

Variabilité de l'agressivité de *Plasmopara halstedii*, étude de sa stabilité en test de laboratoire

Denis TOURVIEILLE DE LABROUHE
Pascal WALSER
Frédéric SERRE
Jeanne TOURVIEILLE
avec l'aide de Dumas A., Fournier V.,
Pister A.

INRA-UMR « GDEC »,
Plateforme de pathologie végétale,
234, avenue du Brézet,
63100 Clermont-Ferrand
<tourvie@clermont.inra.fr>

Abstract: Evolution of pathogenicity in *Plasmopara halstedii* was analysed by successive artificial infections of two strains with different levels of aggressiveness on two sunflower genotypes not carrying major gene resistance but which show different levels of partial resistance. Symptoms, in particular of plant size and sporulation density, confirmed the differences between the two lines observed in the field. The parasite populations studied showed considerable adaptation to infection conditions: the percentage of plants showing severe symptoms increased by 5% at each infection cycle, for both pathogen strains and both sunflower genotypes. These first laboratory results need to be confirmed in the field to judge the possible durability of quantitative resistances which could be introduced in sunflower breeding programmes.

Key words: mildew, sunflower, pathogenicity, adaptation, selection pressure

Introduction

La mise en évidence d'une résistance non-race spécifique chez le tournesol vis-à-vis du mildiou [1] permet d'espérer une meilleure gestion des résistances génétiques qu'elles soient monogéniques dominantes ou polygéniques partielles. Cependant, la durabilité de cette résistance partielle est conditionnée à la capacité plus ou moins importante du parasite à évoluer vers plus d'agressivité. Le mildiou est-il capable de surmonter la résistance non-race spécifique au même titre qu'il est capable de surmonter la résistance race spécifique apportée par les gènes *PI* [2] ?

Sakr [3] a mis en évidence une forte variabilité de l'agressivité chez *Plasmopara halstedii* mesurée dans des conditions de laboratoire d'une part. D'autre part, nous avons montré que les génotypes de tournesol présentaient une large variabilité de résistance non-race spécifique [1]. La question qui se pose est la suivante : la génétique de tournesol exerce-t-elle une pression de sélection sur la population parasitaire ? Si la réponse est oui pour l'aspect qualitatif du pouvoir pathogène (virulence) [2], il nous faut étudier ce qu'il en est pour l'aspect quantitatif du pouvoir pathogène (agressivité). En d'autres termes : est-ce que la résistance non-race spécifique est stable ? Dans un premier temps nous allons nous intéresser à cette stabilité lors de cycles de tests réalisés en laboratoire.

Matériel et méthodes

Caractérisation des souches de Plasmopara halstedii : le profil de virulence est déterminé selon le comportement d'hôtes différentiels [4] observé lors de tests sur graines germées. Le niveau d'agressivité est mesuré à partir de ces mêmes tests. Il est calculé de la façon suivante : [Nb de plantules des hôtes différentiels sensibles qui sporulent sur feuilles (*sensible type I*, figure 1a)/Nb des plantules infectées] + [Nb de plantules des hôtes différentiels résistants qui sporulent sur hypocotyle ou sur cotylédons (*résistant type II*, figure 1c)/Nb des plantules infectées]. Il fluctue de 0 à 1 : 0 = toutes les plantules des hôtes différentiels sensibles ne présentent pas de sporulation sur la première paire de feuilles et toutes les plantules des hôtes différentiels résistants ne présentent aucune spore quel que soit l'organe. 1 = toutes les plantules des hôtes différentiels sensibles sporulent sur feuilles et toutes les plantules des hôtes différentiels résistants présentent quelques spores sur cotylédons et/ou hypocotyle.

Matériel biologique

Nous avons travaillé avec deux souches de *Plasmopara halstedii* (R710 et R304) appartenant aux pathotypes 710 et 304. Ces souches présentent des niveaux d'agressivité observés en laboratoire (notes calculées sur les hôtes différentiels D1, D2 sensibles aux deux races et D5,

D6, D7, D8 résistants aux deux races [4]) différents : $0,33 \pm 0,02$ pour R710 (128 tests) et $0,22 \pm 0,02$ pour R304 (104 tests). Ces deux souches ont été confrontées à deux lignées pures « FU » et « GB » de tournesol ne portant aucun gène *PI* de résistance mais présentant, au champ, des résistances non-race spécifiques différentes (30 % d'attaque en moyenne sur 4 années pour « FU » et 75 % pour « GB » [1]).

