

CHAPITRE II

RESISTANCE DES PLANTES AUX NEMATODES

**NIVEAU DE RESISTANCE DES CEREALES ET GRAMINEES
AUX NEMATODES A KYSTES
- test biologique miniaturise -**

Sylvie Valette¹ et Roger Rivoal¹

Les variétés résistantes sont un atout essentiel de la lutte contre les nématodes à kystes des céréales (notamment *Heterodera avenae*). Ce test évalue le niveau de résistance (opposition au développement des femelles) de céréales et graminées fourragères à ce nématode. La culture de variétés résistantes permet ainsi l'assainissement des sols.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

1.1.a. préparation des semences

Les grains sont trempés dans une solution javellisée à 5% durant 7min, rincés à l'eau du robinet et posés sur papier buvard humide en boîtes de Pétri. Celles-ci séjournent 24-48h à 3-4°C puis sont transférées à 20-22°C. On utilise les semences avec des racines longues d'un cm maximum.

1.1.b. préparation du substrat de culture

Un mélange de sable de Fontainebleau (80%) et de kaolin (20%), est réalisé à sec par 20kg en bétonnière ou autre mélangeur (porter un masque). Par quantité de 2kg, il est humidifié avec un engrais liquide (hakaphos bleu 15-10-15 à 4gL⁻¹), à raison de 100mL par kg de mélange, et malaxé manuellement pour obtenir un composé grumeleux.

1.1.c. préparation des maxi serres et des tubes, repiquage

Le fond d'une maxi serre (50x37,5cm) est recouvert de 2 à 2,5cm de sable de Fontainebleau (granulométrie : 98%<0,315mm) où sont enfoncés quatre pots en matière plastique servant de support à une grille métallique qui maintient verticalement des tubes en matière plastique de 20mL (h=9,5cm, Ø=2,1cm), percés au fond. Ceux-ci sont remplis de substrat, sans tassement excessif, et placés dans la grille métallique. Dès le remplissage achevé, le tapis de sable est humidifié avec environ 2,5L d'eau du robinet. A raison d'une plante par tube, les grains germés sont introduits à 0,5cm de profondeur. Une étiquette d'identification est ajoutée.

1.2. Préparation de l'inoculum

1.2.a. obtention des larves

On utilise des larves infestantes au deuxième stade de leur développement (L2), écloses de kystes issus d'élevage ou de tests préalables et conservés à sec à 3°C en tubes (cf. figure 3). Pour lever leur diapause, deux types de traitement thermique sont nécessaires. Pour les kystes de l'écotype septentrional, on les place dans le tamis d'un éclosoir immergé dans de l'eau du robinet (Figure 1) à 7°C. L'éclosion commence environ 4 mois après le début de ce traitement. Pour l'écotype méridional, les kystes restent deux mois à sec à 20°C puis sont traités comme précédemment. Toujours maintenir le niveau d'eau dans les éclosoirs.

¹ UMR INRA/ENSAR BiO3P « Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes » BP 35327 - 35653 Le Rheu cedex

Quand l'éclosion débute, récupérer les larves tous les 15 jours et les stocker en éprouvette à 3°C. Pour l'inoculation, utiliser des larves âgées de moins de deux mois.

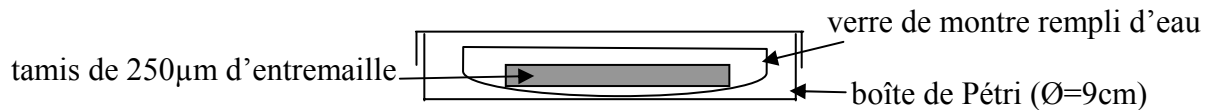


Figure 1 : schéma d'un éclosoir

1.2.b. calcul du nombre de larves disponibles (N)

Le nombre total (N) des larves mobiles est estimé par comptage, sous loupe binoculaire, dans deux serres de 2mL prélevés dans la suspension larvaire (Vt) homogénéisée avec un bulleur d'aquarium. Chaque serre est versé dans une cellule de comptage, étendu d'eau et l'on dépose une goutte de détergent pour faire sédimenter les larves. On compte puis on calcule le nombre total de larves contenues dans Vt.

1.2.c. préparation de l'inoculum (Vi) pour obtenir une dose de 90 larves dans 0,5mL

Connaissant N, on calcule le volume Vi (inoculum) nécessaire pour la dose désirée (($V_i = (N \times 0,5) / 90$)). Si $V_i > V_t$, diluer Vt : compléter avec de l'eau du robinet jusqu'à Vi.

Si $V_i < V_t$, concentrer Vt (jusqu'à Vi), par aspiration de l'eau, après sédimentation des larves. Pour cela transférer ce volume dans un récipient peu profond (type pot à confiture) qui facilitera l'utilisation de la pipette distributrice. On met l'inoculum à 4°C, puis après 3 heures on aspire l'eau en surface avec une trompe à vide (en laisser environ 50mL). Le volume est ajusté à Vi.

1.2.d. vérification de la concentration en larves de l'inoculum et calcul de l'écart-type

Après homogénéisation de l'inoculum, on prélève quatre échantillons de 0,5mL avec une pipette type « Eppendorf multipette 4780 ». Chaque serre est déposé dans une cellule de comptage et dénombré comme précédemment. Si la moyenne calculée est très différente de 90 L2 dans 0,5mL, on réajuste Vi en fonction du nombre de larves N recalculé à partir de cette moyenne, et on vérifie à nouveau sur quatre serres. Le calcul de l'écart-type permet d'estimer la précision de l'inoculum et la variabilité du volume induite par la pipette. Le nombre de plantes à inoculer est le double de Vi.

1.3. Inoculation et conditions de culture

L'inoculation, à raison de 8 grains par lignée de céréales ou 25 pour les lignées de graminées fourragères, est faite aussitôt après le semis pour que les racines en croissance s'infestent en traversant l'inoculum de larves.

On distribue avec une pipette de type « Eppendorf multipette 4780 » une dose de 0,5mL (soit environ 90 larves) vers les racines dans chaque tube puis on recouvre inoculum et racines avec un peu de substrat. Indiquer l'espèce et la population utilisées dans chaque maxi serre.

Ensuite les maxi serres sont placées dans une chambre climatisée à 16°C pour l'écotype septentrional, à 18°C pour l'écotype méridional, avec 16h de photopériode. Elles sont maintenues fermées pendant 15 jours pour éviter un dessèchement du substrat. L'arrosage s'effectue une à deux fois par semaine en mouillant le sable au fond de la maxi serre.

1.4. Lecture du test

1.4.a. extraction des femelles et des kystes

Le dénombrement des nématodes adultes néo-formés peut être réalisé après 60 jours pour le stade « femelles blanches », ou après 90 jours pour le stade « kystes » (cf. figure 3). Ce stade

« kystes », contrairement au stade « femelles blanches », permet la conservation des larves qui sont à l'intérieur de ceux-ci. On pourra ensuite utiliser ces kystes pour produire un nouvel inoculum.

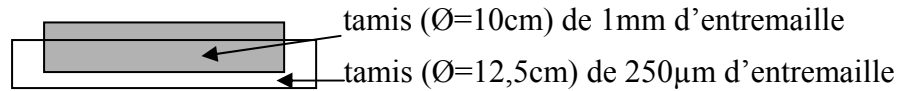


Figure 2 : dispositif utilisé pour la récupération des nématodes

Le contenu de chaque tube est versé sur deux tamis superposés (Figure 2) sur lesquels est dirigé un jet d'eau puissant qui élimine le substrat et détache des racines les nématodes qui sont arrêtés par le tamis de 250µm. Racines et nématodes sont ensuite récupérés dans deux pots différents, avec l'étiquette d'identification.

1.4.b. comptage

Il se fait sous loupe binoculaire. Il est souvent nécessaire de détacher les femelles ou kystes encore adhérents aux racines à l'aide de pinces fines ou aiguilles. Ils sont recueillis au pinceau, déposés dans une boîte de Pétri et comptés.

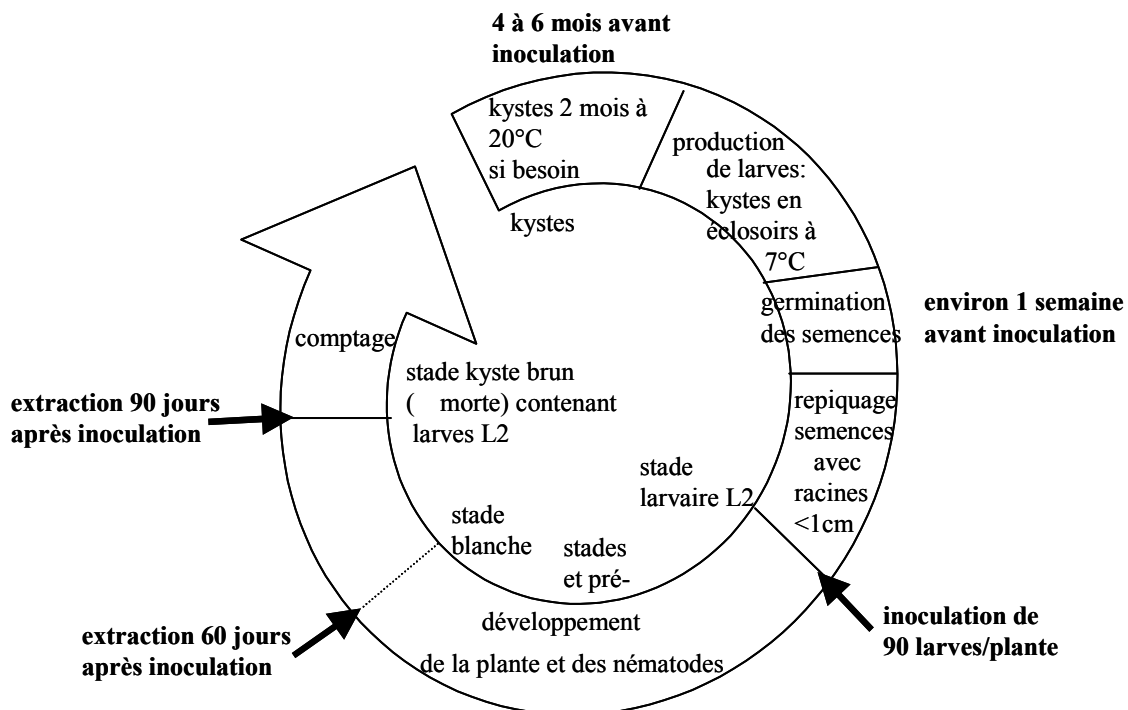


Figure 3 : schéma organisationnel et cycle de développement simplifié du nématode

1.5. Interprétation : niveaux de résistance

Pour les espèces autogames (céréales), deux niveaux de résistance sont définis. La plante a une **résistance totale** au nématode testé quand le nombre moyen de femelles blanches ou de kystes est strictement inférieur à 1 ; une **résistance intermédiaire** pour une moyenne comprise entre 1 et 3 inclus, au-delà de 3 il n'y a pas de résistance. Pour les espèces allogames (graminées fourragères), le système précédent est complété par un pourcentage de plantes sans nématode.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

