

## Test froid sur pois en chambre climatisée

### Optimisation du test afin de mieux différencier les géotypes selon leur résistance au gel

*Hélène Sellier<sup>1</sup>, Benoît Decaux<sup>1</sup>*

**Résumé :** *L'unité de recherche de Génétique et d'Amélioration des plantes de l'Inra de Mons a mis au point un test froid en chambre climatisée pour évaluer la résistance au gel de différents géotypes de pois (*Pisum sativum* L.) tout en s'affranchissant des contraintes liées au milieu extérieur. L'expérimentation se décompose en quatre phases : la « nursery », l'endurcissement, le gel et le réchauffement. La résistance au gel est évaluée grâce à une notation des dégâts de gel sur l'appareil aérien à la fin du test. Afin de mieux différencier les géotypes au niveau de leur résistance au gel, nous avons modifié la cinétique de notre test en allongeant la période d'endurcissement. Avec l'allongement de la période d'endurcissement on obtient une meilleure acclimatation au froid des géotypes les plus résistants au gel. Ainsi ce nouveau test permet de mieux différencier les géotypes sensibles des géotypes résistants au gel.*

**Mots clés :** acclimatation au froid, fuite d'électrolytes, note de gel, *Pisum sativum* L., test froid

### Introduction

Les graines de pois sont une bonne source de protéines pour l'alimentation animale et elles constituent une alternative au soja comme aliment riche en protéine. La plupart des variétés de pois sont semées au printemps, elles subissent donc à la fin du cycle de développement des stress hydriques et de fortes températures qui ont pour conséquence des rendements variables. Des variétés semées en automne, grâce à un cycle de développement plus long et à un évitement des périodes de stress de fin de cycle, donnent un rendement plus élevé et plus stable (Lejeune-Hénaut *et al.*, 1999). Cependant, dans les zones tempérées, il faut que ces variétés soient endurcies afin de passer l'hiver sans dommages. Pour cela il faut que les plantes mettent en place des mécanismes de tolérance au gel durant une période de températures froides mais non gélives : c'est l'acclimatation au froid (Levitt, 1980). Afin de tester de manière plus homogène et plus reproductible qu'en conditions naturelles la tolérance au gel de différents géotypes de pois, nous avons mis au point un test froid en chambre climatisée (Bourion *et al.*, 2003). A la fin de la cinétique de ce test, nous réalisons une note visuelle des dégâts de gel sur l'appareil aérien qui montre le niveau de résistance au gel. Nous avons constaté que ces notes de dégâts de gel n'étaient pas toujours très bien corrélées à celles obtenues au champ : c'est pourquoi nous avons modifié la cinétique de notre test en allongeant la phase d'endurcissement afin de mieux différencier les géotypes résistants des géotypes sensibles au gel.

---

<sup>1</sup> UMR 1281 INRA/USTL Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés - F-80200 Estrées-Mons  
☎ 03 22 85 34 06 ✉ [sellier@mons.inra.fr](mailto:sellier@mons.inra.fr)

## 1. Matériel végétal

Champagne (**figure 1**) est un pois fourrager présentant un bon niveau d'endurcissement.

Térèse (**figure 2**) est un pois de printemps sensible au gel.

Six lignées recombinantes (LR 60, LR 92, LR 96, LR98, LR 120 et LR 192) ont été sélectionnées parmi les 164 lignées recombinantes F8 qui composent la Pop2. Cette population a été obtenue par sélection par filiation mono-graine à partir du croisement Champagne x Térèse (Loridon *et al*, 2005). Ces six lignées recombinantes ont été choisies à partir des notes de dégâts de gel obtenues au champ avec 11 conditions lieux x dates : elles permettent de décrire l'ensemble de la gamme de résistance au gel observée dans la Pop2 et ont des notes de dégâts de gel très stables dans les 11 conditions étudiées. (E. Hanocq, communication personnelle).