Plan expérimental

Les tests sont réalisés dans deux enceintes de culture différentes, une pour chaque souche. Celles-ci sont multipliées sur les deux génotypes de tournesol. À chaque cycle, les deux génotypes sont infectés selon le protocole décrit par Roche *et al.* [5] avec les 4 sources d'inoculum (R304 et R710 multipliées sur « GB » = inoGB, R304 et R710 multipliées sur « FU » = inoFU) (figure 2). Chaque traitement porte sur deux répétitions de 30 plantules. Des graines germées de chaque génotype suivent le même traitement en absence de zoospores afin d'obtenir des plantes témoins. Pour chaque infection, les suspensions de zoospores sont obtenues avec exactement le même nombre de plantules sporulant (12) défini en début d'expérimentation pour avoir environ 10^4 zoosporanges/mL dans la suspension contaminante.

Le test est réalisé dans des conditions normales [5], les observations portent :

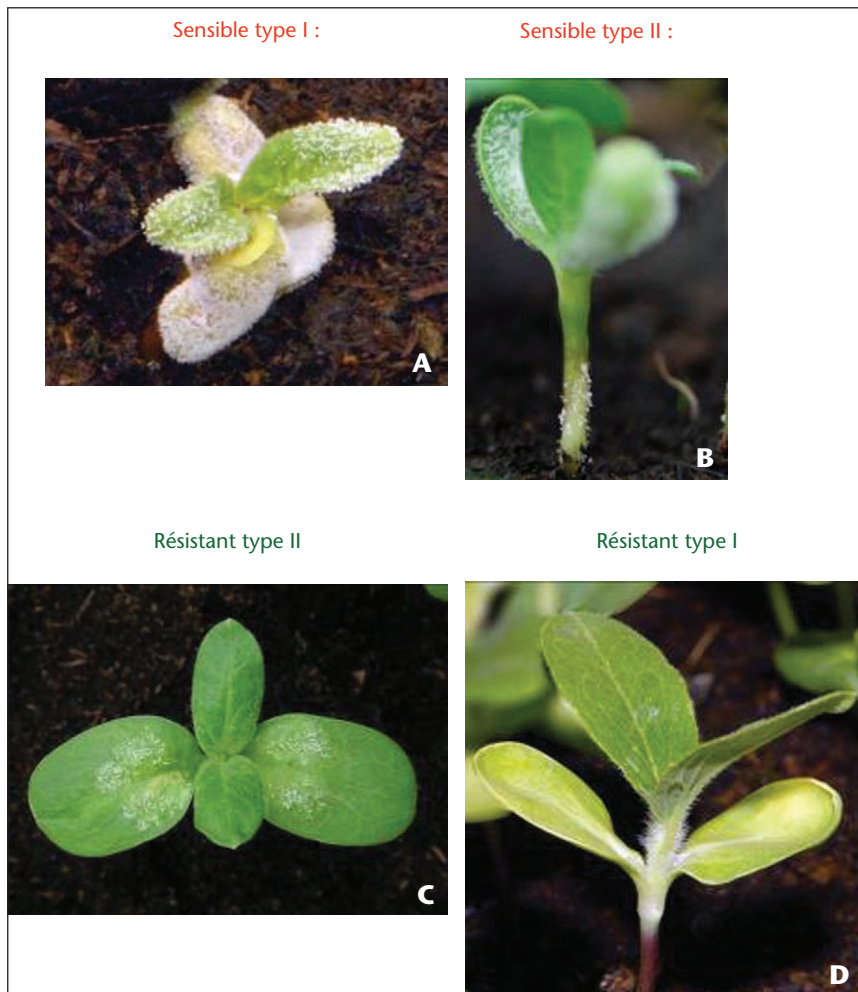


Figure 1. Caractérisation des types de résistance ou de sensibilité observés lors des « tests Mildiou » réalisés sur graines de tournesol germées.

– Sur la taille des plantules (longueur de l’hypocotyle), pour comparer les deux génotypes cette taille est exprimée en pourcentage de la taille moyenne des plantes non infectées.

– Sur les symptômes observés, nous utilisons un barème à 5 classes :

- Pourries = fonte de semis,
- S type I = Sporulation sur la première paire de feuilles (figure 1A),
- S type II = Pas de sporulation sur les feuilles, mais forte sporulation sur cotylédons (figure 1B),
- R type II = Pas de sporulation sur les feuilles, mais légère sporulation sur cotylédons (figure 1C),
- R type I = Aucune sporulation visible sur les cotylédons ou les feuilles (figure 1D).

Ces notations nous permettent de calculer le pourcentage de vraies sensibles (VS) qui correspondent au pourcentage de plantules appartenant aux deux premières classes : Pourries et S type I. C’est ce critère qui est utilisé pour quan-

tifier en laboratoire le niveau de résistance non-race spécifique des génotypes de tournesol ne disposant pas de gène *Pl* efficace [6].

Les tests ont été réalisés sur 10 cycles consécutifs selon le protocole présenté en figure 2.