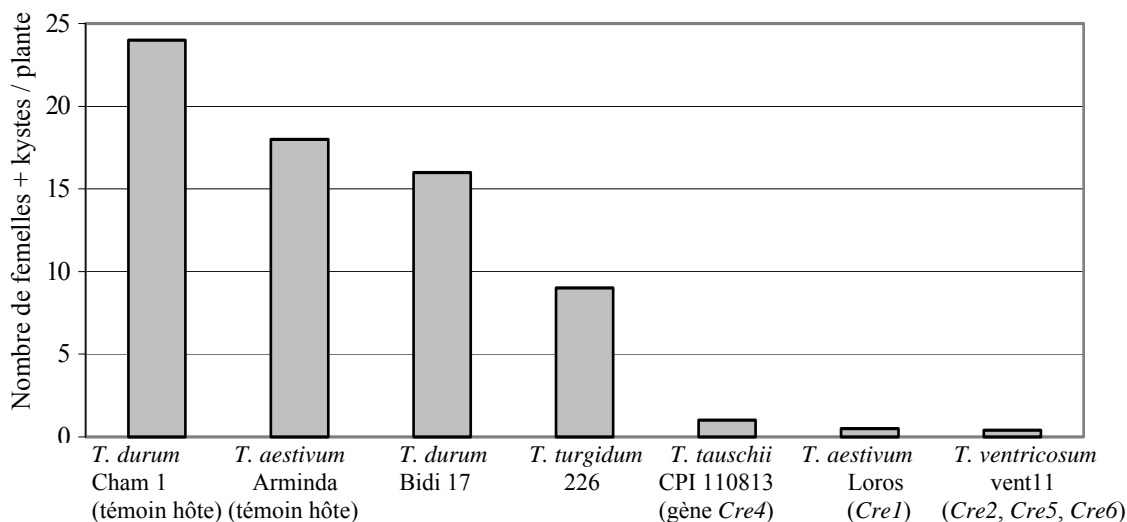


Figure 4 : réactions d'hôte de serre vis à vis du pathotype *Ha41* d'*Heterodera avenae*

Le graphique montre les différents niveaux de résistance observés chez différentes lignées, variétés ou espèces de *serre*, à l'égard d'*H. avenae*. Une résistance totale est observée chez Loros (gène *Cre1*) et chez *T. ventricosum* vent11 (gènes *Cre2, Cre5, Cre6*) alors qu'une résistance intermédiaire est observée chez *T. tauschii* CPI 110813 (gène *Cre4*).

3. CONCLUSION

Ce test a servi à rechercher, en collaboration avec des équipes du CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo), des sources de résistance dans le blé et ses apparentés sauvages (*Aegilops*). Lors de programmes INRA de sélection intra et interspécifiques, on a vérifié le transfert de plusieurs gènes de résistance dans le blé tendre et le blé dur.

A l'inverse, il nous renseigne sur la virulence de pathotypes vis-à-vis des gènes de résistance et l'opportunité de leur utilisation dans les programmes de sélection. Ce test a permis également de mettre en évidence des différences dans la capacité reproductive des populations de ces nématodes sur les témoins hôtes.

Il a l'avantage d'être réalisable indépendamment des cycles cultureux des plantes et des cycles d'activité saisonniers de ces bioagresseurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bekal S, Jahier J, Rivoal R (1998) Host responses of different Triticeae to species of the cereal cyst nematode complex in relation to breeding resistant durum wheat. *Fundam appl Nematol* 21:359-370
- Rivoal R (1986) Biology of *Heterodera avenae* Wollenweber in France. IV. Comparative study of the hatching cycles of two ecotypes after their transfer to different climatic conditions. *Revue de Nématologie* 4:405-410
- Rivoal R, Bekal S, Valette S, Gauthier JP, Bel Hadj Fradj M, Mokabli A, Jahier J, Nicol J, Yahyaoui A (2001) Variation in reproductive capacity and virulence on different genotypes and resistance genes of *Triticeae*, in the cereal cyst species complex. *Nematology* 3:581-592
- Rivoal R, Bel Hadj Fradj M, Valette S, Mokabli A, Jahier J, Zaharieva M, Nicol J (2000) Variability for resistance to cereal cyst nematodes in *Triticeae* : Potential use for *Triticum turgidum* L. var *durum* improvement. Séminaire sur l'amélioration du Blé dur dans la région méditerranéenne : Nouveaux défis, 12-14 Avril, Saragosse, Espagne. Publié dans *OPTIONS méditerranéennes Série A* : 40:413-416

**TEST BIOLOGIQUE POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE
RESISTANT OU SENSIBLE DE LA FEVEROLE AUX NEMATODES
DES TIGES ET DES BULBES, *Ditylenchus dipsaci*.**

*Magali Esquibet*¹

Le nématode des tiges et des bulbes, *Ditylenchus dipsaci*, connu sur de nombreuses cultures, parasite exclusivement les organes aériens. Sur *Vicia faba*, l'importance des dégâts varie selon les conditions climatiques mais aussi selon le mode de contamination des cultures, par le sol ou par la graine. La création de variétés de protéagineux ou de légumineuses fourragères résistantes à *D. dipsaci* constitue un objectif particulièrement intéressant pour intervenir contre ce bioagresseur. Toutefois, aucune variété de fève ou de féverole résistante n'est encore commercialisée bien que des lignées ou accessions ne multipliant pas le nématode aient été identifiés.

Le test biologique d'évaluation de la résistance de *Vicia faba* au nématode des tiges, décrit dans cet article, a été mis au point et publié par Caubel G. et Leclercq D. (1989). Cette méthode d'inoculation artificielle en conditions contrôlées est simple, reproductible et permet une sélection rapide de génotypes résistants.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

Les graines de fèves ou féveroles sont mises à germer à 25 °C sur de la vermiculite (Vermex M®, Efisol, France) humide. Trente répétitions sont nécessaires pour correctement tester une accession. Après 4 jours, les plantules sont repiquées dans un mélange terreux à raison d'une plante par pot (7x7x7cm) et de 30 pots par terrine de culture (maxi serre BHR, Bouillard Frères SA, Saint Germain du plain, France). Les plantes d'une même accession peuvent être placées dans une seule terrine ou distribuées au hasard. Par contre, pour éviter tout mélange entre les populations du bioagresseur, une seule population de nématode est utilisée par terrine.

Deux variétés, la féverole "Diana" ou la fève "Aguadulce" sont utilisées comme témoins de sensibilité. La lignée de féverole "INRA 29H" est utilisée comme témoin de résistance.

1.2. Préparation du matériel animal

Les nématodes étant conservés dans des tissus secs de plantes, l'inoculum est essentiellement constitué de larves préadultes, stade caractérisé par son aptitude à la quiescence.

Les tronçons de tiges infestées (1 cm) sont déposés sur un tamis de 20µm lui-même placé dans un récipient (grande boîte de Pétri ou assiette) contenant de l'eau du robinet. Les nématodes en se réhydratant deviennent actifs et traversent les mailles du tamis. On récupère ainsi les larves, sans débris végétaux, au fond du récipient. L'eau doit être renouvelée au moins 3 fois par jour.

Les larves sont ensuite concentrées, par décantation, de façon à obtenir une concentration d'environ 200 larves pour 20µl d'eau. Le nombre de nématodes est évalué en comptant, à l'aide d'une loupe, les larves présentes dans un échantillon de 20 à 100 µl. L'inoculum est

¹ Centre INRA de Rennes – UMR BiO3P – BP 35327 35653 LE RHEU Cedex - esquibet@rennes.inra.fr

préparé en mélangeant la suspension obtenue à une solution de méthylcellulose, 2%. On obtient ainsi une solution de méthylcellulose à 1% contenant 100 nématodes pour 20 μ l. Au moins trois comptages sont nécessaires pour vérifier au préalable la concentration de l'inoculum qui sera utilisé.

1.3. Inoculation des plantules

Une semaine après repiquage, les plantes sont placées dans des enceintes climatisées (15°C et une photopériode de 16 heures). L'inoculation artificielle des plantules est effectuée en déposant à l'aisselle du premier stipule une gouttelette de 20 μ l d'inoculum. La solution de méthylcellulose permet une bonne adhésion de la gouttelette sur la plante et maintient les nématodes en suspension ce qui prolonge le temps de pénétration dans la plante. Une humidité saturante est maintenue pendant 3 jours en fermant les maxi serres.

1.4. Multiplication du nématode et développement des symptômes

La multiplication du nématode est estimée après un délai d'environ 2 mois qui correspond à la phase d'accroissement des populations à 15°C et à l'apparition des symptômes d'attaque sur le bourgeon axillaire inoculé. Ces symptômes diffèrent selon la sensibilité de la plante testée et la race de nématode utilisée (Figure 1) :

- Pour des plantes sensibles mises en présence d'une race géante de *D. dipsaci*, on observe un gonflement du bourgeon et de la tige. Les tissus parenchymateux sont boursoufflés, ils se décolorent puis brunissent. La tige gonfle et se déforme, les entre-nœuds restent courts. Les pétioles et folioles présentent un aspect gaufré.
- Pour des plantes sensibles mises en présence d'une race normale de *D. dipsaci*, on observe une nécrose de la tige. La tige se colore en un brun rougeâtre puis noircit avec le temps.
- Pour des plantes résistantes, on observe des nécroses localisées à proximité du point d'inoculation. En présence d'une race géante, la longueur de la nécrose est variable mais reste souvent limitée à un seul mérithalle. Aucun gonflement des tissus n'est observé.



Figure 1: Gonflement sur plante sensible, Diana (S) et nécrose localisée sur plante résistante, INRA 29H (R). Les plantes sont inoculées par une race géante de *D. dipsaci*.

1.5. Système de notation

En fin d'expérimentation et avant l'extraction des nématodes, chaque plante est notée selon les critères suivant : gonflée, nécrosée sans gonflement ou saine. On obtient ainsi pour chaque accession testée, un pourcentage de plantes gonflées, nécrosées et saines qui donne par référence aux témoins sensibles et résistant utilisés une bonne indication sur la résistance au nématode présente dans les accessions testées.

1.6. Evaluation du taux de multiplication du nématode

La résistance se définit comme l'opposition de la plante à la multiplication du nématode.

Le nombre de nématodes est compté dans chaque plante après notation des symptômes. Toutes les zones où un symptôme est observé, sont coupées et dilacérées rapidement (20s) dans un mixeur. Si la plante est sensible, le broyat peut être dilué et les nématodes sont dénombrés dans une partie aliquote (5ml). En présence d'une plante résistante, les nématodes sont dénombrés dans la totalité de la suspension. Le broyat est préalablement filtré sur un tamis à large maille (600µm environ), le filtrat est ensuite concentré sur un tamis de 5 µm (20ml environ).

Tous les stades larvaires et les adultes sont comptés. Les œufs ne sont pas dénombrés pour des raisons pratiques. Pour limiter l'éclosion après l'extraction des nématodes, le broyat est conservé au frais (6°C). Le taux de multiplication du nématode par plante (TX) est ensuite évalué en divisant le nombre de nématodes présents dans la plante au moment de l'extraction par le nombre d'individus déposés sur la plante. Les taux de multiplication sont ensuite soumis à une analyse de variance en utilisant le logiciel SAS (SAS Institute, 1988). Les taux moyens obtenus par accession sont classés selon le test de Newman-Keuls (au seuil de 5%).

