

CHAPITRE III

RESISTANCE DES PLANTES AUX CHAMPIGNONS

TEST DE RESISTANCE DU TOURNESOL AU PHOMOPSIS

Dépôt d'un explant mycélien de *Diaporthe helianthi* sur feuille

Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹, Sylvie Roche¹

Apparu en 1981 en ex-Yougoslavie, *Diaporthe helianthi*, agent du *Phomopsis*, peut provoquer des dégâts considérables sur tournesol. En condition favorable, les attaques peuvent détruire totalement la culture. Le Sud-ouest de la France demeure la région la plus favorable à son développement. Ce test, développé en 1987, utilisé en sélection, permet d'évaluer de manière fiable la résistance du tournesol à *D. helianthi*. Il reproduit à l'aide de mycélium, la contamination naturelle par spore sur feuille. Effectué précocement, il révélera le comportement du matériel végétal à la progression du champignon. Les symptômes apparaissent tout d'abord sur feuilles, puis sur tige et stoppent totalement l'alimentation générale de la plante.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Matériel

1.1.a. Préparation du matériel fongique en laboratoire

L'unité dispose d'une collection de 250 isolats *D. helianthi*. Cette mycothèque est conservée à -80 °C. Chaque isolat est stocké sous forme de carrés gélosés avec le mycélium baignant dans un cryoprotecteur* dans des cryotubes de 2 ml. Deux mois avant les tests au champ, cinq isolats sont choisis parmi les plus agressifs.

Ces isolats sont remis en culture en boîte de Pétri de 90 mm sur milieu gélosé Agar (15g/l) avec malt (1%).

Après sept jours de croissance dans une étuve à 22 °C, les mycéliums obtenus de *D. helianthi* suffisamment développés sont utilisés pour infecter un génotype de tournesol sensible. Cette première infection permet de contrôler leur agressivité et de retenir la meilleure souche pour la saison.

1.1.b. Préparation du matériel végétal

Pour les sorties de cryoconservation une vingtaine de plantes suffit. Quarante jours avant décongélation des souches, des semis de tournesol sont effectués en serre. Ils sont réalisés en godet. Dès l'apparition de la première paire de feuille, les tournesols sont repiqués en pots de 5 litres. L'arrosage est assuré par un système de goutte à goutte avec solution nutritive (Hydrokani C2).

Pour les tests en plein champ, les génotypes en cours de sélection sont testés sur deux lignes de 10 plantes (cf. tableau). Deux témoins, 74F sensible et AGRISOL très peu sensible, sont semés en plusieurs dates. Ces derniers valident les infections et permettent d'effectuer le rapport génotype/moyenne des témoins.

<p>*Cryoprotecteur <u>Glycérol</u> (RP normapur bidistillé 99,5% min 15g/l) <u>Sel de sodium</u> (MOPS-Na2) à 20mM/l pH 7 avant stérilisation 20min à 120°C.</p>

¹ UMRE INRA ASP - Université Blaise Pascal 234 Avenue du Brézat 63039 Clermont-Ferrand cedex 02

1.2. Méthodes

1.2.a. Description du test

Ce test a pour principe de suivre la rapidité d'évolution de la nécrose le long de la nervure principale de la feuille, à partir du dépôt d'un explant mycélien à l'extrémité du limbe. Le tournesol doit être au stade « bourgeon étoilé » pour effectuer l'infection. Pour chaque série de test les lignes sont préalablement repérées à l'aide d'étiquettes de couleur. Il faut choisir les feuilles adultes les plus jeunes. En effet des feuilles trop jeunes se développent encore et rendent la lecture difficile. Les feuilles âgées limitent la réussite de l'infection. L'explant mycélien de 6 mm de diamètre, est prélevé sur la zone de croissance 2/3 mycélium 1/3 gélose dans la boîte de Pétri (photo 1). Il est déposé à l'extrémité de la nervure principale sur la face supérieure de la feuille (photo 2), de manière à ce que le mycélium soit en contact direct avec le limbe. L'explant est ensuite couvert d'un papier aluminium¹ qui permet un maintien optimum limbe/mycélium ainsi que des conditions favorables au développement du bio agresseur. L'ensemble est fixé par 2 agrafes de part et d'autre de l'implant, pour éviter la perte de l'explant.