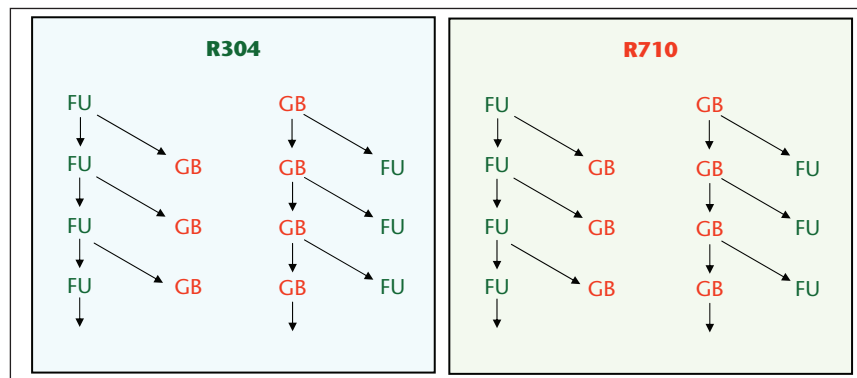


Figure 2. Protocole d’infection utilisé pour étudier la stabilité de l’agressivité de deux souches de *Plasmopara halstedii* (R304 et R710) sur deux lignées de tournesol (« FU » et « GB »).

Analyses statistiques

Une ANOVA sur les pourcentages transformés (arc sinus) a été réalisée avec le logiciel StatBox® 6.7. Les intervalles de confiance ($p = 0,05$) sont donnés par le logiciel Excel®.

Résultats

Évolution de la taille des hypocotyles

Les moyennes portent sur les plantes ne présentant pas de fonte de semis.

Les analyses statistiques montrent un effet significatif pour les facteurs :

- Cycles ($F = 39,6$; $p 0,00$) ;
- Souches ($R304 = 44,6\% > R710 = 38,0\%$; $F = 427,2$; $p 0,00$) ;
- Génotypes (« GB » = $42,7\% >$ « FU » = $39,8\%$; $F = 81,5$; $p 0,00$) ;
- Origines de l’inoculum (inoFU = $41,9\% >$ inoGB = $40,6\%$; $F = 15,8$; $p 0,00$).

Les figures 3A et 3B représentent l’évolution de la réduction de la taille des hypocotyles en fonction des cycles de multiplication.

Pour la souche R304, la taille des plantules infectées diminue de l’ordre de 1 % par cycle. Elle passe de 53 % des témoins non infectés à 43 % sur dix cycles de multiplication. Pour cette souche, on n’observe pas de différence majeure entre les traitements, ce qui est confirmé par les analyses statistiques : même groupe homogène (test de Newman-Keuls – $p = 0,05$).

Pour la souche R710, la taille des plantules infectées diminue également de 1 % par cycle pour le génotype « FU ». Elle passe de 40 % des témoins non infectés à 30 % sur dix cycles de multiplication alors qu’elle est stabilisée à 40 % pour le génotype « GB ». Avec cette souche et à l’intérieur de chaque génotype, on n’observe pas de différence majeure entre les origines de l’inoculum, ce qui est confirmé par les analyses statistiques : même groupe homogène (test de Newman-Keuls – $p = 0,05$).