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les larves pénètrent dans les tissus quelques heures après l'inoculation et deviennent adultes après 3 jours. La pénétration des larves et leur installation dans la plante ne diffèrent pas entre une plante sensible et une plante résistante. Par contre, les effectifs rencontrés après deux mois de culture sont très variables et atteignent parfois plusieurs centaines de milliers d'individus sur une plante sensible inoculée avec une race géante (Figure 2).

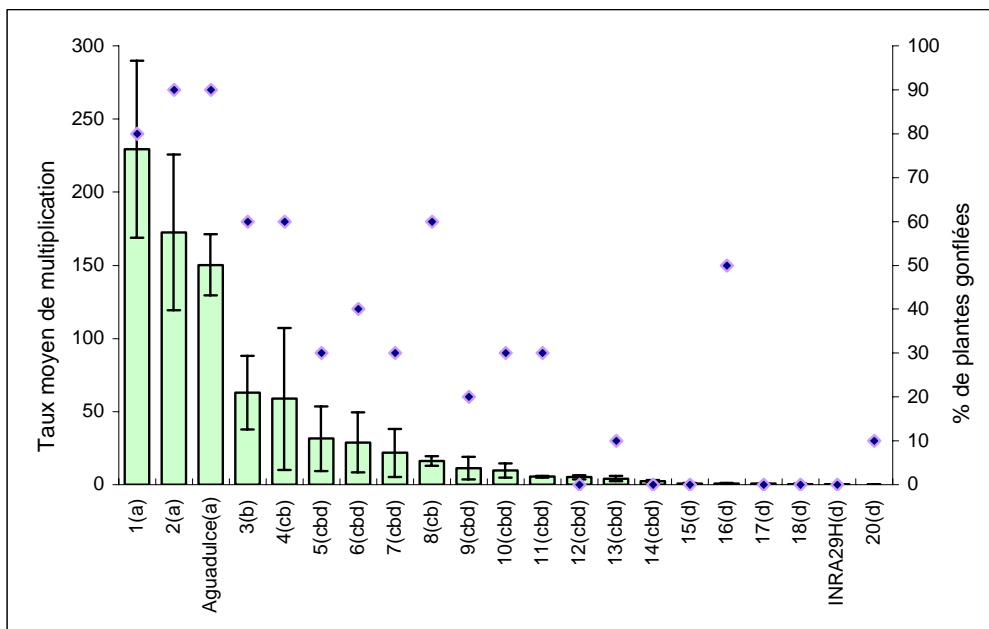


Figure 2 : Pourcentage de plantes gonflées et taux moyen de multiplication du nématode par accession. Les plantes ont été inoculées par une race géante. Les symptômes extériorisés et les effectifs du nématode sont évalués 2 mois après l'inoculation des plantules. Le classement des accessions pour le taux moyen de multiplication est indiqué entre parenthèses (test de Newman-Keuls au seuil de 5%).

Dans les conditions expérimentales décrites, il existe une relation entre le type de symptôme et l'importance des effectifs du nématode, excepté pour l'accession 16 qui présente un fort pourcentage de plantes gonflées donc sensibles bien que le nématode ne se soit pas multiplié. Dans l'essai présenté ci-dessus, la notation des symptômes pouvait donc suffire pour une présélection des accessions résistantes. Toutefois, pour une étude plus poussée, l'évaluation du taux de multiplication du nématode par plante a été nécessaire.

Ce taux est très variable entre les 30 plantes qui ont été testées pour une même accession ce qui perturbe l'analyse de variance et donne des différences non significatives entre les taux moyens de multiplication. Néanmoins, malgré cet inconvénient les accessions peuvent être classées en 3 grandes catégories :

- Sensibles : les accessions 1 et 2 qui sont aussi sensibles que le témoin Agudulce
- Intermédiaires : les accessions 3 à 14 qui présentent des taux de multiplication >1 mais moindre que le témoin sensible.
- Résistantes : les accessions 14, 15, 16, 17, 18 et 20 qui sont aussi résistantes que le témoin résistant INRA 29H.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode d'inoculation artificielle de plantules conduit à une bonne pénétration du nématode dans les tissus de la fève ou féverole et peu de plantes non résistantes échappent à l'infection. Réalisés avec un nombre important de plantes chacune analysée individuellement, les essais montrent que la multiplication du nématode dépend surtout du facteur variétal. Mais les taux de multiplication variant au sein d'une variété, il est impératif de considérer les résultats plante à plante sur un nombre suffisant de répétitions.

Cette méthode en conditions contrôlées est simple, reproductible et permet un bon développement des symptômes d'attaque du nématode. Le tri des plantes résistantes par élimination des plantes présentant un gonflement est aisé et conduit à un taux d'erreur acceptable car même si quelques accessions résistantes peuvent être éliminées par ce critère, aucune accession sensible ne peut être gardée. Ces réactions sont tout à fait semblables à celles observées dans les conditions de plein champ sur la tige primaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caubel G. et Leclercq D. (1989). Estimation de la résistance à la race géante de *Ditylenchus dipsaci* par les symptômes chez la féverole (*Vicia faba* L.). *Nematologica* 35 : 216-224.
- SAS Institute Inc (eds) (1988). SAS/STAT user's guide, release 6.03 edition, SAS Institute, North Carolina, Cary USA.

TEST BIOLOGIQUE POUR EVALUER LA RESISTANCE DE LA BETTERAVE SUCRIERE AU NEMATODE A KYSTE *heterodera schachtii*

Catherine Porte¹

H. schachtii est un parasite majeur de la betterave sucrière (*Beta vulgaris*), présent notamment dans toute l'Europe, et peut occasionner jusqu'à 30% de baisse de rendement. Depuis la commercialisation des premières variétés résistantes en 1996, la lutte variétale est une alternative qui a fait ses preuves en augmentant les niveaux de rendement tout en réduisant les populations du nématode dans le sol (Porte *et al.*, 1999).

La méthodologie décrite ici a été développée, en particulier, pour répondre aux besoins du CTPS afin d'évaluer la résistance des variétés en demande d'inscription. Ce test biologique réalisé en conditions contrôlées et standardisées est basé sur le dénombrement des individus femelles d'*H. schachtii* formés sur les racines de plantules de betteraves après inoculation de larves infestantes.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Substrat de culture

Le substrat est composé d'un mélange homogène de 80 % (poids) de sable de Fontainebleau (silice type « Sablon », 95 % des particules >300 µm) et de 20 % de kaolin KP en poudre, auquel on ajoute une solution d'engrais N-P-K (Hakaphos bleu 15-10-15) à 4 g/l, à raison de 100 ml pour 1 kg de mélange sec. Le mélange humide est malaxé manuellement jusqu'à ce que le substrat présente un aspect grumeleux. Le kaolin permet d'obtenir un substrat avec une structure poreuse non asphyxiante pour la plante et adaptée au déplacement des larves de nématode. Le substrat est réparti dans des pots de 70 ml (Ø3,5X8 cm) dont le fond est percé. Les pots sont placés dans des bacs (50X38X11 cm) contenant du sable de Fontainebleau sur 2 cm d'épaisseur, enfoncés sur 1 cm de hauteur. Le sable dans le bac est humidifié jusqu'à saturation en eau mais sans excès. Les bacs sont ensuite recouverts d'un couvercle (51X38,5X26 cm) transparent possédant un volet d'aération. L'ensemble bac+couvercle est appelé « Maxiserre ». Tout au long de l'expérimentation, l'humidité du substrat est maintenue en apportant régulièrement de l'eau au sable au fond du bac. L'arrosage ne doit pas être fait directement dans les pots car cela provoque le tassement du substrat et pourrait entraîner les nématodes en dehors du pot.

1.2. Matériel végétal

Pour chacune des variétés testées, les graines de betteraves sont mises à tremper dans l'acide sulfurique à 95% pendant 10 minutes afin de ramollir le liège dur des semences, pour une germination plus rapide et homogène, puis soigneusement rincées à l'eau. Les graines sont ensuite placées en boîte de Pétri sur milieu gélosé (15 g d'agar/l). Les boîtes sont mises à l'obscurité à 20-25°C pendant 48 à 72 h pour la germination.

Les graines germées sont repiquées lorsque la radicule atteint environ 1 cm de long. Chaque graine est repiquée individuellement (1 plante/pot), à l'aide d'une pince souple, à environ 1 cm de profondeur, à raison de 40 pots par variété (cas du test CTPS). Les maxi serres sont

¹ INRA – UMR BiO3P – Domaine de la Motte – B.P. 35327 – F –35653 Le Rheu cedex

placées en chambre climatisée à 20°C et 16 heures de lumière artificielle (tubes fluorescents type « lumière du jour »).

1.3. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est constitué de larves infestantes (J2) obtenues à partir de kystes issus d'élevages sur colza ou betterave et stockés à 4°C (Caubel, 1993). Le nombre de kystes nécessaire à la préparation de l'inoculum est défini en se basant sur un potentiel moyen d'éclosion de 200 larves par kyste. Ils sont placés à 20-25 °C sur un tamis de 250 µm et immergés dans une solution de chlorure de zinc (ZnCl₂ 4mM) qui stimule l'éclosion des larves d'*H. schachtii*. Après 24 h d'incubation, la solution est filtrée rapidement sur un tamis de 20 µm puis les larves sont récupérées immédiatement en rinçant le tamis à l'aide d'une pissette d'eau. La suspension larvaire est stockée au froid (4°C) dans un volume d'eau dont la hauteur n'excède pas 2 cm et peut être ainsi conservée pendant une dizaine de jours sans altération de la viabilité des larves. L'opération pour récupérer les larves est répétée tous les jours jusqu'à l'obtention du nombre de larves nécessaire pour l'inoculation. Le volume de la suspension larvaire est alors ajusté pour obtenir une concentration de 600 larves/ml (± 5%); les comptages sont effectués sous loupe binoculaire dans une cellule quadrillée.

1.4. Inoculation

Les plantes sont inoculées au stade « sortie deux vraies feuilles », environ 15 jours après le repiquage, en déposant 1 ml de la suspension larvaire dans un orifice de 1 cm de profondeur à proximité du collet, à l'aide d'une pipette à seringue (Eppendorf Multipette 4780, seringue 12,5 ml). Durant l'inoculation, la suspension larvaire est maintenue sous agitation magnétique modérée et continue car les larves tendent à sédimenter rapidement.

