

COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DU TOURNESOL AU *SCLEROTINIA* DU CAPITULE AVEC LES PRODUCTIONS NECTARIFÈRE ET POLLINIQUE

D. TOURVIEILLE⁽¹⁾, PHAM-DELEGUE
M.H.⁽²⁾, VEAR F.⁽¹⁾, MARILLEAU R.⁽²⁾, LOU-
BLIER Y.⁽²⁾, DOUAULT PH.⁽²⁾ et PHILIPPON
J.P.⁽¹⁾.

INTRODUCTION

Sclerotinia sclerotiorum est responsable de la pourriture blanche du capitule qui est, en France, la forme d'attaque la plus dommageable au tournesol.

Lamarque et al. (1985) puis SAYS-LESAGE et TOURVIEILLE (1988) ont montré que la contamination du capitule a lieu sur la face fleurie avec comme sites privilégiés, les organes reproducteurs : étamines et pistil, en période de production pollinique.

Le rôle bénéfique du pollen sur la germination (*in vitro*) des spores de *S. sclerotiorum* a été mis en évidence par TOURVIEILLE (1977).

Le comportement de pertophyte du *Sclerotinia* a été prouvé lors des infections du colza (BRUN et al., 1983 et PENAUD, 1984), mais également lors des infections des cotylédons du tournesol lors des attaques aux stades 1 à 3 paires de feuilles (TOURVIEILLE, non publié). Nous nous sommes donc intéressés aux 2 productions liées au stade de sensibilité et qui pourraient servir de source nutritive pour un relais saprophytique peut-être nécessaire à la pénétration des tissus sains : la production de nectar et de pollen.

Les analyses ont porté sur 36 génotypes d'un plan factoriel de croisement.

Les mesures effectuées sur ces génotypes ont été confrontées avec les résultats observés en infection naturelle et obtenus à un test de contamination par ascospores afin de préciser les liens pouvant exister entre teneurs en sucres du nectar et production pollinique, avec la plus ou moins grande sensibilité au *S. sclerotiorum*, chez les génotypes étudiés.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel végétal :

Nous avons travaillé avec les hybrides obtenus en croisant 6 lignées femelles avec 6 lignées mâles. Les 12 lignées ont été choisies pour être représentatives de la gamme de sensibilité vis-à-vis de *S. sclerotiorum* et de la diversité génétique du tournesol cultivé :

— 6 lignées femelles : 62, SD, GH, GU, F 10, B 11 A 3.

La stérilité mâle des 4 premières est cytoplasmique, celle des 2 dernières est génique.

— 6 lignées mâles : Ha 61, Rha 274, Rha 266, V 135, Pac 1, PRS 5.

Les hybrides 62 × Haa61, 62 × V 135, SD × Ha 61, SD × V 135, GH × Ha 61, GH × V 135, GU × Ha 61, GU × V 135, sont mâle-stériles, donc aucune analyse de production pollinique n'a pu être réalisée sur ce matériel.

B. Analyse des nectars

Nous avons procédé à une analyse qualitative de la composition glucidique des nectars par une méthode de chromatographie en phase gazeuse.

— Prélèvement des échantillons :

Les prélèvements ont été réalisés sur l'ensemble du matériel à raison d'une mesure par génotype. Les échantillons sont récoltés à l'aide de micropipettes de verre (diamètre interne : 1 mm; contenance 5 µl.) dans les fleurons au stade étamine de capitules au stade F₂ (mi-floraison).

Les capitules sont ensachés 24 heures avant le prélèvement afin d'homogénéiser les conditions d'évaporation et d'éviter les visites d'insectes. Le nectar étant ici collecté uniquement en vue d'études qualitatives, tous les prélèvements sont effectués jusqu'à concurrence de 10 µl/génotype.

⁽¹⁾ Laboratoires du tournesol, I.N.R.A., 63039 Clermont-Ferrand (France)

⁽²⁾ Laboratoire de Neurobiologie comparée des invertébrés, I.N.R.A., C.N.R.S., 91440 Bures sur Yvette (France)

Les échantillons sont ensuite conservés au froid (-25°C) pour les analyses chimiques.