**Figure 1: CHAMPAGNE**

Lignée fourragère

Feuille

Entre-nœuds longs

Bonne résistance au gel



**Figure 2: TERESE**

Pois protéagineux de printemps

Afila

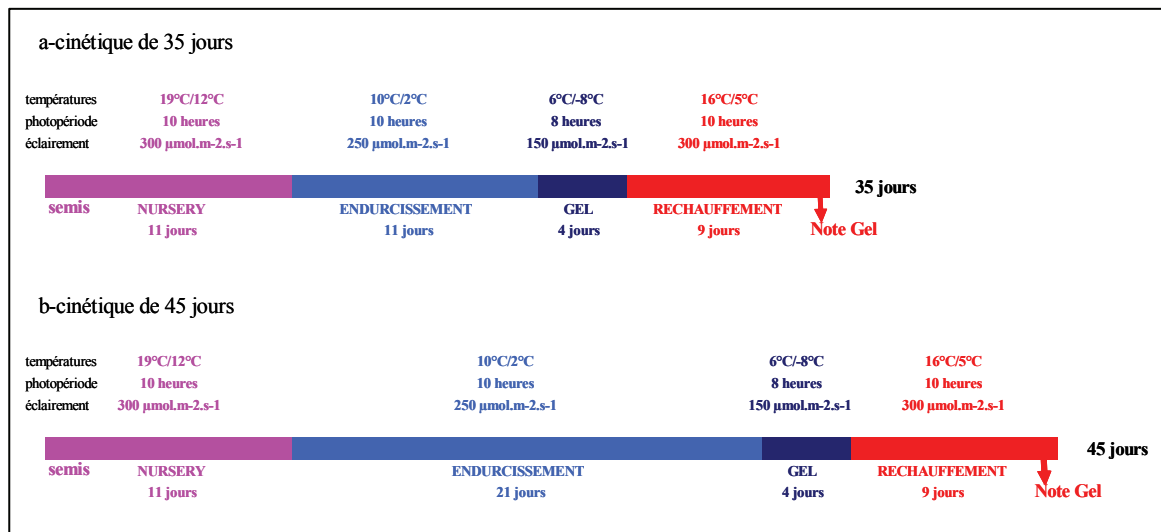
Entre-nœuds courts

Sensible au gel

## 2. Cinétiques du test froid

Deux cinétiques de test froid ont été utilisées. Ces cinétiques comportent quatre phases : une période de nursery, une période d'endurcissement, une période de gel et une période de réchauffement.

La cinétique de 35 jours (**figure 3a**) a une phase de nursery de 11 jours, une phase d'endurcissement de 11 jours, une phase de gel de 4 jours et une phase de réchauffement de 9 jours. Cette cinétique a été utilisée pour les tests froid depuis sa mise au point (Bourion *et al*, 2003) jusqu'à octobre 2007. La cinétique de 45 jours (**figure 3b**) est identique à la cinétique de 35 jours à l'exception de la phase d'endurcissement qui est prolongée de 10 jours soit 21 jours au total.



**Figure 3 :** *Cinétiques utilisées pour les tests, une cinétique a) de 35 jours et b) de 45 jours.*

### 3. Mise en œuvre des tests

#### 3.1 Traitement des semences

Les semences sont traitées avec un fongicide, le Walkil XL à 3 % pour de prévenir l'apparition de maladies comme l'antracnose ou la bactériose.

#### 3.2 Mise en place de la culture

La veille du semis, les terrines (support carré en styrodur creusé de 10 x 10 alvéoles) sont placées en chambre climatisée (Weiss/Nema) sur 4 tabliers en aluminium recouverts d'un film noir microporeux, chaque tablier peut recevoir 2 terrines, soit 800 plantes au total dans la chambre. La cellule est mise en route de manière à ce que les mottes soient à température ambiante pour le semis.

Avant l'entrée des terrines :

- les terrines sont traitées à l'Hortyseptil 3 % après avoir été nettoyées au laveur haute pression ;
- des pastilles Jiffy 7, pastilles de tourbe comprimées de 38 mm de diamètre sont mises à tremper dans des caissettes remplies d'eau jusqu'à saturation. Ces mottes sont composées de tourbe, de chaux et de fertilisant azoté. D'abord compactées, elles se dilatent en présence d'eau, provoquant une bonne aération et un bon drainage pour la culture. Chaque motte est entourée d'un filet biodégradable qui facilite l'extraction de la plante de l'alvéole lors des différents prélèvements ;
- de la perlite (roche volcanique) est tamisée afin d'éliminer toute la poussière de roche et elle est déposée au fond de chaque alvéole (une dose représentant 50 % de la contenance d'une alvéole), pour une meilleure restitution de l'eau ainsi qu'un meilleur drainage de l'eau

(**figure 4**). Puis les mottes sont déposées dans les terrines au-dessus de la perlite. Le fait de mettre les mottes dans les terrines en styrodur isole du gel les racines des plantules de pois.