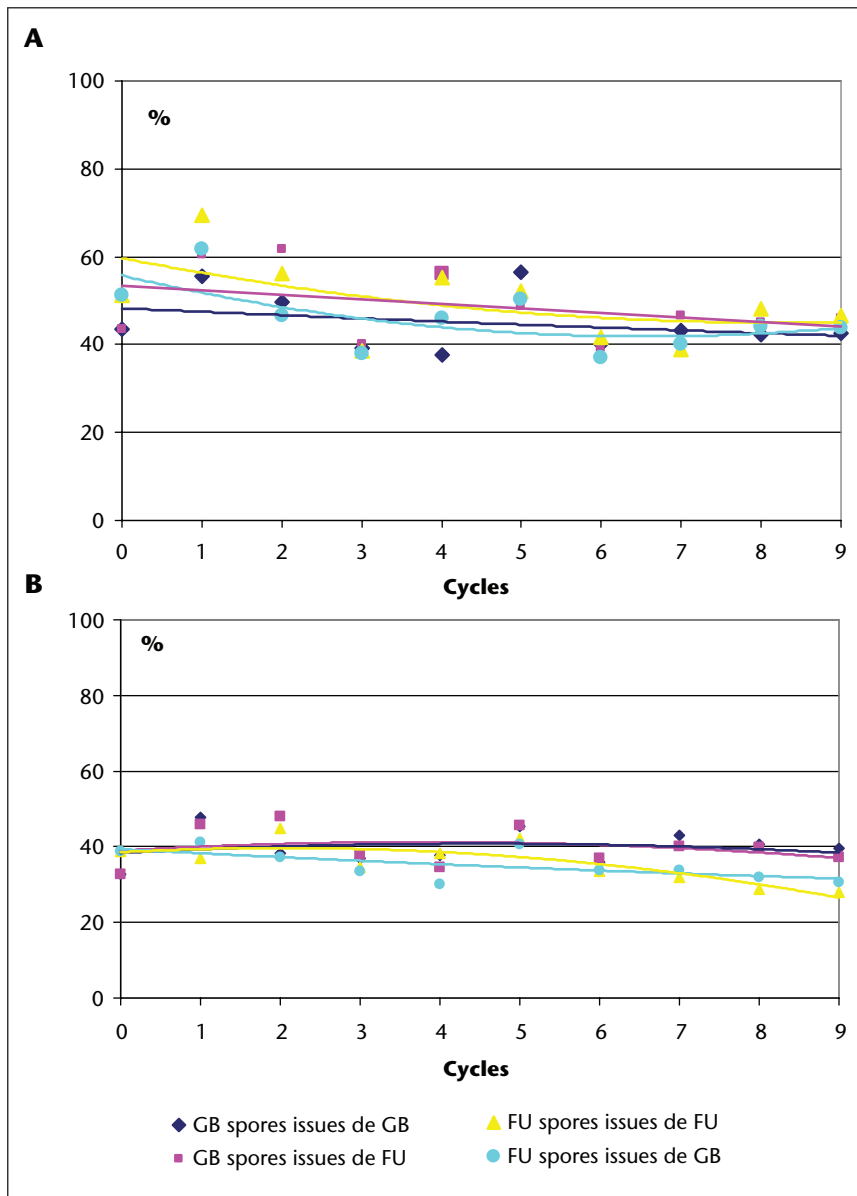


Figure 3. A) Évolution de la longueur des hypocotyles exprimée en pourcentage des témoins non infectés, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R304 de *Plasmodiopsis halstedii*. B) Évolution de la longueur des hypocotyles exprimée en pourcentage des témoins non infectés, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R710 de *Plasmodiopsis halstedii*.

Évolution des symptômes

Les taux de plantules pourries fluctuent peu et ne semblent pas augmenter de façon significative. Les droites de régression (taux/cycle) présentent des pentes faibles : souche R304 = 0,11 et souche R710 = 0,45 (figures 4A et 4B).

La souche R304 n'a provoqué que très peu de fonte de semis, cela peut être dû à sa faible agressivité ou à des conditions particulières non maîtrisées de l'enceinte de culture utilisée

pour cette souche. Il faut toutefois remarquer une très légère progression des fontes de semis observées sur la lignée « FU ».

La souche R710 provoque plus de fonte de semis que la souche R304. Les taux de plantules pourries semblent augmenter avec les cycles aussi bien pour la lignée résistante « FU » que pour la lignée sensible « GB ».

Le nombre de plantules sans symptôme est quasiment nul (< à 2 %), à l'exception du cycle 1 avec la souche R304 où il atteint en moyenne 27 %.

Les analyses porteront essentiellement sur l'évolution des % de VS qui intègrent la classe des « pourries ».

Les analyses statistiques montrent un effet significatif pour les facteurs :

- Cycles (de 33,5 % (cycle 0) à 69,4 % (cycle 9) ; F = 73,8 ; p 0,00) ;
- Génotypes (« GB » = 74,2 % > « FU » = 25,4 % ; F = 2788,9 ; p 0,00) ;
- Origines de l'inoculum (inoFU = 48,4 % < inoGB = 51,2 % ; F = 8,7 ; p 0,00) ;
- L'interaction souche/génotype (tableau 1) (F = 9,9 ; p 0,00) ;
- L'interaction source d'inoculum/génotype (tableau 2) (F = 4,4 ; p 0,04).

Les figures 5A et 5B représentent l'évolution du taux de plantules présentant des spores sur feuilles et/ou une fonte de semis, en fonction des cycles de multiplication.

Si pour un génotype donné, le comportement est similaire quelle que soit l'origine de l'inoculum (avec des taux toujours légèrement plus élevés lorsque l'inoculum est produit sur le génotype « GB »), les taux de « vraies sensibles » sont très différents pour « GB » et « FU ». Pour les deux génotypes, on observe une nette progression de % de VS. Ils commencent au alentour de 50 % pour arriver rapidement à 100 % après 5 ou 6 cycles de multiplication chez le génotype « GB ». Par contre, avec « FU », le taux quasiment nul en début d'expérimentation, atteint environ 50 % après 9 cycles de multiplication.