— Méthode d'analyses :

Les analyses visent à déterminer la nature et la concentration des sucres présents dans les nectars récoltés. Les quantités présentes étant souvent très faibles (de l'ordre du microlitre) il fallait une méthode sensible et précise. La chromatographie en phase gazeuse est une technique rapide qui permet de répondre à ces critères.

La méthode utilisée a été mise au point pour l'étude du nectar de tournesol par Fonta et

al. (1985) et également appliquée aux nectars de colza (Mesquida et al., 1988). Elle est adaptée d'une technique préconisée par Brohst et Lott (1966) et employée par Bosi (1973) pour l'analyse de nectars partiellement déshydratés, qui permet uniquement le calcul des pourcentages relatifs des sucres dans la matière sèche ; elle a été complétée d'après Black et Bagley (1978) qui introduisent un étalon interne afin de déterminer le pourcentage réel de chaque sucre présent dans le nectar. En référence au travail de Bolten et al. (1979) qui préconisent

Tableau 1

Comportement vis-à-vis du *Sclerotinia*, production pollinique et composition des nectars de 36 hybrides de tournesol

Hybrides	L'	I	P	F	G	S	MS
B 11 A 3 Ha 61	1,12	0,94	408 626	21,0	20,4	0,6	42
B 11 A 3 Rha 274	1,01	0,49	420 872	27,0	25,0	00,0	52
B 11 A 3 Rha 266	0,92	2,54	375 850	24,3	22,7	00,0	47
B 11 A 3 V 135	0,80		303 790	34,1	33,9	00,0	68
B 11 A 3 PAC 1	1,08	0,31	384 663	18,8	17,2	00,0	36
B 11 A 3 PRS 5	0,96	1,38	403 911	27,1	24,9	00,0	52
62 Ha 61	0,99	0,88		29,9	29,5	2,6	62
62 Rha 274	0,97	1,05	318 034	35,2	34,8	00,0	70
62 Rha 266	0,83	2,01	342 980	19,8	19,2	00,0	39
62 V 135	0,81	2,48		23,1	20,9	00,0	44
62 PAC 1	0,85	1,45	390 837	20,6	19,4	00,0	40
62 PRS 5	0,83	0,82	384 638	24,1	22,9	00,0	47
SD Ha 61	1,17	0,72		23,4	23,3	0,3	47
SD Rha 274	1,05	1,08	292 745	24,4	23,6	00,0	48
SD Rha 266	1,00	1,55	347 766				
SD V 135	1,02			20,6	21,4	00,0	42
SD PAC 1	1,30	0,71	331 526	27,7	28,2	0,1	56
SD PRS 5	1,17	1,09	374 617	32,8	28,2	00,0	61
GH Ha 61	1,16	1,32		15,8	15,1	0,1	31
GH Rha 274	0,98		326 920	17,5	17,5	00,0	35
GH Rha 266	0,83	2,33	378 717	24,4	23,6	00,0	48
GH V 135	0,84	5,81		36,4	30,6	00,0	67
GH PAC 1	0,93	1,52	403 956	25,6	24,4	00,0	50
GH PRS 5	0,83	3,63		30,8	27,2	00,0	58
GU Ha 61	0,91	2,24		24,6	22,4	00,0	47
GU Rha 274	0,83	2,46	281 938	19,7	19,3	00,0	39
GU Rha 266	1,02	2,58	351 441	21,9	19,1	00,0	41
GU V 135	0,77	4,07		23,5	24,5	00,0	48
GU PAC 1	0,96	0,47	377 695	25,9	24,1	00,0	50
GU PRS 5	0,89	1,79		32,8	29,2	00,0	62
F 10 Ha 61	0,97	1,33	369 576	32,1	29,9	00,0	62
F 10 Rha 274	0,92	2,21	297 919	17,3	17,7	00,0	35
F 10 Rha 266			297 485	35,8	32,2	00,0	68
F 10 V 135	0,73	2,70	343 210	13,0	13,0	00,0	26
F 10 PAC 1	0,86	0,35	322 822	19,5	19,5	00,0	39
F 10 PRS 5	0,88	1,58		29,0	28,0	00,0	57

L = durée de latence au test „ascospores“/durée de latence de l'hybride témoin (2 rep. de 30 plantes)

I = pourcentage de plantes malades en infection naturelle/pourcentage de plantes malades chez l'hybride témoin (4 rep. de 100 plantes).