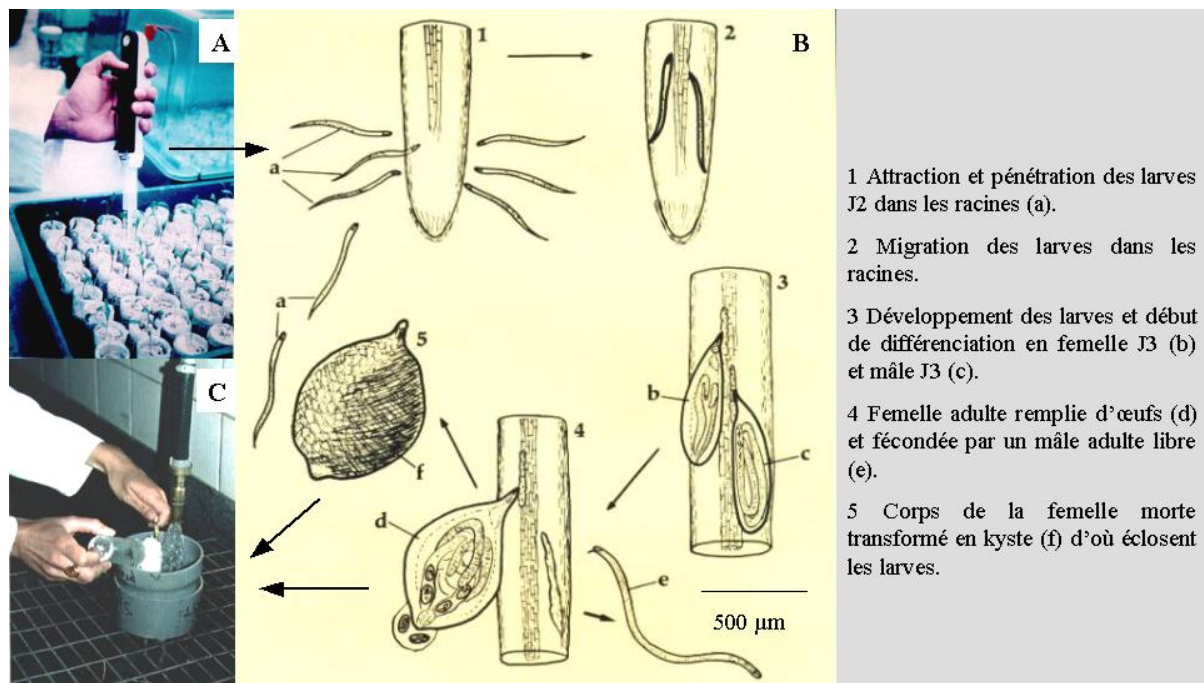


Figure 1 : Inoculation de plantules de betterave avec des larves d'*H. schachtii* (A), cycle biologique des nématodes à kyste (B), extraction des femelles néoformées (C).

1.5. Extraction et comptage

L'extraction des femelles adultes néoformées est réalisée 5 à 6 semaines après l'inoculation à l'aide d'un système de 2 tamis superposés de 800 µm et 350 µm et d'un jet d'eau sous pression. Le contenu de chaque pot (système racinaire+substrat) est vidé sur le tamis supérieur (800 µm) et lavé avec le jet d'eau en insistant sur les racines pour en décrocher les femelles. Les femelles, des morceaux de radicelles et un résidu de sable ($\approx 10\%$) sont retenus par le tamis inférieur (250 µm). Le contenu du tamis est alors transféré à l'aide d'une pissette dans un récipient de 150 ml. Le comptage des femelles s'effectue sous loupe binoculaire en observant le contenu du récipient vidé dans une boîte quadrillée à fond noir permettant de bien visualiser les femelles blanches. Avant de procéder à l'extraction sur l'ensemble des plantes, il est préférable de s'assurer que les femelles aient atteint le stade de développement souhaité (femelles blanches et/ou brunissantes, bien globuleuses) en effectuant une observation sur 2 ou 3 plantes témoins. En effet, si l'extraction est réalisée trop tôt, on risque de perdre des jeunes femelles (petites J4) qui passeraient au travers du tamis de 250 µm.

2. INTERPRETATION DES RESULTATS

Les résultats des comptages plante à plante sont représentés sous forme d'histogrammes (figure 2) ce qui permet d'observer la distribution du pourcentage de plantes en fonction du nombre de femelles formées pour chacune des variétés.

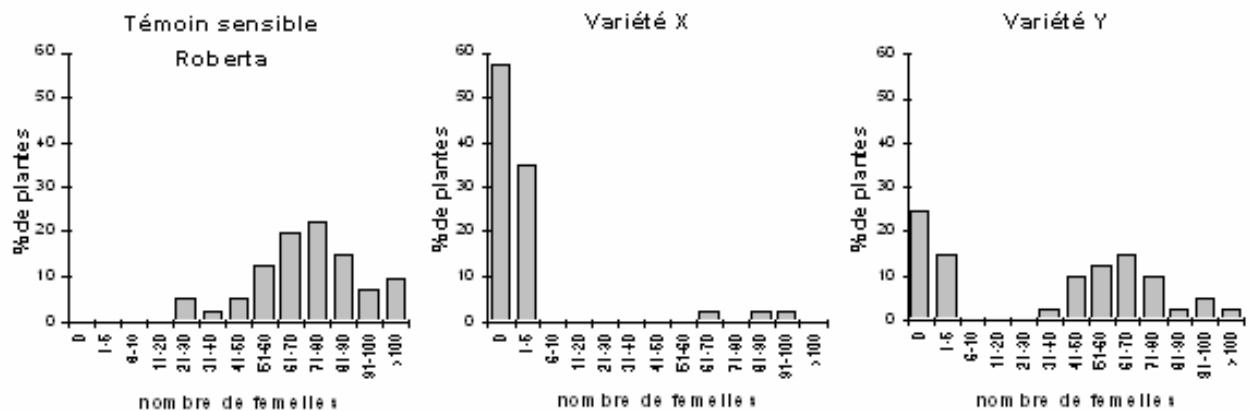


Figure 2 : Distribution du pourcentage de plantes en fonction du nombre de nématodes femelles formés.

Les résultats du test sur le témoin sensible (Roberta) permettent de juger de la bonne multiplication du nématode et ainsi de valider (ou non) l'essai mis en place. Toutes les plantes doivent porter un nombre important de femelles (≥ 20) et leur distribution suivre une loi de type Gaussien (normale). En revanche pour les variétés X et Y la distribution est bimodale. Les résultats montrent clairement une opposition forte, mais non totale, au développement des femelles pour le premier groupe de plantes (celles qui portent moins de 10 femelles). De plus, le test met en évidence la présence d'un deuxième groupe de plantes qui multiplie le nématode comme des plantes sensibles. Il s'agit en fait de plantes pour lesquelles le gène de résistance dominant *HsI^{pro1}*, qui a pour origine une betterave sauvage (*Beta procumbens*), est absent (hypothèse vérifiable par test moléculaire). En effet, les variétés sont des hybrides hétérozygotes pour ce caractère dont le taux de transmission est fonction du niveau de fixation chez le parent qui porte la résistance et/ou de la stabilité de la transmission du fragment de

chromosome porteur du gène *HsI^{pro1}*. La résistance est considérée comme fixée pour la variété X malgré un petit nombre de plantes auxquelles le gène n'a pas été transmis ; ces observations sont classiques chez les meilleurs des hybrides. Dans le cas de la variété Y la résistance n'est pas considérée comme fixée du fait d'un trop grand nombre de plantes non résistantes. Le pourcentage de ce type de plantes est déterminant pour l'inscription de la variété, par conséquent, la variété Y ne peut être retenue puisqu'elle ne répond pas au critère défini par le CTPS qui requière moins de 10% de plantes non résistantes.

3. CONCLUSION

Cette méthode simple et reproductible a été développée à l'INRA initialement par Caubel et Chaubet sur crucifères (1988). Par la suite elle a été adaptée et mise en œuvre en routine sur betterave de 1992 à 1999, puis transférée au GEVES (SNES, Angers) qui assure depuis lors, selon le même procédé, l'étude des variétés résistantes à *H. schachtii* pour le CTPS.

Hormis l'étude des nouvelles variétés, cette méthodologie est également appliquée dans le cadre d'études plus approfondies menées par l'INRA sur la résistance conférée par *HsI^{pro1}*, notamment sur la fécondité des femelles développées sur plantes résistantes, le développement de plusieurs générations du nématode (Mahfoud et al., 1996), le comportement de différentes populations d'*H. schachtii* (Porte et al, 1997) pour leur aptitude à contourner la résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caubel G, Chaubet B (1988) Méthodologie pour l'évaluation de la résistance des crucifères à *Heterodera schachtii* Schmidt. C.R. Acad Agric Fr 74:93-98
- Caubel G, (1993) Influence of storage conditions on the subsequent emergence of juveniles from cysts of *Heterodera schachtii* (Nematoda : Heteroderidae). Agrocienca, Proteccion vegetal, Montecillo, Mexico 4:141-145
- Mahfoud A, Porte C, Caubel G, (1996) La résistance de la betterave sucrière HM1091 vis-à-vis du nématode à kyste, *Heterodera schachtii*. Nematol medit 25:113-120
- Porte C, Mahfoud A, Caubel G, (1997) Comportement de populations géographiques de *Heterodera schachtii* et *H. trifolii*, vis à vis de betteraves. Nematol medit 25 :113-120
- Porte C, Marzin H, Muchembled C, Buisson A, Ladevèze L, Richard B, Caubel G (1999) Dynamique des populations telluriques du nématode à kyste, *Heterodera schachtii*, sous l'effet de variétés résistantes de betterave sucrière. ANPP-5^{ème} conférence internationale sur les ravageurs en agriculture, Montpellier II:555-562

RESISTANCE MONOGENIQUE DE TYPE H1 AU NEMATODE A KYSTE *globodera rostochiensis* CHEZ LA POMME DE TERRE

Méthode d'identification génétique chez les parents utilisés en croisement

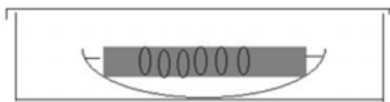
Didier Fouville et Claudia Rouaux¹

Une résistance totale due au gène dominant H1 issu de *Solanum tuberosum andigena* (espèce tétraploïde) est utilisée en lutte génétique contre le nématode à kyste de la pomme de terre *Globodera rostochiensis*. Les génotypes peuvent contenir le gène de résistance H1 en 1 (simplex Rrrr), 2 (duplex RRrr), 3 (triplex RRRr) ou 4 (quadriplex RRRR) exemplaires. Pour la sélection, l'introgession du gène H1 peut se faire par croisement d'un génotype résistant avec un génotype non résistant. Selon le nombre de copie du gène H1 porté par le parent résistant, le pourcentage de génotypes résistants obtenu dans chaque descendance sera de 50 % si le parent est simplex, 83,33 % si le parent est duplex et 100 % si le parent est triplex ou quadriplex (voir annexe). La connaissance du nombre de copies chez un génotype résistant est donc importante puisqu'elle optimise l'efficacité de la sélection pour la résistance.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

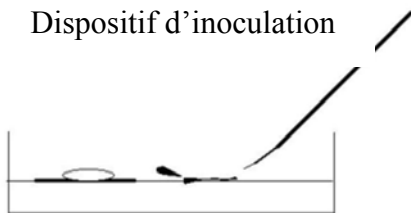
Dispositif de mise en éclosion



1.1.a. Pour l'éclosion des larves (J2)

- Boîte de Pétri en verre.
- Verre de montre.
- Petit pinceau pour trier les kystes (inoculum).
- Tamis de 250 µm de maillage.
- Exsudat de racines de pomme de terre.

Dispositif d'inoculation



1.1.b. Pour l'inoculation des larves

- Pipette Pasteur effilée pour le prélèvement des J2 éclosés dans le verre de montre.
- Lamelle de verre pour déposer une goutte d'exsudat de racines de pomme de terre contenant des J2 fraîchement éclosés.
- Cil monté sur une pointe avec du vernis à ongles pour prélever les J2 qui sont sur la lamelle.
- Pince pour déplacer la lamelle de boîte en boîte.

