : TOURVIEILLE DE LABROUHE D, PILORGÉ E, NICOLAS P, VEAR F, eds. *Le mildiou du tournesol*. Cetiom et Inra éditions : 31-5.
3. DELLAPORTA SL, WOOD J, HICKS JB (1983). A plant DNA miniprepération : version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1: 19-21.
4. ROECKEL-DREVET P, TOURVIEILLE J, DREVET JR, SAYS-LESAGE V, NICOLAS P, TOURVIEILLE DE LABROUHE D (1999). Development of a polymerase chain reaction test for the detection of the pathogen *Plasmopara halstedii* in sunflower. *Can J Microbiol*, 45 : 797-803.
5. MELIALA C, VEAR F, TOURVIEILLE DE LABROUHE D (1999). Relation between date of infection of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and symptoms development. *Helia*, 23 : 35-44.

Illustrations

M = mildiou, TF = tournesol feuilles saines, GT = lot de graines saines, GM = lots de graines contaminées, eau = témoin négatif

Photo 1. Visualisation des fragments, amplifiés par PCR, présents dans les lots de semences contaminées.

Photo 2. Visualisation des fragments, amplifiés par PCR, présents dans les coques (C) et dans le mélange fines + amandes (F).

Encadré

Quinze capitules, issus de plantes montrant des symptômes systémiques de mildiou, nous ont été fournis par le SRPV Midi-Pyrénées. Toutes les graines récoltées sur un capitule constituent un lot. Une coupe à main levée a été réalisée sur 30 graines de chaque lot. La présence de mycélium et de zoosporanges et/ou d'osspores a été recherchée au grossissement 100. Le tableau suivant récapitule les résultats des observations.

N° du lot	Nb de graines/lot	Nb de graines dans lesquelles le mildiou a été observé
GM 99.23	179	27/30
GM 99.24	437	30/30
GM 99.25	225	21/30
GM 99.26	496	30/30
GM 99.27	246	26/30
GM 99.28	521	30/30
GM 99.29	229	30/30
GM 99.30	521	24/30
GM 99.31	229	30/30
GM 99.32	298	30/30
GM 99.33	467	22/30
GM 99.34	488	30/30
GM 99.35	283	22/30
GM 99.36	230	28/30
GM 99.37	329	28/30