P = nombre de grains de pollen dans 10 fleurons (5 rep.)

G = concentration des nectars en glucose (mg/100 µl).

F = concentration des nectars en fructose (mg/100 µl).

S = concentration des nectars en saccharose (mg/100 µl).

MS = concentration des nectars en matière sèche (mg/100 µl).

l'adoption d'une expression standard des teneurs en sucres des nectars, les résultats sont exprimés en concentration de sucres dans le nectar (mg/100 µl.) après conversion d'après les abaques présentés dans la 56-ième édition du Handbook of Chemistry and Physics (1975—1976 — Tableaux 21 D — 22 D, pages D 229 — D 230 — D 261).

C. Quantification des pollens

Les productions polliniques ont été quantifiées au moyen d'un compteur de particules „Coulter Counter“, après préparation des grains de pollen, selon la méthode mise au point pour les pollens de tournesol par Loublier et al. (1986).

— Prélèvement des échantillons :

Dix fleurons par capitule sur 5 capitules au stade F_2 (mi-floraison) par génotype sont prélevés avant déhiscence des anthères.

— Méthode de quantification :

Les grains de pollen subissent une acétolyse selon la méthode de Erdman, (1960) afin de vider le grain de son cytoplasme et de procéder au nettoyage de l'exine et de la débarrasser des particules lipidiques qui l'entourent. Les grains nettoyés sont rassemblés dans un culot de centrifugation et sont soumis à des ultrasons afin d'assurer leur dispersion dans une solution d'alcool. Les grains de pollen sont ensuite mis en solution dans un électrolyte et soumis au comptage, chaque estimation correspondant à la moyenne de 4 mesures successives.

D. Infection semi-naturelle par *S. sclerotiorum*

La méthode décrite par Vear et Tourville (1987) a été utilisée pour l'observation des attaques sur capitule. Le dispositif est un essai bloc de Fisher à 4 répétition et 4 lignes de 25 plantes par répétition.

Les résultats sont exprimés en indice I.

$I = \text{p. cent de plantes montrant des symptômes} / \text{p. cent de plantes montrant des symptômes sur la variété témoin de référence (même date de floraison)}$.

E. Test „ascospores“

Cette méthode a été décrite par Tourville et Vear (1984) et Vear et Tourville (1985). Elle consiste à pulvériser 5 ml d'une suspension contenant 5 ascospores/mm³ sur la face fleurie des capitules en début florai-

son. Les capitules sont ensachés dans des sacs de papier sulfurisé immédiatement après l'inoculation. Une variété témoins est, à chaque date d'infection, inoculée en même temps afin de pouvoir comparer des génotypes de différente précocité.

Le dispositif comporte 2 répétitions de 30 à 40 plantes. Les résultats sont exprimés en indice de latence L.

$L = \text{Durée (en jours entre l'infection et l'apparition des premiers symptômes sur la face stérile)} / \text{Durée (en jours entre l'infection et l'apparition des symptômes chez l'hybride témoin de référence (inoculé le même jour)}$.

RESULTATS

L'ensemble des données observées est regroupé dans le *Tableau no. 1*.

A. Production nectarifère

La concentration des nectars en sucres varie de façon considérable : de 26 p. cent pour F 10 × V 135 à 70 p. cent pour 62 × Rha 274. Les nectars renferment essentiellement deux sucres : le fructose et le glucose en quantité à peu près équivalente (en moyenne 25,3 mg/100 µl pour le fructose et 23,8 mg/100 µl pour le glucose).

Le saccharose est présent chez seulement 5 génotypes : B 11 A 3 × Ha 61, 62 × Ha 61, SD × PAC 1 et GH × Ha 61, et en quantité très faible : inférieure à mg/100 µl.

B. Production pollinique

Comme pour des nectars, la production pollinique est très variable selon les génotypes : elle varie de 28 194 grains de pollen par fleuron pour l'hybride GU × Rha 274 à 42 087 grains de pollen pour B 11 A 3 × Rha 274.

C. Comportement vis-à-vis du *Sclerotinia*

Le comportement en infection naturelle montre la grande variabilité de réaction de nos génotypes : $I = 0,31$ pour B 11 A 3 × PAC 1 à $I = 5,81$ pour GH × V 135 ce qui correspond à des taux d'attaque de 5 et 92 p. cent. Ce comportement se retrouve en infection artificielle.