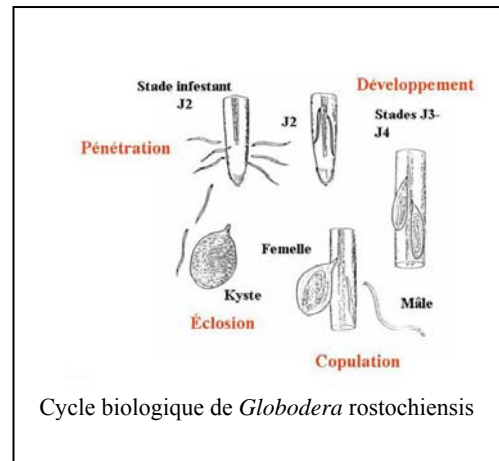
1.1.c. Pour la mise en place du test en général

- Graines de pomme de terre.
- Boîte de Pétri diamètre 90 (sans ergot pour éviter la déshydratation au cours de test)
- Loupe binoculaire (pour trier les kystes, inoculer les J2 et lire le test)

¹ UMR Bio3P, INRA, domaine de la Motte BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, fouville@lerheu.rennes.inra.fr ; rouaux@lerheu.rennes.inra.fr .

1.2. Test en boîte de Pétri

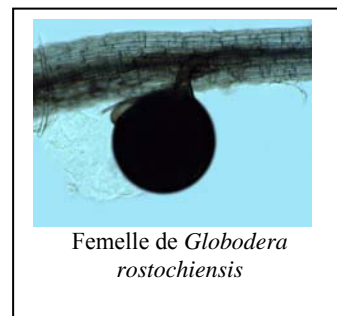
Pour ce test, on utilise le pathotype Ro1 de *Globodera rostochiensis* population Ecosse. Les larves sont obtenues par immersion de kystes dans des exsudats de racines de pomme de terre. Cent graines environ issues d'un croisement à tester sont désinfectées dans une solution alcoolique de chlorure de mercure à 0,2 % puis rincées trois fois à l'eau du robinet stérile. Elles sont mises à germer individuellement en boîte de Pétri sans ergot sur de l'eau gélosée (Agar 15 g/L) à température ambiante. Ce support de culture est coulé à 55 °C dans les boîtes au moins 5 jours avant la mise en place de l'essai pour laisser sécher les condensations d'eau dont la présence serait



préjudiciable à la pénétration des larves dans les racines. Après germination des graines, on dépose trois larves sur la racine quand celle-ci atteint un cm de longueur. Cette racine doit absolument adhérer au milieu gélosé. L'ensemble est conservé 24 heures à température ambiante pour optimiser le taux de pénétration des nématodes. Les boîtes sont ensuite transférées dans une enceinte climatisée (18°C et 16 heures de lumière) favorisant une condensation productrice d'eau dans les boîtes qui optimisent ainsi la croissance des racines.

1.3. Système de notation et interprétation des résultats

Vingt jours après inoculation, les plantules des croisements à étudier et un témoin non résistant (NR) d'un même niveau de ploïdie sont examinés. Les femelles de *Globodera rostochiensis* sont dénombrées sous la loupe binoculaire et une analyse statistique est réalisée dans un premier temps par le test 2¹ d'Arbnonnier (1966) très proche du test de χ^2 . Lorsque le test 2¹ révèle une différence significative entre les descendants d'un croisement et le témoin non résistant, un test de χ^2 est réalisé pour évaluer le nombre de copie du gène H1 présent chez le parent résistant.



1.4. Rappel de la formule de calcul du χ^2

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

f_o = fréquences observées
 f_e = fréquences théoriques

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

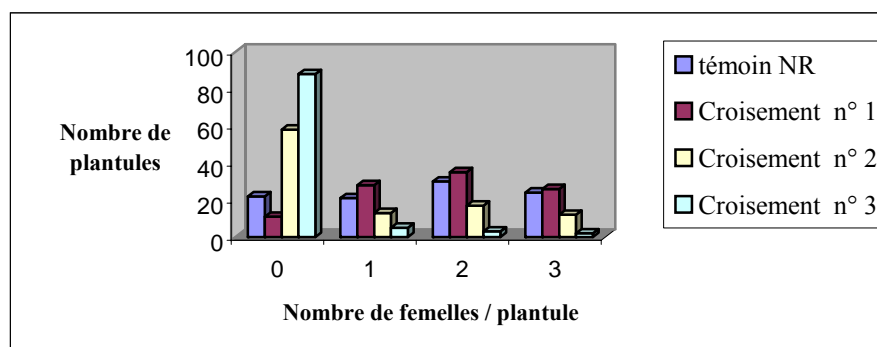
L'histogramme ci-dessous représente le dénombrement des femelles de *Globodera rostochiensis* observées sur plantules après l'inoculation de 3 larves de Ro1 par racine pour 3 croisements et un témoin NR.

témoin NR = (Désirée*Désirée) avec 97 graines testées.

Croisement n°1 = (Caspar*Alcmaria) *BF 15 avec 100 graines testées

Croisement n°2 = (Morene*Maris pippet)*BF 15 avec 100 graines testées

Croisement n°3 = (Laddy rosetta*Maris pippet)*BF 15 avec 98 graines testées.



Avec les résultats du comptage des femelles de RO1 représenté dans l'histogramme ci-dessus, le test statistique χ^2 d'Arbbonnier nous démontre qu'il n'y a pas de différence significative entre le croisement n°1 et le **Témoin NR** pour un degré de liberté (d.d.l) de 3 au seuil de 95% en consultant le tableau des fréquences cumulées du χ^2 . Il n'y a donc aucune présence de gène de résistance dans ce génotype testé.

Les deux autres croisements présentent par contre après analyse des différences significatives qui engendre une analyse statistique supplémentaire : **le test du χ^2**

2.1. Test du χ^2 sur les deux croisements présentant des différences significatives après le test statistique χ^2 d'Arbbonnier

Pour le calcul du χ^2 , les fréquences théoriques des croisements tétraploïdes Simplex * NR et Duplex * NR sont pondérées en fonction du témoin non résistant (Désirée*Désirée).

Croisements	Nombre de femelles / plantule				Nombre de graines testées
	0	1	2	3	
Témoin NR (Désirée *Désirée)	22	21	30	24	97
Croisement n° 2	58	13	17	12	100
Simplex * NR (calcul f_e)	$50+50*22/97 =$ 61,3	$0+50*21/97 =$ 10,8	$0+50*30/97 =$ 15,4	$0+50*24/97 =$ 12,4	/ 100
Croisement n° 3	88	5	3	2	98
Duplex * NR (calcul f_e)	$83,3+16,6*22/97 =$ 87,4	$0+16,6*21/97 =$ 3,6	$0+16,6*30/97 =$ 5,1	$0+16,6*24/97 =$ 4,1	/ 100

Le calcul du χ^2 concernant les résultats du croisement n°2 démontre que le parent résistant est simplex. En effet, le χ^2 obtenu (0,78) permet d'affirmer que l'hypothèse d'un croisement simplex * nulliplex est vérifiée pour un d.d.l de 3 au seuil de 95% en consultant le tableau des fréquences cumulées du χ^2 .

Le calcul du χ^2 concernant les résultats du croisement n° 3 démontre que le parent résistant est duplex. En effet, le χ^2 obtenu (2,61) permet d'affirmer que l'hypothèse d'un croisement duplex*nulliplex est vérifiée pour un d.d.l de 3 au seuil de 95% en consultant le tableau des fréquences cumulées du χ^2

3. CONCLUSION

On dispose pour la recherche de résistance de type monogénique à *Globodera rostochiensis* d'un test qui permet en 20 jours d'évaluer le nombre de copie du gène H1 présent chez un génotype résistant. Cette connaissance permet ainsi d'optimiser le potentiel de réussite dans un schéma de sélection. Ce test est aujourd'hui moins utilisé par les sélectionneurs qui disposent désormais de suffisamment de géniteurs d'intérêts possédant le gène H1. Néanmoins ce test reste pertinent pour une meilleure exploitation d'éventuelles nouvelles sources de résistance monogénique à ces nématodes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Arbonnier P, (1966). L'analyse de l'information. Aperçu théorique et application à la loi multinomiale. *Annales de sciences forestières* 23 : 950-1009.

Mugniéry D, (1985) Test de résistance de descendance de pomme de terre à *Globodera rostochiensis* Woll. *Potato Research* 29 : 131-140.

ANNEXE

Gamètes produits chez des génotypes tétraploïdes.

Les gamètes produits chez un génotype **non résistant** (rrrr) sont toujours (rr).

Chez un génotype résistant **Simplex (Rrrr)**, nous aurons production de gamètes (**Rr**) ou (rr).

Chez un génotype résistant **Duplex (RRrr)**, nous trouverons trois possibilités qui sont : Un gamète (**RR**), quatre (**Rr**) et un (rr).

Enfin chez un génotype résistant **Triplex (RRRr)**, un (**RR**) et un (**Rr**) sont les deux seuls types de gamètes possibles.

La descendance d'un croisement entre un génotype non résistant et un génotype **Simplex** donne un génotype résistant (50 %) pour un génotype non résistant (50 %).

*	1 Rr	1 rr
1 rr	1 Rrrr	1 rrrr

La descendance d'un croisement entre un génotype non résistant et un génotype **Duplex** donne cinq génotypes résistants (83,3 %) pour un génotype non résistant (16,6 %).

*	1 RR	4 Rr	1 rr
1 rr	1 RRrr	4 Rrrr	1 rrrr

La descendance d'un croisement entre un génotype non résistant et un génotype **Triplex** donne 100 % de génotypes résistants.