Les observations réalisées avec la souche R710 sont tout à fait similaires à celles qui sont obtenues avec la souche R304 avec des taux de VS plus élevés de 10 points en moyenne. Il n'apparaît pratiquement pas de différence en fonction de l'origine de l'inoculum.

Discussion

Des différences observées entre les souches R304 et R710 peuvent être dues à des différences de conditions de culture. En effet, il ne nous a pas été possible de réaliser les séries dans la même enceinte climatique afin de ne pas prendre le risque de mélanger les souches. Les différences de conditions de culture existent puisque les plantes témoins ayant suivi le même traitement (sans zoosporange) présentent des différences de taille selon les enceintes, non négligeables :

- Enceinte souche R304 : taille de « FU » = 57,2 ± 1,2 mm ; taille de « GB » = 48,2 ± 1,8 mm ;
 - Enceinte souche R710 : taille de « FU » = 42,2 ± 1,1 mm ; taille de « GB » = 34,3 ± 1,0 mm ;
- Pour lever un éventuel doute sur les comparaisons entre les deux souches, il serait envisageable de reconduire l'expérimentation en intervertissant les souches.

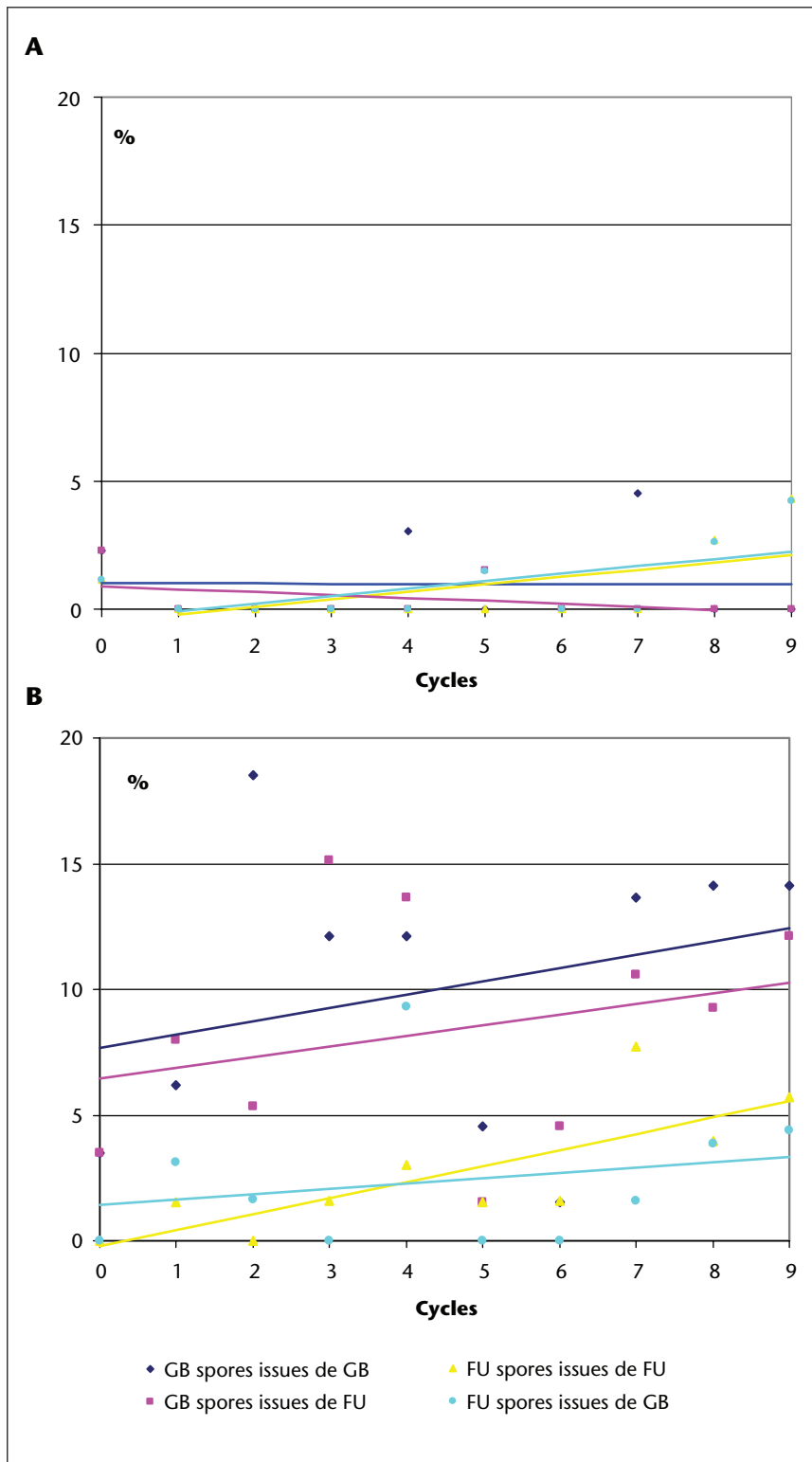


Figure 4. A) Évolution du taux de fonte de semis, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R304 de *Plasmopara halstedii*. B) Évolution du taux de fonte de semis, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R710 de *Plasmopara halstedii*.

