

MULTIPLICATION DE L'INOCULUM DE *Plasmopara halstedii* À PARTIR DES FEUILLES MILDIOUSÉES NE PRÉSENTANT PAS DE FRUCTIFICATION

El Hassan Achbani^{1*}, Aziz Lamrhari², Mohamed Najeb Serrhini²,
Allal Douira³, Denis Tourvieille De Labrouhe⁴

¹ Laboratoire de Phytobactériologie, INRA, B.P. S/40 Méknes, Maroc

² Laboratoire de Phytopathologie, ENA, B.P. S/40 Méknes, Maroc

³ Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences Kénitra, Maroc

⁴ GREAT-INRA, Unité de Pathologie Végétale, 234 av. de Brézet,
63039 Clermont-Ferrand, cedex 02, France

Received: October 11, 1998

Accepted: December 05, 1999

RÉSUMÉ

Dans cette courte communication, nous proposons une technique simple qui permet d'isoler *Plasmopara halstedii*, parasite biotrophe du mildiou du tournesol, à partir des feuilles chlorosées soit sans fructification ou avec une fructification séchée.

Mots clés: *Plasmopara halstedii*, tournesol, technique, isolement

INTRODUCTION

Plasmopara halstedii, responsable du mildiou du tournesol, est un parasite biotrophe qui ne peut se développer sur un milieu artificiel. Les études effectuées sur ce champignon nécessitent obligatoirement un matériel frais au fur et à mesure des besoins. La seule méthode de multiplication de l'inoculum possible consiste à réaliser des co-cultures de l'hôte, *Helianthus annuus*, et du champignon (Tourvieille et al., 1988). La récupération des isolats de mildiou est réalisée en infectant des graines germées de tournesol avec les spores présentes à la face infédes feuilles d'une plante malade.

Cependant, en conditions de sécheresse, les fructifications peuvent être absentes ou entièrement desséchées. En absence de sporulation, les plantes mildiousées présentent une mosaïque chlorotique sur le limbe et un nanisme plus ou moins important, symptômes caractéristiques du mildiou. La longévité des zoospores *in campo* et en conditions sèches ne dépasse pas une semaine (Delanoe, 1972). Dans ces deux cas, l'isolement du champignon devient très délicat, les tenta-

* correspondant

tives de régénération de la sporulation en conditions humides aboutissent souvent à des échecs. Hors, le suivi de l'évolution du parasite qui se caractérise par l'existence de races physiologiques, nécessite de pouvoir isoler, pour analyse, le champignon afin de déterminer son pathotype.

Pour résoudre ce problème, nous proposons une technique de multiplication du champignon qui permet de récupérer un isolat de *P.halstedii* à partir de feuilles mildiouées ne présentant pas de fructification.

Au champ, les plantes atteintes de mildiou, mais ne présentant pas de sporulation, ont été prélevées et emballées dans des sacs en plastique. Au laboratoire, ces feuilles chlorosées (sans sporulation) sont détachées et coupées en fragments très fins et mélangées avec du sol (1v/50v) préalablement stérilisé. Seules les portions du limbe atteintes sont utilisées. Ensuite, 30 graines de la variété sensible Oro 9 sont semées en terrine, directement dans ce mélange ainsi préparé. Les terrines sont placées en chambre de croissance à $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et une intensité lumineuse de 12000 lux. 14 jours plus tard, les terrines sont couvertes par le plastique 14 jours après le semis, cette opération permet la sporulation du champignon. Six répétitions, décalées dans le temps, ont été faites en 1996 et en 1997. La lecture des résultats porte sur le pourcentage des plantes présentant des sporulations.

Trois types de témoin ont été réalisés et élevés dans les mêmes conditions:

- **Témoin 1:** Nous avons remplacé les feuilles mildiouées (chlorosées) par des feuilles saines, ce témoin nous permet de vérifier l'absence de contamination des substrats et de la salle de travail;

- **Témoin 2:** Des feuilles chlorosées (sans sporulation) ont été agitées dans de l'eau distillée stérile pour préparer une suspension dans laquelle sont trempées 30 graines prégermées d'Oro 9, ce témoin nous permet de vérifier l'absence de spores viables sur nos échantillons mildioués;

- **Témoin 3:** Des graines prégermées sont trempées dans une suspension sporangiale préparée à partir d'un inoculum frais avec une concentration de 50000 zoosporanges/ml, ce témoin nous permet de valider l'ensemble du protocole (conditions du test).

On constate (Tableau 1) que les plantes du témoin 1 ne montrent aucune infection ce qui permet d'affirmer que nous n'avons pas de contamination de notre substrat, de l'eau d'arrosage, ni de la chambre de culture. De même, les plantes, issues des graines trempées dans la suspension préparée des feuilles chlorosées (témoin 2), ne montrent pas de symptôme. Cette absence d'infection s'explique par le fait que les feuilles chlorosées utilisées dans notre expérience ne présentent pas de zoosporanges viables. En revanche, des taux d'infection très élevés, variant entre 89% à 98% en 1996 et entre 86% et 97% en 1997, ont été enregistrés sur le témoin

3. Ces résultats répétitifs nous indiquent que nos expériences se sont bien déroulées dans des conditions favorables à l'infection.