D. Production pollinique et sensibilité au *Sclerotinia*

Les coefficients de corrélation obtenus entre production pollinique et comportement vis-à-vis du parasite (cf. *Tableau 2*) montrent que l'on ne

Tableau 2

Coefficients de corrélation entre sensibilité au *Sclerotinia* et les productions pollinique et nectarifère, chez la tournesol

Comportement vis-à-vis du <i>Sclerotinia</i> .	Nombre de grains de pollen/fleuron	Concentration des nectars en sucres			
		Fructose	Glucose	Saccharose	M. sèche
Test „ascospores“	+0,160 (24 couples)	+0,019	+0,033 (34 couples)	+0,172	+0,036
Infection naturelle	-0,281 (22 couples)	+0,144	+0,054 (31 couples)	-0,188	+0,094

peut pas expliquer le comportement d'un génotype vis-à-vis de ce parasite par la quantité de pollen produit. Cependant le coefficient obtenu entre production pollinique et comportement en infection naturelle $R = -0,269$ laisse supposer qu'un facteur, non pris en compte jusqu'à présent, pourrait intervenir : la vitesse de fécondation, dont la production pollinique n'est qu'un des éléments, l'hypothèse étant que plus la fécondation est rapide, moins le génotype serait sensible au *Sclerotinia* sur capitule.

E. Nectars et sensibilité vis-à-vis du *Sclerotinia*

Les résultats obtenus (cf : Tableau 2) montrent bien l'absence de lien entre la qualité du nectar en composés glucidique et la sensibilité au *Sclerotinia*. Des études parallèles réalisées sur les données moyennes de 5 répétitions de 9 hybrides, ont montré l'absence de corrélation entre quantité de nectar par fleuron et sensibilité au pathogène, ni entre valeur énergétique de ce nectar et sensibilité (Vear et al., 1988).

Une autre approche serait utile : rechercher si des différences de qualité des nectars en acides aminés pourraient expliquer les différences de sensibilité observées en culture.

CONCLUSION

Notre étude, sans remettre en cause le rôle bénéfique du pollen et du nectar dans la germination des spores de *Sclerotinia*, montre que le dosage des productions nectarifères et polliniques ne peut pas être utilisé par les généticiens dans les programmes de sélection pour la résistance au *Sclerotinia*.

Il semble certain que la quantité de nutriments présents dans les nectars et les pollens, des génotypes les plus pauvres, est amplement suffisant au parasite.

Cependant, une approche plus fine de la „vitesse de fécondation“ nous permettrait peut-être de mieux comprendre la première phase du processus infectieux et de répondre à la question encore sans réponse : l'infection du parenchyme passe-t-elle obligatoirement par la destruction d'un ovule non fécondé ?

RÉFÉRENCES

- Black L.T., and Bagley E.B., 1978. *Determination of oligosaccharides in soybeans by high pressure liquid chromatography using an internal standard*. J. Ann. Oil Chemists Soc., 55, 228—232.
- Bolten A.B., Feinsinger P., Baker H.G., and Baker I., 1979. *On the calculation of sugar concentration in flower nectar*. Oecologia, 41, 301—309.
- Bosi G., 1973. *Méthode rapide pour la détermination par chromatographie en phase gazeuse des glucides des nectars*. Apidologie, 4 (1), 57—64.
- Brohst K.M. and Lott C.E., 1966. *Determination of some components in corn syrup by gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives*. Cereal Chemistry, 43, 35—43.
- Brun H., Pierre J.G. et Renard M., 1983. *Techniques d'inoculation du colza par Sclerotinia sclerotiorum*. 6^{ème} Congrès International sur le Colza, Paris, 17—19 Mai 1983, Tome II, P. 1 044.