- la chambre climatisée est préalablement nettoyée avec un dégraissant désinfectant qui empêche l'apparition de champignons, de bactéries et d'algues.

### 3.3 Semis

Un trou de 2 cm de profondeur est percé dans la motte où l'on dépose une graine. Cette semence est enfoncée et la motte est pressée afin de recouvrir la semence.

### 3.4 Conditions de culture

La phase expérimentale se déroule dans une chambre climatisée (**figure 5**) où plusieurs sondes mesurent les paramètres climatiques :

- une sonde dans la paroi de la chambre mesure la température à l'intérieur de l'enceinte ;
- une sonde ventilée, à l'abri des néons, mesure la température de l'air ambiant ;
- une sonde hygrométrie permet de connaître l'hygrométrie ambiante.

L'ensemble de ces mesures est automatiquement enregistré et sauvegardé sur ordinateur à l'aide d'une centrale d'acquisition Campbell de type CR 10X.

La chambre climatisée est équipée de différents tubes fluorescents :

- 20 tubes Fluora de 36 Watts (Osram),
- 20 tubes Biolux de 36 watts (Osram),
- 40 tubes PL-L de 55 watts (Philips).



**Figure 4** : *préparation des terrines, perlite*



**Figure 5** : *la chambre climatisée*

Les plantes sont arrosées manuellement avec de l'eau claire tous les 2 jours. Il n'y a pas d'arrosage pendant la phase de gel, les plantes sont de nouveau arrosées à partir du troisième jour de réchauffement.

## 4. Notations et mesures

### 4.1 Notations des dégâts de gel

A la fin de la phase de réchauffement, la résistance au gel est évaluée visuellement par une note de dégâts de gel sur l'appareil aérien de 40 plantes par génotype (4 répétitions de 10 plantes). Les notes vont de 0 pour aucun dégât à 5 pour une plante morte (Lejeune-Hénaut *et al.*, 2008) (figure 6).



0 = aucun dégât

2 = plages de nécroses sur les limbes

4 = plante entièrement brûlée sauf au niveau du bas de la tige

1 = bords des limbes brûlés

3 = limbes brûlés et début de nécrose sur la tige

5 = plante entièrement brûlée

**Figure 6 :** Echelle de notation des dégâts de gel.

### 4.2 Mesures de fuite d'électrolytes

Le pourcentage de fuite d'électrolytes est mesuré pour évaluer le degré de dommages causés par le gel dans les feuilles de pois. Plus cette valeur est élevée, plus les membranes des cellules sont endommagées (Dexter *et al.*, 1932).

A la fin de la phase de réchauffement, pour chaque génotype, les stipules (organe de la feuille commun aux types feuillu et afile) du troisième étage de 30 plantes (3 répétitions de 10 plantes) sont prélevés et ils sont plongés dans un tube contenant 15 ml d'eau ultrapure.

Grâce à un conductimètre (Radiometer Analytica) qui fournit une mesure de la capacité d'une solution à conduire le courant électrique, une mesure de conductivité C1 est réalisée après 24 heures à température ambiante. Cette valeur C1 correspond à la conductivité due aux ions qui diffusent naturellement à travers la membrane. Cette valeur C1 est d'autant plus élevée que la membrane est endommagée.