Résistance et agressivité

Pour un génotype donné ; les hypothèses de départ sont :

- Plus la taille est réduite et plus la souche est agressive.
- Plus le pourcentage de VS est élevé et plus la souche est agressive

Et pour une souche donnée :

- Plus le pourcentage de VS est élevé et plus le génotype de tournesol est sensible.

La souche R710 provoque une réduction de taille plus importante que la souche R304 en accord avec notre hypothèse. Par contre, et cela avait déjà été observé par Sakr [3], c'est le génotype de tournesol réputé le plus résistant qui présente la plus forte réduction de taille, en particulier vis-à-vis de la souche de *Plasmopara halstedii* la plus agressive (souche R710). Ceci peut s'interpréter par le fait que les réactions cytologiques qui accompagnent les réactions de défense provoqueraient également une réduction de taille. L'inoculum produit sur « GB » (la lignée la plus sensible) semble plus « agressif » que l'inoculum produit sur la lignée « FU », l'agressivité mesurée peut englober de très nombreux facteurs : nombre de propagules infectieuses produites, pouvoir pathogène, etc. La souche R710 produit des symptômes plus importants sur la lignée résistante « FU » que la souche R304, ce qui semble confirmer que cette souche est plus agressive que la souche R304 mais cela apparaît en désaccord avec les conclusions de Sakr [3] qui a montré qu'une autre souche de virulence 304 était plus agressive qu'une souche de virulence 710. Cette contradiction montre que l'agressivité et la virulence d'une souche sont indépendantes. Enfin, le génotype résistant « FU » présente significativement moins de symptômes que la lignée « GB » et cela quels que soient la souche et le cycle. Les comportements de ces génotypes en test de laboratoire avec les deux souches de *Plasmopara halstedii*, sont identiques à ceux qui sont observés en infections naturelles avec deux pathotypes : 710 et 703 [1].

Évolution de l'agressivité

Dans notre expérimentation, le génotype de l'hôte est stable puisque nous utilisons, du début à la fin de l'expérimentation qui a duré 20 semaines, les mêmes lots de semences. Les conditions de culture sont estimées stables. En effet le réglage n'a pas été modifié et la quantité de matériel (nombres de pots ou de terrines) placée dans les chambres a été la même durant toute l'expérimentation. Les relevés physiques (températures, humidité et intensités lumineuses) n'ont pas fait apparaître d'anomalie. Nous pouvons donc admettre que les changements de réponse observés dans le comportement des deux lignées de tournesol