Pour optimiser la réalisation de ce test, l'idéal est de travailler par équipe de 3 personnes. La répartition du travail s'effectue de la manière suivante.

- une personne dépose l'explant mycélien, préalablement découpé, au bout de la feuille
- deux autres de part et d'autre de la plante, choisissent les feuilles, réceptionnent l'explant, plient et agrafent le papier aluminium.



Photo 1 : *Explants – scalpel – emporte pièce*



Photo 2 : *Dépôt d'explant*

1.2.b. Mise en place du test en plein champ

Ce test n'est réalisable en plein champ que si l'on dispose d'une irrigation en couverture totale. Il faut apporter dès la réalisation du test 2.5 mm d'eau 3 fois par jour. L'eau ainsi apportée permet d'avoir sous le couvert végétal une humidité élevée. Ces conditions facilitent un excellent développement du pathogène.

¹ La marque ALBAL nous a donné les meilleurs résultats, elle s'oxyde moins rapidement que les autres.

1.2.c. Lecture du test

Que ce soit en sortie de mycothèque ou lors du test en plein champ la notation demeure identique. Selon les conditions météorologiques la lecture s'effectue entre 10 et 20 jours après infection. Celle-ci est réalisée dès que les témoins très sensibles montrent des longueurs de nécroses d'une moyenne de 10 cm.

Comme pour l'infection il faut une équipe de trois personnes pour réaliser la lecture.

Pendant que l'une note les deux autres cherchent les deux feuilles infectées et mesurent les nécroses. Chacun des notateurs est muni d'une règle plate et mesure la longueur de la nécrose sur la face inférieure de la feuille. Les nécroses dues à *D. Helianthi* ont la particularité d'attaquer plus rapidement la nervure principale avant de détruire le limbe (photo 3). Il faut impérativement repérer au delà du limbe détruit, la dépression nécrotique de la nervure atteinte. Placer le 0 de la règle sur la pointe de la feuille et noter la longueur totale de la nécrose (photo 4).



Photo 3 : Nécrose et papier d'aluminium

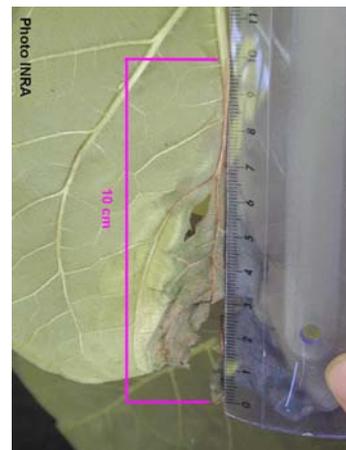


Photo 4 : Mesure nécrose face inférieure

2. RESULTATS

Comme il s'agit d'une résistance horizontale, polygénique et partielle, aucune variété ne possède une résistance absolue. Le tableau de notation (ci-dessous) rassemble tous les éléments nécessaires du jugement variétal pour sélectionner le matériel ayant un bon comportement.

Toutes les plantes ayant une nécrose supérieure à la moyenne des témoins ne sont pas conservées (destruction du bourgeon terminal) par exemple n°2, 3, 4, 5.... Seules les plantes dont la nécrose est significativement inférieure à la moyenne des témoins peuvent être conservées : par exemple les plantes n° 1, 9, 10... D'autres critères interviendront pour déterminer la plante à poursuivre en sélection : résistance au *Sclerotinia sclerotiorum*, au mildiou, teneur en huile (35% mini), taille, productivité, aptitude à la combinaison ...