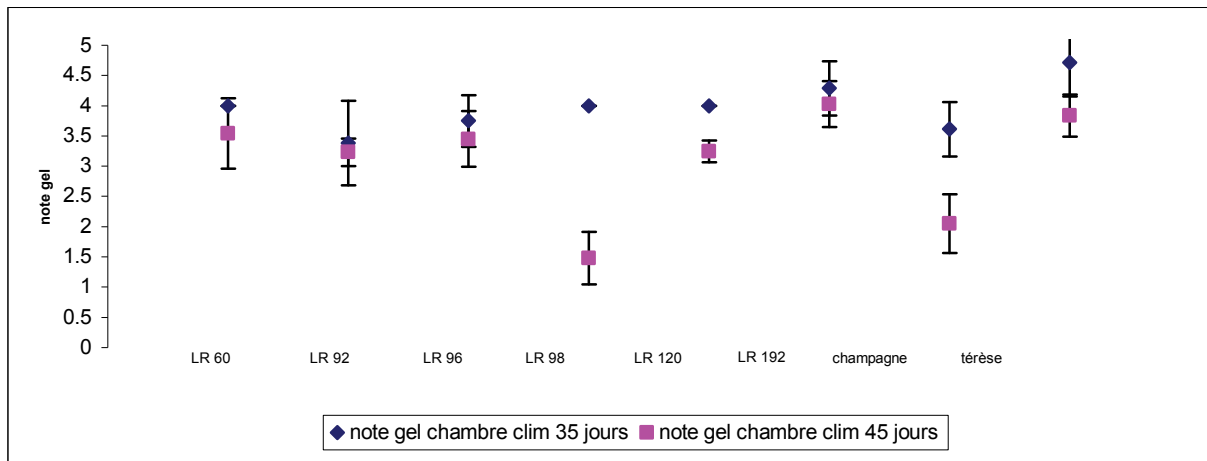
Les tubes sont ensuite congelés à - 80°C. Enfin, les tubes sont décongelés et lorsqu'ils sont à température ambiante, une seconde mesure C2 est réalisée. La valeur C2 représente la conductivité du contenu total en ions des tissus. En effet l'action du gel/dégel rompt les tissus végétaux, ce qui libère l'ensemble des ions contenus dans les cellules.

Le rapport des deux mesures C1/C2 permet le calcul de fuite d'électrolytes (Campos *et al.*, 2003).

## 5. Résultats

### 5.1. Notations des dégâts de gel

Lorsque les plantes sont soumises au test froid de 35 jours (soit une période d'endurcissement de 11 jours), la note de dégâts de gel de Champagne, 3,61 est meilleure que celle de Tèrese, 4,71 (**figure 7**). Mais l'écart entre les deux génotypes de référence est assez faible. De plus les dégâts de gel observés sur Champagne sont assez grands. Lorsque ces mêmes génotypes subissent le test froid de 45 jours, Tèrese présente un peu moins de dégâts de gel avec une note de 3,84 par rapport au test de 35 jours (note 4,71). Champagne présente beaucoup moins de dégâts de gel (note 2,05) que lors du test de 35 jours (note 3,61), ce qui indique que les plantes de Champagne résistent mieux au gel avec une période d'endurcissement allongée.



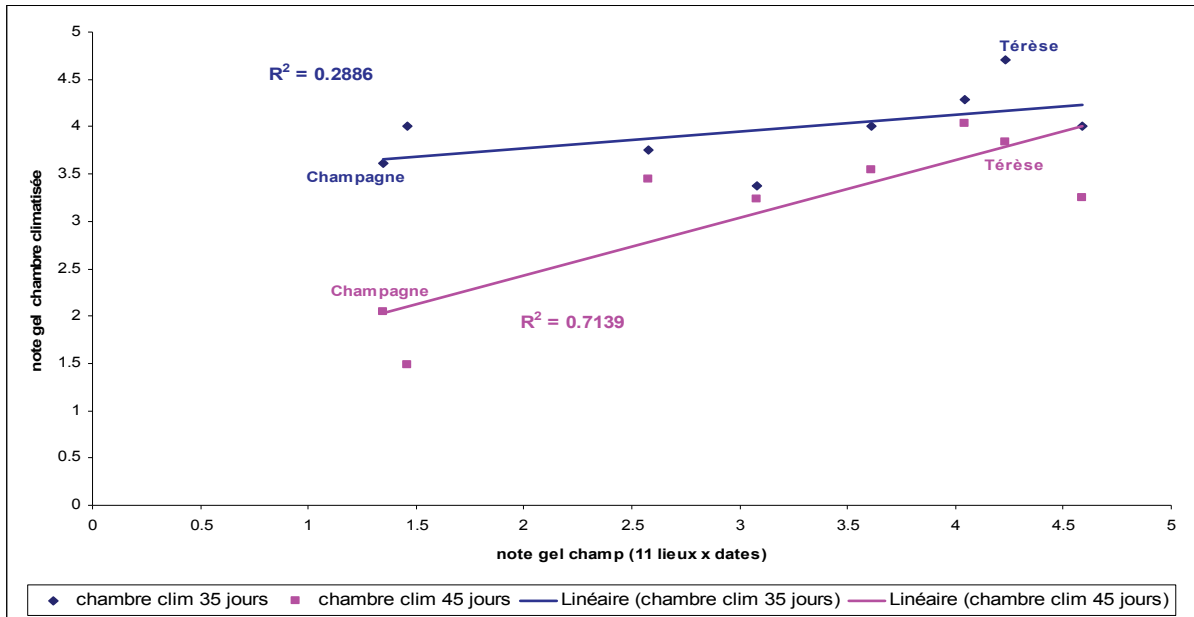
**Figure 7 :** Notes de dégâts de gel observées avec le test froid en chambre climatisée de 35 jours soit 11 jours d'endurcissement (◆) et de 45 jours soit 21 jours d'endurcissement (■).