Tableau 1: Taux d'infection, par *P.halstedii*, des plantules de Oro 9 issues des graines semées dans un mélange de feuilles chlorosées (sans sporulation) avec le sol, sous des conditions contrôlées (température de $18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, photopériode de 16 heures de lumière) (feuilles saines (T1), trempage des graines prégermées dans une suspension préparée à partir des feuilles chlorosées (T2), ou d'inoculum frais (T3))

Répétition	Témoin 1		Témoin 2		Témoin 3		Méthode testée	
	1996	1997	1996	1997	1996	1997	1996	1997
1	0	0	0	0	91.45	96.67	65.42	76.92
2	0	0	0	0	94.00	86.67	59.12	55.56
3	0	0	0	0	89.50	89.66	39.58	46.43
4	0	0	0	0	92.50	86.21	70.12	60.87
5	0	0	0	0	95.58	90.00	54.58	35.71
6	0	0	0	0	97.64	96.67	49.76	50.00
Moyenne	0	0	0	0	93.45	90.86	56.43	54.25

Les taux d'infection observés chez les plantes infectées à partir des feuilles mildiouées sans sporulation sont relativement importants. Ces taux varient de 39% à 70% en 1996 et de 36% à 77% en 1997 avec des moyennes respectives de 56% et de 54% en 1996 et en 1997 (Tableau 1).

La synthèse de ces résultats permet de comprendre l'origine des spores responsable de ces infections. En effet, les conditions d'humidité qui règnent dans le sol (arrosage) et les conditions du milieu (température de $18^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, photopériode de 16 heures de lumière) induisent, favorablement, la fructification du champignon sur ces feuilles chlorosées. Ainsi, les zoosporanges produites libèrent des zoospores qui vont infecter les plantules avoisinantes. Le champignon colonise les tissus de la plante et progresse, ensuite, en haut vers les cotylédons et les feuilles. Sous une humidité saturante, le pathogène produit une fructification sur les organes aériens de la plante. Les sporulations obtenus doivent être multipliées sur un hôte sensible pour obtenir un inoculum suffisant à une utilisation future.

De ce fait, la reproduction des symptômes du mildiou, *P.halstedii*, à partir des feuilles mildiouées ne présentant pas la sporulation est possible avec cette méthode performante, qui est simple, facile et rapide. D'ailleurs, elle nous a permis en première année (1996) de multiplier les nouveaux isolats du champignon, car la récolte des échantillons a été faite après une période de sécheresse assez longue et malgré la présence de feutrage blanc sur la face inférieure de la feuille, nous n'avons pas pu, après d'innombrables tentatives, isoler et multiplier nos isolats.

En substance, l'obtention d'inoculum à partir des feuilles chlorosées sans sporulation est possible grâce à cette technique qui offre des résultats très satisfaisants, et en conséquence, nous la recommandons quant à l'isolement du champignon dans les conditions ou les méthodes classiques ne le permettent pas. L'importance de cette technique réside dans sa simplicité et sa rapidité. Un tel

acquis, permet à l'avenir d'isoler le mildiou, même en conditions de sécheresse, sur feuilles sans fructification ou avec des sporanges non viables (tuées par l'excès de chaleur comme c'était notre cas en 1996).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Delanoe, D., 1972. Biologie et épidémiologie du mildiou du tournesol (*Plasmopara helianthi* novot.). CETIOM, Inf. Tech., 29: 1-47.
- Tourvieuille, D., Champion, R., Vear, F., Mouzeyar, S., Said, J., 1988. Une nouvelle race de mildiou en France. Identification, Test et Contrôle. CETIOM, Inf. Tech., 104: 3-8.

MULTIPLICACIÓN DEL INOCULUM DEL HONGO *Plasmopara halstedii* A PARTIR DE LAS HOJAS MILDIUZADAS QUE NO PRESENTAN LA FRUCTIFICACIÓN

RESUMEN

En esta breve comunicación proponemos una simple técnica de aislar el parásito obligatorio de girasol, mildiu, *Plasmopara halstedii*, a partir de las hojas clorticas sin la esporulación o con las esporas ya desecadas.

MULTIPLICATION OF INOCULUM OF *Plasmopara halstedii* FROM INFECTED LEAVES WITHOUT FRUCTIFICATION

SUMMARY

In this short communication, we proposed an easy technique which allowed to isolate the fungi obligate parasite of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii*, from chlorotic affected leaves without sporulation or with dried sporulation.

Key words: *Plasmopara halstedii*, sunflower, technique, multiplication