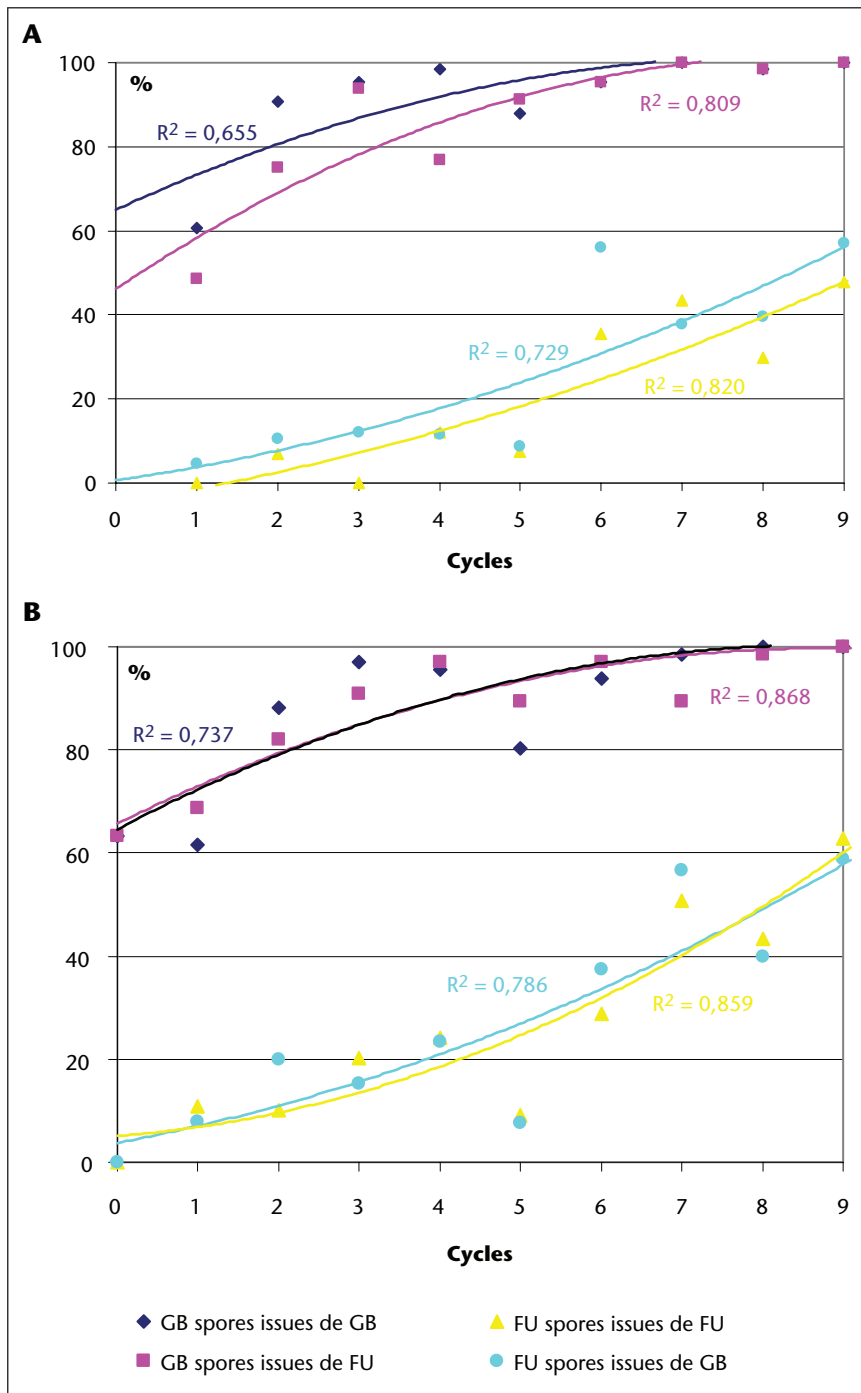


Figure 5. A) Évolution du taux de plantules classées VS⁽¹⁾, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R304 de *Plasmopara halstedii*. B) Évolution du taux de plantules classées VS⁽¹⁾, en fonction des cycles de multiplication et de l'origine de l'inoculum, pour deux génotypes de tournesol (« GB » et « FU ») infectés par la souche R710 de *Plasmopara halstedii*.

indiquent un changement du pathogène. Cela est possible car il est admis qu'une souche qui n'est pas obtenue par isolement d'une seule zoospore est en réalité une population d'individus ayant le même profil de virulence, dont la diversité est soumise à divers processus, tels

que la sélection des individus les mieux adaptés ou le brassage génétique rendu possible par anastomoses des hyphes coenocytiques. Il est remarquable d'observer un rapide gain d'agressivité avec les deux souches et qui s'exprime sur les deux lignées de tournesol.

Le génotype « GB », passablement sensible lors des premiers cycles atteint rapidement 100 % de plantules présentant les symptômes les plus importants qui caractérisent les génotypes dépourvus de résistance. Ce taux est atteint en seulement 3 cycles avec la souche la plus agressive : R710 et en 5 cycles pour R304. Pour le génotype qui présente un bon niveau de résistance non-race spécifique, cette évolution apparaît aussi rapide puisqu'en 10 cycles, ce taux passe de 0 % à plus de 60 %. La forme des courbes obtenues avec les deux lignées et les deux souches laisse à penser que cette évolution devrait se poursuivre jusqu'à l'obtention de souches hyperadaptées au test mis en œuvre. Il ne serait alors plus possible de distinguer les 2 lignées sur le simple critère : % VS. Cependant, la durée de la période de latence et la densité de la sporulation [7] (critères non étudiés) pourraient, alors, permettre de mesurer en laboratoire les écarts de sensibilité observés en infection naturelle entre nos deux lignées de tournesol.

Conclusion

Il apparaît clairement que contrairement à la virulence, l'agressivité de *Plasmopara halstedii* n'est pas stable dans le temps lorsque les souches sont multipliées en chambre de culture. Cette adaptation du parasite aux conditions du test pose le problème de la fiabilité des observations des mesures de la résistance non-race spécifique [6]. Celles-ci, devraient être systématiquement réalisées avec des témoins de référence permettant de quantifier le niveau de l'agressivité de l'inoculum.

Les observations des symptômes en présence d'un gène majeur de résistance (gène *P1*) ont montré que les réactions des plantules étaient complexes. La présence ou l'absence de sporulation dépend à la fois de la source de résistance (gène *P1*) [8] et du fond génétique (QTL de résistance) [9]. Il n'est pas impossible qu'un excès d'agressivité (adaptation de la souche aux conditions du test réalisé en chambre de culture) ou inversement (faible agressivité de la souche utilisée) conduise à une mauvaise interprétation du comportement des génotypes analysés. En effet, la distinction entre les classes S-type II et R-type II se fait exclusivement sur l'importance des sporulations qui apparaissent sur les cotylédons.