Nous observons que l'écart entre Champagne et Tèrese est plus grand avec le test de 45 jours (écart de 1,79) qu'avec le test de 35 jours (écart de 1,1).

Les lignées recombinantes étudiées ont des notes de dégâts de gel comprises entre 3,38 et 4,29 pour le test de 35 jours (figure 7). Pour le test de 45 jours, ces notes varient de 1,48 à 4,03. Nous observons donc des niveaux de résistance au gel plus étendus lorsque les plantes sont endurcies durant 21 jours. La lignée recombinante 98 a la meilleure note pour la résistance au gel, 1,48, lors du test de 45 jours. Elle présente un niveau de résistance au gel beaucoup plus fort que lors de test de 35 jours (note 4). La lignée recombinante 192, la moins résistante au gel des lignées recombinantes lors du test de 35 jours (note 4,29), reste classée de la même façon lors du test de 45 jours mais son niveau de sensibilité au gel diminue légèrement (note 4,03).

La **figure 8** illustre les résultats de corrélation entre les notes de résistance au gel obtenues au champ (moyenne des notes obtenues sur 11 lieux x dates) et les notes de résistance au gel obtenues avec les deux tests en chambre climatisée.

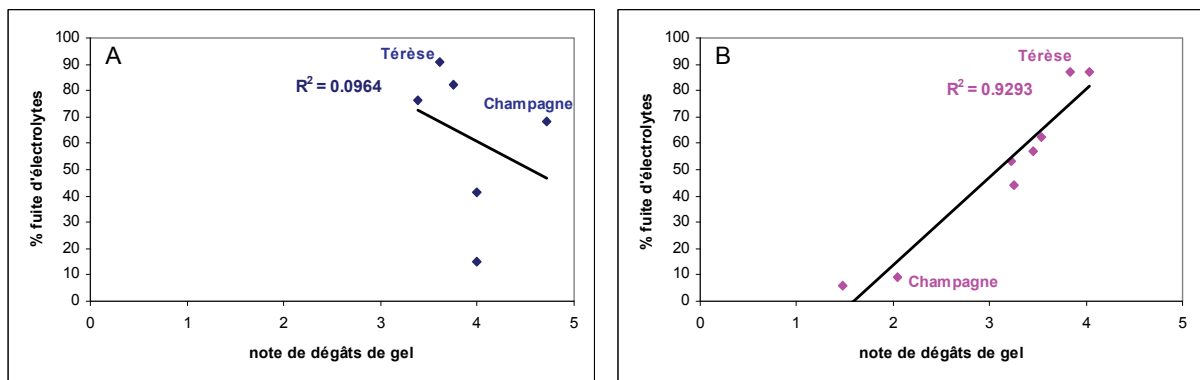
Nous observons que les notes obtenues au champ sont peu corrélées aux notes de dégâts de gel observées en chambre climatisée avec le test de 35 jours ( $R^2 = 0,2886$ ). La corrélation est meilleure entre les notes de dégâts de gel au champ et les notes obtenues en chambre climatisée avec le test froid de 45 jours ( $R^2 = 0,7139$ ).



**Figure 8 :** Corrélations entre les notes de dégâts de gel obtenues au champ et les notes de dégâts de gel obtenues en chambre climatisée avec le test de 35 jours soit 11 jours d'endurcissement (♦ —) et avec le test de 45 jours soit 21 jours d'endurcissement (■ —).