*	1 RR	1 Rr
1 rr	1 RRrr	1 Rrrr

OUTIL D'OPTIMISATION DE LA SÉLECTION DANS LA RECHERCHE CHEZ LA POMME DE TERRE DE RÉSISTANCE AUX NEMATODES A KYSTE *Globodera pallida* et *Globodera rostochiensis*

Claudia Rouaux¹ et Didier Fouville¹

La sélection variétale de pommes de terre résistant à *Globodera* sp, parasites de quarantaine, consiste à rechercher des gènes de résistance et à les transférer dans du matériel tétraploïde d'intérêt agronomique. Une résistance polygénique a été trouvée chez *Solanum vernei* (espèce diploïde) dont l'hérédité est telle que la probabilité de détecter, par des tests individuels, des génotypes résistants issus de croisements est très faible. Le souci majeur d'un sélectionneur étant de disposer en un minimum de temps de génotypes résistants, nous avons développé un **test de descendance préalable au test individuel**, qui a offert une aide intéressante pour la sélection de résistances polygéniques.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Le matériel

- Pots 9 X 9 cm
- Loupe binoculaire
- Agrafes universelles galvanisées VR16 (préparation de l'inoculum)
- Homogénéisateur TURBULA (voir photo ci-contre)
- Filtres en disque diamètre 10 cm (extraction acétone) et diamètre 19 cm (extraction Elutriateur)



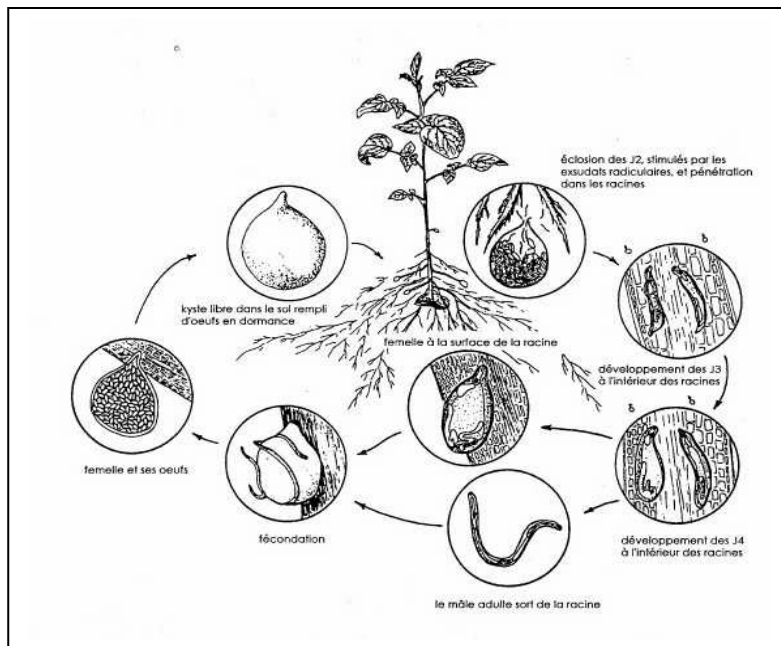
1.2. Le matériel végétal

Les plants sont obtenus soit par tubercules issus de graines pour le test de descendance, soit par tubercules reproduits par voie végétative pour les tests individuels. La variété Désirée est utilisée comme témoin sensible dans les deux cas.

1.3. L'inoculum

Ces nématodes sont des parasites telluriques enkystés contenant 200 à 1000 œufs. L'éclosion des œufs contenus dans les kystes est favorisée par l'humidité et par des exsudats radiculaires de pomme de terre. La jeune larve éclore perfore l'épiderme des racelles de la plante-hôte, pénètre dans les tissus, progresse à travers les cellules et induit la formation d'une cellule nourricière : un syncytium. Au bout de vingt jours, les mâles sortent des racines tandis que les femelles grossissent et deviennent piriformes. Ceci induit l'éclatement de l'épiderme mais les femelles restent fixées à l'hôte par la tête. La reproduction sexuée entraîne le développement des œufs dans la femelle qui se transforme en kyste et meurt. Ces kystes se détachent alors et restent dans le sol. Leur durée de vie est supérieure à cinq années.

¹ UMR Bio3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327 Le Rheu Cedex 35653
rouaux@rennes.inra.fr - fouville@rennes.inra.fr



La population *G. pallida* Chavornay utilisée pour ces tests est originaire de suisse. Le test individuel peut également être réalisé avec une autre espèce : *G. rostochiensis*, population Ecosse et dont la source de résistance chez la pomme de terre est monogénique

Cycle du nématode

1.4. Préparation de l'inoculum et mise en culture

Dix kystes par plante à tester sont regroupés dans un sachet fabriqué avec un tulle d'un maillage de 250 µm et fermé avec une agrafe à grillage de clôture. L'ensemble des sachets pour la mise en place d'un test est réhydraté dans un récipient d'eau du robinet pendant trois jours à température ambiante avant d'être déposé dans un pot à demi rempli d'un mélange 2/1 de terre végétale tamisée (tamis de 4 mm de maillage) et de sable de rivière. Le tubercule est posé sur le sachet de kystes et l'ensemble est recouvert du même mélange de substrat. Un arrosage est effectué à la base des pots. Cette réhydratation par capillarité évite ainsi au sol de se compacter lors des trois mois de culture. Les conditions de culture en serre S2 sont de 20°C et 16 h de photopériode.

1.5. Descriptif des tests de résistance et extraction des kystes néoformés

1.5.a. Les tests de descendance

Quarante tubercules issus d'un même croisement végétal sont plantés isolément en pot et inoculés. Après 3 mois de culture, arrêt d'irrigation et sénescence des plantes, le substrat sec contenu dans les pots est regroupé en 4 lots de 10 plantes. Une première homogénéisation par tamisage avec un tamis métallique de 2 mm de maillage est effectuée pour ces 4 lots en prenant la précaution d'éliminer les tubercules néoformés et racines qui pourraient gêner l'homogénéisation. Cet ensemble est pesé avant de subir pendant 7 minutes une deuxième homogénéisation grâce à un appareil TURBULA. Pour finir, un dixième du poids de substrat de chaque lot est pesé et les kystes sont dénombrés par comptage sous la loupe binoculaire.

1.5.b. Les tests individuels

Quatre tubercules issus d'un génotype identifié comme résistant à l'issue du test de descendance sont plantés isolément en pot et infestés. Après culture, les kystes de chaque pot seront dénombrés.

1.5.c. L'extraction du substrat à l'élutriateur de Kort (photo ci-contre)

Afin d'extraire les kystes du substrat, on réalise une extraction à l'aide d'un élutriateur de Kort après réhydratation du sol. Le substrat est entraîné dans l'appareil à travers un tamis de 2mm par aspersion d'un jet d'eau. Un courant ascendant permet de faire remonter les kystes et un peu de matière organique sur un tamis de 250µm. Le refus de tamis est alors récupéré dans un filtre à papier puis mis à sécher.



1.5.d. L'extraction du refus de tamis à l'acétone

Une différence de densité dans l'acétone entre les kystes et la matière organique d'extrait sec de substrat permet de regrouper dans le haut du col d'une fiole jaugée de 200 ml, les kystes avec un minimum de matière organique. Il suffit ensuite de verser le haut du contenu de cette fiole dans un cône à filtre en papier pour récupérer les kystes et les dénombrer sous la loupe binoculaire.

2. RESULTATS ET ANALYSES STATISTIQUES

Un génotype est considéré comme résistant lorsqu'il ne permet pas l'accomplissement du cycle du nématode et donc sa multiplication

2.1. Les tests de descendance

Avec les comptages effectués sur les quatre lots issus d'un même croisement, une moyenne géométrique (Mg) de kystes formés et un écart-type sont calculés pour hiérarchiser, en fonction de leur degré de résistance, les différents croisements testés.

2.2. Les tests individuels

Avec les comptages des quatre répétitions du génotype à testé, un % de résistance est établi selon la formule suivante par rapport à un témoin sensible Désirée:

$$100 (1 - (\text{Mg du génotype testé} / \text{Mg du témoin Désirée}))$$

L'élaboration d'une note officielle est obtenue selon la formule suivante :

$$9 - 7 (\text{Log}(\text{Mg du génotype} + 1) / \text{Log}(\text{Mg Désirée} + 1))$$

code	test de descendance						test individuel	
	Nombre de kystes par lot				Mg	écart type	% de génotypes gardés	Mg
N°1	45	83	29	53	49	23	64	11
N°2	20	82	95		54	40	72	35
N°3	134	77	120	71	97	31	55	41
N°4	89	164	121	92	113	35	24	49
N°5	161	81	109	293	143	94	22	50

Tableau 1 : Recherche de géniteurs possédant une résistance de type polygénique à *G. pallida*

Test individuel							
Code	Nombre de kystes par tubercule				Mg	% de résistance	Note*
N°1	0	0	0	2	0	100	9
N°2	320	235	412	488	350,7	42,1	2,6
N°3	0	0	1	2	0	100	9
N°4	285	308	292	400	318,2	47,5	2,7
Désirée	433	530	720	820	606,7	0	2

*indice européen échelle de 2 à 9 (2 : témoin sensible - 9 : résistant)

Tableau 2 : Recherche de géniteurs possédant une résistance de type monogénique à *G. rostochiensis*. Le test de descendance ne se justifie pas ici car la résistance étant de nature monogénique, elle ne peut être que totalement ou pas du tout transmise.
Ce tableau fait apparaître 2 géniteurs résistants : les N°1 et N°3.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces deux tests répondent assez bien aux exigences présentées par les sélectionneurs. L'ensemble des travaux d'extraction et de dénombrement nécessite environ 4h00 de travail en moyenne pour un croisement en test de descendance (40 géotypes) et 2h30 pour les quatre répétitions d'un test individuel. Un nombre important de géotypes non résistants seront ainsi éliminés à l'issue du premier test.

On dispose donc pour *G. pallida* avec le test de descendance d'un outil rapide permettant de faire un choix entre plusieurs croisements concernant la meilleure transmission des formes de résistance polygéniques existantes. On dispose pour *G. pallida* et *G. rostochiensis* d'un test individuel européen permettant la validation des différentes sources de résistance. Des sélectionneurs privés français disposent aujourd'hui de matériel sélectionné par ces deux méthodes. Ces deux tests, toujours d'actualité, sont encore utilisés, et ce depuis plusieurs années dans le cadre d'un contrat entre notre unité et un sélectionneur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mugniéry D, Balandras C (1986) Test de résistance de descendance de pomme de terre à *Globodera rostochiensis* Woll. *Potato Reseach* 29, 131-140.

TESTS BIOLOGIQUES POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE RESISTANT OU SENSIBLE DE PLANTES AUX NEMATODES A GALLES DES RACINES

Ariane Fazari, Lucette Pijarowski, Caroline Djian-Caporalino¹

Les nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne*, endoparasites sédentaires appelés nématodes à galles des racines, parasitent plus de 2000 espèces végétales et constituent un grave problème phytosanitaire mondialement répandu. L'interdiction programmée de la plupart des nématicides fait de la résistance des plantes une des meilleures stratégies de phytoprotection, économique et non polluante, pour les années à venir. Les programmes de sélection classique nécessitent le développement de techniques de détection fiables et efficaces. Deux tests biologiques de résistance sont ainsi utilisés en routine. Ils sont utilisables pour toutes espèces de plantes.

1. MATERIEL ET METHODES

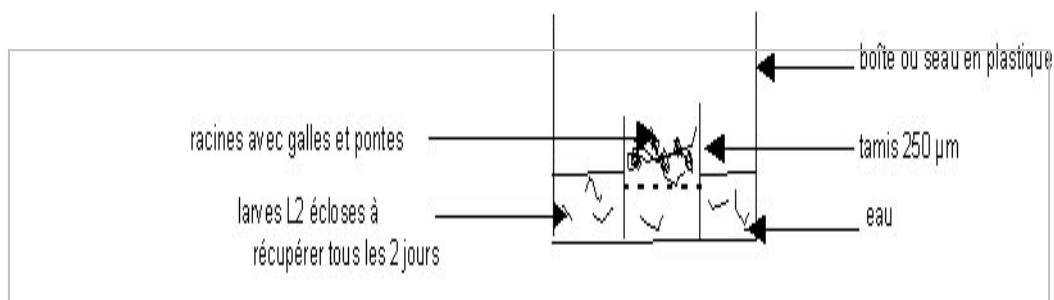
1.1. Inoculation des plantes pour déterminer leur caractère sensible ou résistant aux nématodes à galles des racines

1.1.a. Préparation du matériel végétal

- Facultatif : Mise à germination des graines de plantes à tester (trempage 24h dans de l'eau stérile à température ambiante)
- Semis des graines dans des pots contenant $\frac{3}{4}$ de sol sableux, $\frac{1}{4}$ de terreau en surface. Maintien en phytotron à 23-25°C. Fertilisation le dernier mois avant analyse, arrêt 1 semaine avant inoculation. Irrigation modérée tous les jours sauf 1 jour avant et 1 jour après infestation
- Inoculation au stade 4 à 6 feuilles vraies (environ 1 à 2 mois après semis selon la plante).