Enfin, il serait judicieux de pouvoir travailler en conditions agricoles avec, en particulier, l'intervention de la phase sexuée (conservation de l'inoculum sous la forme d'oospores), comme il a été fait pour mesurer l'impact de la résistance race spécifique sur l'évolution des virulences [2]. En effet, la reproduction sexuée, qui est une phase obligatoire pour la survie hivernale du parasite, est un facteur de variabi-

Tableau 1. Test de Newman-Keuls – $p = 0,05$, sur les % VS⁽¹⁾ observés lors d'un test sur graines germées, interaction entre les facteurs « souches de *Plasmopara halstedii* »⁽²⁾ et « lignées de tournesol »⁽³⁾

Libellés	Moyennes	Groupes homogènes
R304 GB	75,03	A
R710 GB	73,48	A
R710 FU	27,48	B
R304 FU	23,22	C

(1) Plantules présentant une fonte de semis ou des sporulations sur feuilles

(2) R304 et R710

(3) Lignées pures « GB » et « FU »

Tableau 2. Test de Newman-Keuls – $p = 0,05$, sur les % VS⁽¹⁾ observés lors d'un test sur graines germées, interaction entre les facteurs « souches de *Plasmopara halstedii* »⁽²⁾ et « lignées de tournesol sources de l'inoculum »⁽³⁾

Libellés	Moyennes	Groupes homogènes
R304 inoGB	51,47	A
R710 inoGB	50,87	A
R710 inoFU	50,08	A
R304 inoFU	46,78	B

(1) Plantules présentant une fonte de semis ou des sporulations sur feuilles

(2) R304 et R710

(3) Inoculum récolté sur les lignées pures « GB » = inoGB et « FU » = inoFU

lité génétique qui doit intervenir dans l'évolution du pouvoir pathogène de la population parasitaire. C'est avec cette approche que nous pourrions apprécier avec plus de certitude à quelle vitesse *Plasmopara halstedii* peut s'adapter aux résistances non-race spécifiques développées par les sélectionneurs.

Remerciements. Nous souhaitons remercier le CETIOM et l'association PROMOSOL pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

1. Tourvieille De Labrouhe D, Serre F, Walser P, Roche S, Vear F. Quantitative resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) in sunflower (*Helianthus annuus*). *Euphytica* 2008 ; 164 : 433-44.
2. Tourvieille De Labrouhe D, Mestries M, Walser P. Quelles perspectives pour la lutte génétique vis-à-vis du mildiou du tournesol ? *OCL* 2005 ; 12 : 85-93.

3. Sakr N. Analyse du coût de virulence chez *Plasmopara halstedii*, l'agent du mildiou du tournesol. Thèse de Doctorat, Clermont-Ferrand, Université Blaise Pascal, 2008. DU 1835 : 135 p.
4. Tourvieille De Labrouhe D, Gulya Tj, Masirevic S, Penaud A, Rashid Ky, Viranyi F. New nomenclature of races of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). 15^e Conférence Internationale Tournesol, Toulouse (France), 12-15 juin 2000, Tome II : 61-65.
5. Roche S, Walser P, Serre F. Test de résistance du Tournesol au mildiou (*Plasmopara halstedii*) en conditions contrôlées. *Le Cahier des Techniques de l'Inra* 2005, n° spécial 2005 : 101-4.
6. Serre F, Walser P, Roche S, Vear F, Tourvieille De Labrouhe D. Research on a growth chamber test to measure quantitative resistance to sunflower downy mildew. 17th International Sunflower Conference, Cordoba (Spain), 8-12 June 2008, vol. 1 : 109-14.
7. Sakr N, Ducher M, Tourvieille J, Walser P, Vear F, Tourvieille De Labrouhe D. A Method to Measure Aggressiveness of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). *J Phytopathology* 2009 ; 157 : 133-6.
8. Mouzeyard S, Tourvieille De Labrouhe D, Vear F, et al. Effect of host-race combination on resistance of sunflower, *Helianthus annuus* L., to downy mildew *Plasmopara halstedii*. *J Phytopathol* 1994, 141 : 249-58.
9. As-Sadi F, Pouilly N, Boniface MC, et al. Towards the characterization of a Quantitative Resistance to Downy Mildew in cultivated Sunflower, *Helianthus annuus*. In : *Effectors in Plant-Microbe Interactions*, 22nd New Phytologist Symposium 2009, 13-16 septembre, Versailles (France).