## 5.2. Mesures de fuite d'électrolytes

Pour Térèse, nous observons les mêmes fuites d'électrolytes pour les tests de 35 et 45 jours, respectivement 90,84 % et 87,11 %. En revanche, Champagne présente des fuites d'électrolytes dans le test de 45 jours beaucoup plus faible (9,02 %) que dans le test de 35 jours (68,33 %).



**Figure 9 :** corrélation entre le pourcentage de fuite d'ions et les notes de dégâts de gel  
 A) pour le test froid en chambre climatisée de 35 jours  
 B) pour le test froid en chambre climatisée de 45 jours.

La **figure 9** représente la corrélation entre le pourcentage de fuites d'électrolytes et les notes de dégâts de gel pour le test en chambre climatisée de 35 jours, c'est-à-dire avec 11 jours d'endurcissement (**figure 9A**) et la corrélation entre le pourcentage de fuites d'électrolytes et les notes de dégâts de gel relevées pour le test de 45 jours soit 21 jours d'endurcissement (**figure 9B**). Nous constatons qu'il n'y a pas de corrélation lorsque les plantes sont soumises

au test de 35 jours ( $R^2 = 0,0964$ ). Pour le test de froid de 45 jours c'est-à-dire lorsqu'il y a 21 jours d'endurcissement, il y a une très bonne corrélation entre les fuites d'ions et les notes de dégâts de gel ( $R^2 = 0,9293$ ).

## 6. Conclusion

Nous constatons que la nouvelle cinétique testée, 45 jours avec un endurcissement de 21 jours, différencie davantage les génotypes sensibles des génotypes résistants au gel puisque les notes de dégâts de gel sont beaucoup plus étendues. De plus, la corrélation entre les notes de dégâts de gel obtenues avec 21 jours d'endurcissement et les notes de dégâts de gel obtenues au champ est forte, ce qui valide la cinétique de 45 jours.

En ce qui concerne les résultats de fuite d'électrolytes, dans le cas de la cinétique de 35 jours, il n'y a pas de corrélation avec les notes de dégâts de gel. Avec le test de 45 jours, nous constatons que plus les plantes ont une note de dégâts de gel élevée, plus les membranes des cellules de leurs stipules sont endommagées. Dans ce cas, la mesure de fuite d'électrolytes apparaît comme un bon indicateur de l'acclimatation au froid.

Nous utilisons désormais le nouveau protocole du test froid, c'est-à-dire 45 jours avec une période d'endurcissement de 21 jours. Ce test est utilisé pour les expérimentations pois de notre UMR afin de mettre en évidence les mécanismes de l'acclimatation au froid.

De plus, la cinétique de ce test froid pour le pois sert de base pour la mise au point de tests froids sur d'autres espèces. ; nous l'avons adapté dans notre équipe, sur *Medicago truncatula*, plante modèle des Légumineuses ce qui a révélé une acclimatation au froid chez cette espèce.

## Bibliographie

- Bourion V, Lejeune-Hénaut I, Munier-Jolain N, Salon C (2003) Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *Europ. J. Agronomy* 19: 535-548
- Campos PS, Quartin V, Ramalho JC, Nunes MA (2003), Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. *Plants. J Plant Physiol* 160 (3): 283-292
- Dexter ST, Tottingham WE, Graber LF (1932), investigations of the hardiness of plants by measurement of electrical conductivity. *Plant Physiol* 7 (1): 63-78
- Lejeune-Hénaut I, Bourion V, Etévé G, Cunot E, Delhayé K, Desmyter C (1999), Floral initiation in field-grown forage peas is delayed to a greater extent by short photoperiods, than in other types of European varieties. *Euphytica* 109: 201-211
- Lejeune-Hénaut I, Hanocq E, Béthencourt L, Fontaine V, Delbreil B, Morin J, Petit A, Devaux R, Boilleau M, Stempniak JJ, Thomas M, Lainé AL, Foucher F, Baranger A, Burstin J, Rameau C, Giauffret C (2008), The flowering locus *Hr* colocalizes with a malor QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L.. *Theor Appl Genet* 116 (8): 1105-1116
- Levitt J (1980), Chilling, freezing, and high temperature stresses. In: *Responses of Plants to Environmental Stresses*, vol. 1, second ed.. Academic Press, New York, pp. 67-346
- Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreil P, Pilet-Nayel M, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Hénaut I, Burstin J (2005), Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet* 111: 1022-1031