1.1.b. Préparation de l'inoculum

- A partir de plants infestés (présence de galles racinaires et pontes visibles au niveau des galles), rinçage délicat des racines par trempage successifs dans l'eau (pour éliminer la terre).
- Découpage des racines en morceaux sur un tamis de mailles 250 µm selon schéma ci-après et maintien des seaux sous brumisation constante pendant 10 jours à température ambiante pour faire éclore les larves (dans ce cas utiliser un seau ou une boîte percée d'un trou au dessus du tamis) ou changer l'eau des seaux tous les jours:



- Récupération des larves L2 (de 2nd stade, seul stade libre et infestant) écloses tous les jours ou tous les 2 jours en les concentrant sur un tamis de 10 µm pour en avoir environ 100 dans 50 µl pour les tests biologiques. Conserver la solution de nématodes à 4°C et l'utiliser pour les

¹ INRA, UMR IPMSV 1064, 400 Route des Chappes, 06903 Sophia Antipolis

tests biologiques dans les 3 jours qui suivent (sinon les larves épuisent leurs réserves et sont inutilisables).

1.1.c. Inoculation et incubation

- Grattage délicat du sol autour des plantules à inoculer. Infestation des plants à tester avec une suspension de 500 à 3000 larves L2 de nématodes dans 2 ml d'eau maximum. Prévoir au moins 10 répétitions pour chaque lignée de plante. Recouvrir avec un peu de sol pour éviter tout dessèchement. Ne pas arroser pendant 24 heures.

- Par la suite, arrosage délicat et régulier.

- Prévoir un témoin d'infestation : tomate sensible par exemple.

1.1.d. Système de notation : Après 6 semaines à 23-25°C, détermination de l'indice de galles selon le protocole 1.2.: indique le taux de développement des galles (donc du site nourricier), ou coloration des pontes à l'éosine selon le protocole 1.3. et comptage : indique le taux de pénétration et le taux de fécondité des femelles (test de résistance le plus fiable).

1.2. Détermination de l'indice de galles provoquées par *Meloidogyne* spp.

1.2a. Préparation du matériel végétal

- Après 6 semaines à 23-25°C, dépotage des plants à analyser

- Lavage soigneux des racines à l'eau courante.

- Observation du chevelu racinaire et détermination de l'indice de galles, de 0 à 10

1.2.b. Système de notation (selon Netscher et Sikora, 1990)

0	système racinaire complet et sain ; pas d'infestation	1	très peu de galles de petite taille
2	petites galles plus facilement détectables	3	nombreuses petites galles ; chevelu racinaire encore complet
4	nombreuses petites galles ; quelques grosses galles ; système racinaire fonctionnant encore	5	25% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
6	50% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus	7	75% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
8	quasiment plus de racelles ; chapelets de grosses galles sur les racines principales ; la plante ne peut plus se nourrir	9	système racinaire réduit et rempli de grosses galles empêchant la plante de se nourrir
10	plante et racines mortes		

1.2.c. Interprétation des résultats (photo ci-dessous)

- Indice 0 : plante totalement résistante

- Indice 1 : plante partiellement résistante

- Indices 2 à 5 : plantes sensibles

- Indices 6 à 10 : plantes très sensibles

Exemple :

Indices :

0

3

7



1.3. Technique de coloration des masses d'œufs de *Meloidogyne* spp.

1.3.a. Préparation du matériel végétal

- Après 6 semaines à 23-25°C, dépotage des plants à analyser
- Lavage soigneux des racines par trempage à l'eau courante.
- Préparation d'une solution d'éosine à 9 g pour 2 litre d'eau courante (conservation à température ambiante)
- Immersion des racines dans la solution d'éosine pendant 20 minutes
- Rinçage des racines à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Comptage des masses d'œufs qui apparaissent comme des têtes d'épingle rouge.

Remarques : les racines colorées peuvent se conserver dans des sacs plastiques au congélateur à -20°C ou au réfrigérateur à 4°C en les humidifiant légèrement (Sopalin humide).

1.3.b. Interprétation des résultats

- De 0 à 5 masses d'œufs : plante résistante.
- De 5 à 10 masses d'œufs : plantes partiellement résistante.
- De 10 à 50 masses d'œufs : plante sensible.
- Plus de 50 masses d'œufs : plante très sensible

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Exemple: **Spectre de résistance de diverses lignées de piment (*Capsicum annum* L.) aux nématodes à galles** (Djian-Caporalino *et al*, 1999).

Lignée de piment	M. arenaria <i>Marmande</i>	M. arenaria St. Benoit	M. javanica Avignon.	M. hapla England	M. hapla Canada	M. hapla La Mole	M. incognita Morelos	M. incognita Calissane Fr.		
	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C	32°C**	42°C**
DLL	66.4 cde	87.2 c	258.4 a	nt*	nt*	nt*	160.5 b	111.9 bc	159.6 b	44.7 de
YW	0 f	0 f	0 f	0 f	15.7 ef	7.2 f	80.4 cd	76.8 cd	51.6 de	43.3 de
SC81	0 f	0 f	0 f	nt*	nt*	nt*	63.3 de	52.9 de	50.0 de	0 f
H3	0 f	0 f	0 f	0 f	17.8 ef	7.9 f	66.0 de	49.0 de	2.2 f	0 f
PM687	0 f	0 f	0 f	0 f	28.2 e	0 f	0 f	0 f	0 f	0 f
PM217	0 f	0 f	0 f	0 f	75.9 de	0 f g	0.2 f	0.1 f	0 f	0 f
CM334	0 f	0 f	0 f	0 f	138.2 b	98.0 bc	0.1 f	0 f	0 f	0 f
YNR	0 f	0 f	0 f	nt*	nt*	nt*	0 f	0 f	0 f	0 f
Tomates témoins										
Pierre	35.1 ef	142.6 b	58.2 de	123.2 b	130.7 ab	57.0 cde	68.9 cde	189.6 b	205.0 b	46.7 de
Saint										
Piersol (<i>Mi</i>)	0.2 f	0 f	6.2 f	138.8 bcd	237.0 ab	169.5 b	1.2 f	0.5 f	88.2 bc	morts

Les nombres suivis de la même lettre ne sont pas statistiquement différents ($P \leq 0.05$)

* non testé, ** plants maintenus à 32°C et traités à 42°C 5-6h par jour

Tableau 1 : Nombre moyen de masses d'œufs sur des lignées de piments pour 8 populations de nématodes à galles (10 répétitions)

Le cultivar DLL est hautement sensible à toutes les espèces de *Meloidogyne* testées ; les lignées YW, SC81, H3 sont sensibles à quelques espèces et résistantes à d'autres ; les lignées PM687, PM217, CM334 YNR sont résistantes à toutes les espèces sauf quelques populations de *M. hapla*.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces tests utilisés en routine au laboratoire de l'INRA de Sophia Antipolis pour plusieurs espèces de plantes ont pour objectif la recherche de sources de résistance aux nématodes à galles et l'établissement des spectres de résistance vis-à-vis des espèces les plus répandues. L'évaluation de la stabilité de la résistance à haute température et l'effet de la pression d'inoculum sont également étudiés. Ces tests permettent de choisir des lignées particulièrement résistantes pour étudier le déterminisme génétique des gènes de résistance aux nématodes et réaliser leur marquage moléculaire. Des gènes ainsi sélectionnés sont en cours d'introgession dans des variétés cultivées par des sélectionneurs de semences qui utilisent les tests décrits pour sélectionner les plants résistants après chaque back-cross.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Djian-Caporalino C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubeze, A. Palloix, A. Dalmaso, P. Abad 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) *Theor Appl Genet* 99 (3/4) : 496-502
- Netscher, C. and Sikora, R. A. 1990. Nematode parasites of vegetables. *In* Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. *Edited by* M. Luc, R. A. Sikora and J. Bridge. CAB International, Wellingford, U.K. pp.237-284.

MARQUEURS MOLECULAIRES POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE RESISTANT OU SENSIBLE DE PIMENTS/POIVRONS AUX NEMATODES A GALLES DES RACINES

*Ariane Fazari, Lucette Pijarowski, Caroline Djian-Caporalino*¹

Le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires liés aux gènes cibles deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection assistée par marqueurs (MAS) pour les résistances aux maladies et aux ravageurs. Ils le sont d'autant plus que les tests de résistance sont lourds et longs, comme c'est le cas pour les nématodes, car ils peuvent être mis en évidence avant même que le caractère considéré ne soit exprimé et en l'absence de pathogène.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Marqueur SCAR (sequence characterized amplified region)

1.1.a. Objectif : mise en évidence d'un polymorphisme de séquence dû à des insertions ou délétions dans la séquence (différence de site d'hybridation d'une amorce spécifique). Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification de l'ADN par PCR et observation du polymorphisme sur gel d'agarose.

1.1.b. Hygiène et Sécurité : le BET (Bromure d'éthidium) utilisé pour visualiser sur gel sous UV les fragments d'ADN a un effet génotoxique, cancérigène et tératogène. Manipulation avec des gants. Stockage des déchets dans des containers spéciaux. Evacuation des déchets par une société spécialisée.

1.1.c. Matériels et réactifs :

Thermocycleur et cuve à électrophorèse

Tampon TBE 0,5 X

Gel d'agarose (Eurogentec) à 1,5% dans tampon TBE 0,5X (fragments d'ADN > 200 pb)

Gel d'agarose (Eurogentec) Small fragment à 2% dans tampon TBE 0,5X (fragments d'ADN < 200 pb)

Mix pour la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) :

Tampon Taq 1X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl)

dNTP Invitrogen (2,5 mM)

MgCl₂ (50 mM)

Amorce rev (30 ng/μl)

Amorce for (30 ng/μl)

Taq invitrogen (0.2 U)

H₂O stérile qsp 20 μl

Bleu 10X :

Bleu de bromophenol (Fluka) : 0,25%

Saccharose (Prolabo) : 40%

H₂O stérile qsp 10ml

Marqueur de poids moléculaire 1 Kb DNA Ladder (Life Technologies)

¹ INRA, UMR IPMSV 1064, 400 Route des Chappes, 06903 Sophia Antipolis

1.1.d. Méthode :

- Extraction d'ADN à partir de feuilles selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986) ou d'Edwards *et al.* (1991)

- 18,75 µl de mix PCR + 1,25 µl ADN à environ 80ng/µl

- Programme d'amplification PCR:

94°C	3 min
94°C	30 s
⊗	30 s
72°C	1 min
72°C	5 min
20°C	∞

} 35 fois ⊗ = température d'hybridation (en °C)

- Dépôts sur gel d'agarose: 20 µl de produit PCR + 1µl BSU (bleu 10X).

- Electrophorèse horizontale dans tampon TBE 0,5X ; migration à 100 Volts.

- Coloration : bain BET dans eau osmosée 30 minutes sous agitation.

- Rinçage du gel dans un bain d'eau osmosée 5 minutes sous agitation.