- C. R. C., 1975. *Handbook of Chemistry and Physics*. 56th, ed. West Palm Beach, Florida, ASA, CRC Press Inc.
- Erdtman G., 1960. *The acetolysis method: A revised description*. In: Swesk. Bot. Tidsky, 54 (4), 561—564.
- Fonta C., Phan-Delegue M.H., Marilleau R. et Masson C., 1985. *Rôle des nectars de tournesol dans le comportement des insectes pollinisateurs et analyse qualitative et quantitative des éléments glucidiques de ces sécrétions*. Oecol. Applic., 6 (2), 175—186.
- Lamarque C., Leconte M., Berrier J. et Jaunet A.M., 1985. *Morphologie externe des différentes pièces florales du capitule de tournesol et conséquences sur les potentialités d'attaques par le Sclerotinia*. Inf. Techn. CETIOM, 92 (3), 4—35.
- Loublier Y., Douault P. et Pham-Delegue M.H., 1986. *Méthodes de comptage automatique des grains de pollens : étude de la production pollinique chez le tournesol (Helianthus annuus L., Compositae)*. Apidologie, 17 (3), 245—256.
- Mesquida J., Marilleau R., Pham-Delegue M.H., and Renard M., 1988. *A study of rapeseed (Brassica napus L. var. oleifera Metzger) flower nectar secretions*. Apidologie, (sous presse).
- Penaud A., 1984. *Les pétales et la contamination du colza par Sclerotinia sclerotiorum*. Inf. Tech. CETIOM, 89 (4) 20—28.
- Says-Lesage V. et Tourvieille D., 1987. *Recherche de sites de pollution et d'injection des fleurs de tournesol in situ par des spores de Sclerotinia sclerotiorum*. Inf. Techn. CETIOM, 102 (1) (sous-presses).
- Tourvieille de Labrouche D., 1977. *Contribution à l'étude de quelques points de la biologie du Sclerotinia sclerotiorum (Lib) de Bary et mise au point d'une technique d'inoculation sur le tournesol (Helianthus annuus L.)*. DEA, E.N.S.A. de RENNES, 21 Septembre 1977, 69 p.
- Tourvieille D. et Vear F., 1984. *La sélection du tournesol pour une meilleure résistance au Sclerotinia sclerotiorum*. Inf. Techn. CETIOM, 88 (3), 3—23.
- Vear F. et Tourvieille D., 1987. *Le jugement des hybrides de tournesol vis-à-vis de l'infection naturelle des capitules par Sclerotinia sclerotiorum*. Inf. Techn. CETIOM, 99 (3), 9—14.
- Vear F., Phan-Delegue M.H., Marilleau R., Tourvieille de Labrouche D., Le Metayer M., Loublier Y., Douault Ph. and Philippon J.P., 1988. *Genetical studies of nectar and pollen productions in sunflower (Helianthus annuus L.)*. Theoretical and Applied Genetics, (proposé à).

RELATIONSHIP BETWEEN SUSCEPTIBILITY TO CAPITULUM ATTACK BY *SCLEROTINIA SCLEROTIUM* AND NECTAR AND POLLEN PRODUCTION IN SUNFLOWER

Summary

The analyses on nectar and pollen production of 36 sunflower hybrids were compared with observations on semi-natural head attack of *Sclerotinia sclerotiorum* and with genotype response to artificial infections with *Sclerotinia* ascospores. No significant correlation between nectar and pollen production or their composition and susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* was found.

Although nectar and/or pollen may favorize the parasite installation on head floral surface, the considerable differences among genotypes as regards nectar and pollen do not explain the susceptibility differences. That is why such crite-

ria should not be used in sunflower breeding programmes for resistance to *Sclerotinia* head attack.

RELACION ENTRE LA SUSCEPTIBILIDAD DE ATAQUE A CAPITULO DE *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* Y PRODUCCION DE POLEN Y NECTAR EN GIRASOL.

Resumen

El análisis de la producción de néctar y polen en 36 híbri-

dos fue comparado con observaciones de ataque seminatural a capítulo por *Sclerotinia sclerotiorum* y con la respuesta de estos genotipos a las infecciones artificiales con ascosporas de *Sclerotinia*. No existió una correlación significativa entre la producción o composición del polen y néctar y la susceptibilidad a *S. sclerotiorum*. Aunque el néctar y/o polen pueden favorecer la instalación del parásito en la superficie floral del capítulo (en las flores) la diferencia considerable en polen y néctar entre genotipos no explica sus diferencias en susceptibilidad. Estos criterios por lo tanto no pueden ser considerados en programas de mejora para resistencia a ataque de capítulo por *Sclerotinia*.