- Observation des fragments amplifiés sous UV.

- Notation de la présence ou de l'absence de bande différentielle chez les plantes sensibles ou résistantes.

1.2. Marqueur CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)

1.2.a. Objectif : Mise en évidence d'un polymorphisme de séquence dû à la présence/absence d'un site de restriction. Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification par PCR, digestion par une enzyme de restriction dont le site n'est présent que chez un type de plante, observation du polymorphisme sur gel d'agarose.

1.2.b. Méthode : Même protocole que précédemment mais digestion nécessaire par une enzyme de restriction après l'étape de PCR pour faire apparaître le polymorphisme sur gel d'agarose.

- Digestion de 10 µl de produit PCR avec : 1X final de tampon de l'enzyme (Roche), 1X de BSA (Bovine Serum Albumin) (Promega) et 1 unité d'enzyme de restriction (Roche). Volume final ajusté à 20 µl (avec de l'eau distillée stérile). Digestion au bain marie 4 heures à la température optimum de l'enzyme utilisée.

- Vérification de la présence de bande avant digestion chez toutes les plantes sensibles et résistantes et de 2 bandes de taille inférieure après digestion soit chez les plantes sensibles, soit chez les plantes résistantes.

1.3 Marqueur SSCP (single strand conformation polymorphism)

1.3.a. Objectif : Mise en évidence d'un polymorphisme de conformation de l'ADN dû à une ou quelques bases mutées. Après définition d'amorces spécifiques d'un fragment d'ADN polymorphe entre des plantes résistantes et sensibles, amplification par PCR : une bande de même taille est visible chez les plantes résistantes et sensibles sur gel d'agarose. Dénaturation de l'ADN pour obtenir des simples brins, observation du polymorphisme sur gel d'acrylamide ou de MDE après électrophorèse en condition de température froide et constante. Le MDE (« Mutation Detection Enhancement ») est un gel dont la matrice est voisine de celle du polyacrylamide. Il permet d'obtenir des résultats supérieurs (par rapport aux gels standards de polyacrylamide) car il est plus sensible aux différences de conformation de l'ADN.

1.3.b. Matériels et réactifs : Préparer un bain thermostaté (cryostat) à 4°C, 15 à 30 minutes avant le début de la migration afin de refroidir l'appareil.

Composition du gel MDE (BMA):

MDE 0.5X
TBE 0.5X
Temed 0.08%
Ammonium peroxodisulfate (APS) 0.16%
H₂O qsp 12 ml.

NB: Si les fragments n'apparaissent pas nettement en MDE 1X ou 0,5X, il est également possible d'ajouter au gel du glycérol (10% final) afin d'améliorer la résolution.

Révélation à l'argent: préparer les solutions fraîches de révélations pendant la *migration*.

éthanol 10%
acide nitrique 1%
nitrate d'argent 0.01 M (se conserve à + 4°C, à l'obscurité)
carbonate de sodium 0.28 M. Réaliser extemporanément le mélange suivant :
200 ml de carbonate de sodium + 100 µl de formaldéhyde
acide acétique 10%
solution d'éthanol 10% + acide acétique 7.5% + glycérol 1%

Tampon de charge:

Formamide 95% (Invitrogen)
Bleu de bromophénol 0.05%(Fluka)
Xylène cyanol 0.05%
NaOH (Prolabo) 1 mM
H₂O qsp 5 ml.

1.3.c. Hygiène et Sécurité

- Port de gants et récupération des déchets de MDE ou acrylamide (cancérogènes).
- Attention lors de la pesée du nitrate d'argent car il est corrosif et toxique par ingestion et par contact avec la peau.
- Formaldéhyde à manipuler sous sorbonne car toxique par inhalation et par contact avec la peau.
- Attention au Temed et APS inflammables et irritants pour la peau et le système respiratoire.
- Récupération de tous ces déchets.

1.3.d. Méthode

Préparation du gel

- Nettoyage des plaques à l'alcool afin d'éliminer toutes traces de gel sec ou de résidus de savons. Traitement d'une des plaques avec du RainX (solution siliconée) afin que le gel n'adhère pas sur cette plaque.
- Installation des espaceurs (CBS Scientific 0.35 mm) entre les deux plaques et assemblage des plaques avec du scotch ou un boudin de coulage (CBS Scientific).
- Coulage du gel à la seringue ou à la P5000 du peigne: dents dirigées vers le haut pour tracer le front du gel.
- Polymérisation à température ambiante (30 minutes minimum).

Electrophorèse

- Enlèvement et retournement du peigne (20 puits CBS Scientific 1,5 mm) en prenant soin de ne pas trop l'enfoncer afin que les puits ne communiquent pas entre eux et installation du gel dans l'appareil à SSCP (CBS Scientific).
- Préparation du tampon TBE 0,5X à partir du tampon TBE 10X (Invitrogen).
- (Les produits PCR ont préalablement été déposés sur agarose 2% afin de vérifier la présence d'une bande unique à la taille attendue)
- Ajout de 1 volume de tampon de charge aux 10 µl de produits PCR.

- Dénaturation à 95°C pendant 4 à 5 min, puis refroidissement immédiat sur glace.
- Dépôt de 6 µl de chaque échantillon.
- Migration à 5W, 3000V, 40 mA à 4° C pendant au moins 2h.

Révélation par coloration au nitrate d'argent

- Se placer sous une sorbonne et utiliser une plaque agitante
- Découpage de la petite plaque, le gel restant collé sur la grande plaque
- Avec les doigts gantés et humidifiés, disposition du gel dans un bac pour les différents bains.
- **Fixation** : éthanol 10% pendant 5 minutes minimum.
- **Oxydation**: acide nitrique 1% pendant 3 minutes.
- **Rinçage** : dans de l'eau osmosée, 2 fois quelques secondes.
- **Coloration à l'argent** : nitrate d'argent 0.01 M pendant 20 minutes, sous agitation et en recouvrant le bac de papier aluminium.
- **Rinçage** dans de l'eau osmosée, 2 fois quelques secondes.
- **Révélation** : mettre une première fois du révélateur (= mélange carbonate de sodium / formaldéhyde) ; le vider dès la formation d'un précipité argent et remettre du mélange, surveiller cette étape jusqu'à l'obtention de la révélation souhaitée.
- **Stopper** la réaction en versant de l'acide acétique 10%, une première fois pendant quelques secondes, vider puis en remettre pendant au moins 15 minutes (le faire en 2 fois évite la formation de trop de bulles dans le gel)
- **Incubation** du gel au moins 15 minutes dans un bain: d'éthanol 10% + acide acétique 7.5% et glycérol 1%.
- Scan du gel et enregistrement sur support informatique pour analyse.
- Conservation du gel par transfert sur papier Whatman. Dépôt d'un film de protection type « saran » et séchage sous vide à 80°C pendant 1 heure.

Notation des bandes polymorphes entre les plantes sensibles et résistantes

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Exemple de marqueur SCAR lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez le piment

Extraction d'ADN selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986).

Couple d'amorces spécifiques du gène *Me1* chez le piment selon Djian-Caporalino et al. (non publié):

Amorce Scar CD (for) : 5'- GAA GCT TAT GTG GTA (A ou C)CC- 3'

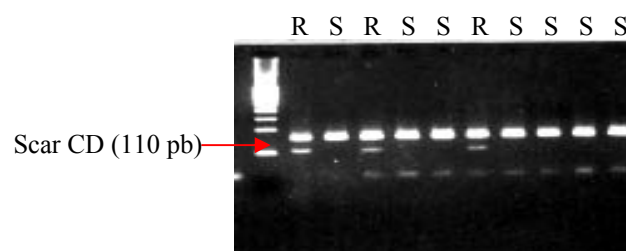
Amorce Scar CD (rev) : 5'- GCA AAG TAA TTA TAT GCA AGA GT- 3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 49°C

Témoins : ADN piment *Capsicum annuum* cv. DLL (sensible), ADN piment *C. annuum* lignée PM217 (gène *Me1*)

Dépôts sur agarose Small Fragments (le polymorphisme n'apparaît pas sur agarose normal).

Deux bandes observées, l'une non polymorphe à 160 pb, l'autre à 110 pb présente chez les plantes résistantes (R).



2.2. Exemple de marqueur CAPS lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez la tomate

Extraction d'ADN selon la méthode de Edwards *et al.* (1991).

Couple d'amorces spécifique du gène *Mi* chez la tomate selon Williamson *et al.* (1994) :

Amorce Rex-F1 (forward): 5'-TCG GAG CCT TGG TCT GAA TT-3'

Amorce Rex-R2 (reverse): 5'-GCC AGA GAT GAT TCG TGA GA-3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 55°C

Témoins : ADN tomate *Lycopersicon esculentum* var. Saint-Pierre (sensible), ADN tomate *L. esculentum* var. Piersol (gène *Mi*)

Dépôts sur agarose à 1,5%.

Une bande observée à 750 pb avant digestion chez les plantes sensibles et résistantes ; après digestion par la *TaqI*, deux bandes observées à 570 pb et 160 pb chez les plantes résistantes seulement.

2.3. Exemple de marqueur SSCP lié à un gène conférant la résistance à 3 espèces majeures de *Meloidogyne* chez la tomate

Extraction d'ADN selon la méthode de Bernatzky and Tanksley (1986).

Couple d'amorces spécifiques du gène *Me3* chez le piment selon Djian-Caporalino *et al.* (non publié):

Amorce SSCP HM58 (for) : 5' - GCA TGT CTT TCT TTA CC - 3'

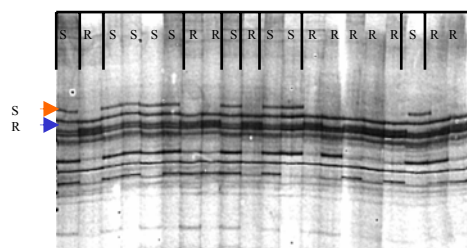
Amorce SSCP HM58 (rev) : 5' - CGG TGG CTG TTA CGC TC - 3'

Températures d'hybridation : ⊗ = 48°C

Témoins : ADN piment *Capsicum annuum* cv. DLL (sensible), ADN piment *C. annuum* lignée PM687(gène *Me3*)

Dépôts sur acrylamide ou MDE

Deux bandes observées (marqueur codominant), l'une liée à l'allèle sensible (S), l'autre liée à l'allèle résistant (R).



3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces marqueurs fiables et reproductibles, utilisés au laboratoire de l'INRA de Sophia Antipolis, ont pour objectifs la caractérisation de gènes de résistance aux nématodes à galles chez le piment, leur cartographie sur les cartes génétiques, l'étude des homologies avec d'autres gènes de résistance aux nématodes chez d'autres *Solanaceae*, leur utilisation dans des programmes de sélection assistée. Ces marqueurs sont utiles pour les sélectionneurs de semences pour suivre l'introgession des gènes dans des variétés cultivées et sélectionner les plants résistants après chaque back-cross.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Genetics of actin related sequences in tomato. *Theor Appl Genet* 72: 314-321

Edwards K, Johstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR Analysis. *Nucleic acids Res* 19: 1349

Williamson VM, Ho JY, Wu FF, Miller N, Kaloshian I (1994) A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor Appl Genet* 87(7): 757-763