Code génotype (étiquette)	2 PH 15
Décodage matériel	(PF63xSR1)
Date d'infection	15-juin-02
Date notation	29-juin-02
Couleur étiquette	Bleu
Moyenne 74 F Très Sensible	10 cm
Moyenne AGRISOL Très Peu Sensible	4 cm
Moyenne des deux témoins	7 cm

n° plante	Feuille 1	Feuille 2	Moyenne	n° plante	Feuille 1	Feuille 2	Moyenne
1	4	2	3	11	8.5	9	8.75
2	11	6	8.5	12	7	8	7.5
3	9	11	10	13	7	9	8
4	9	9	9	14	Non infectée	9	9
5	9.5	10	9.75	15	4	4	4
6	5	5	5	16	8	8	8
7	8.5	8	8.25	17	9.5	8.5	9
8	12	10	11	18	2	2	2
9	3	2	2.5	19	6	9	7.5
10	3	3.5	3.25	20	6	6.5	6.25

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le test mycélium révèle un facteur de résistance généralement bien corrélé aux attaques semi naturelles réalisé à l'INRA de Toulouse où l'inoculum est endémique. Ce site a été retenu pour étudier le comportement du matériel pour l'aptitude à la combinaison. A la station de Clermont-Ferrand, le programme spécifique de sélection pour la résistance au *D. Helianthi* a du être abandonné conformément aux nouvelles orientations de l'INRA.

Un test réalisable à partir d'ascospores serait idéal. Malheureusement les productions d'ascospores en condition contrôlée au laboratoire ne sont pas maîtrisées. De nombreux points restent à explorer au niveau du déterminisme sexuel de *D. helianthi*.

La sélection vise à rassembler un maximum de gènes dans un même génotype. Le niveau de tolérance atteint en quelques années demeure encore aujourd'hui très satisfaisant. Les attaques catastrophiques des années 90 ne se sont plus reproduites. Les sélectionneurs et pathologistes ont mis au point rapidement du matériel végétal performant. Aujourd'hui les agriculteurs disposent de variétés de tournesol portant l'appellation officielle Très Peu Sensible (TPS).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Viguié A., (1999) Etude du pathosystème *Phomopsis helianthi*/*Diaporthe helianthi* Munt. – Cvet. – tournesol (*Helianthus annuus* L.).

Meliala C., (1995) Etude des relations hôte/parasite chez le couple tournesol/phomopsis.

TEST DE REISTANCE DU TOURNESOL A LA POURRITURE BLANCHE DU CAPITULE

Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹, Sylvie Roche¹

Cet outil développé à l'INRA de Clermont-Ferrand, depuis 1976 est utilisé dans le monde entier par l'ensemble de la profession. Ce test consiste à infester par pulvérisation d'une suspension d'ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum* la face fertile du capitule sous irrigation renforcée. Il reproduit à l'identique les attaques par spores de la face fertile du capitule lors de la floraison. Il s'inspire du cycle naturel du pathogène et reproduit la forme d'attaque la plus préjudiciable à la culture : la pourriture molle du capitule conduisant à la perte totale de la plante attaquée. Il permet de juger durablement de la résistance horizontale polygénique et partielle.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Matériel végétal

Outre le matériel en sélection, l'utilisation de deux témoins de référence est indispensable. Deux génotypes dont les comportements sont connus depuis de nombreuses années sont utilisés :

- SD est une lignée INRA mainteneur, mono capitulée au comportement partiellement résistant avec un délai de latence long malgré un taux d'attaque élevé.
- GU est une lignée INRA mainteneur, mono capitulé représentant l'archétype du sensible avec un délai de latence court et un taux d'attaque élevé.

La présence du témoin sensible permet de valider chaque infection. Le matériel en sélection sera jugé par rapport à la moyenne des deux témoins. Afin d'avoir pour chaque infection, une quantité suffisante de témoins nous réalisons des semis accélérés à l'aide de film de forçage de type P17, des semis à la même date que la pépinière et des semis décalés.

1.2. Matériel fongique

1.2.a. Production de l'inoculum.

La production d'ascospores est entièrement réalisée en laboratoire. Pour cela il faut récolter les sclérotés qui sont la forme de conservation caractéristique des *Sclerotinia sp.* Ils sont constitués d'un cortex brun noir entourant une médulla blanc rosé.

La germination sexuée (la carpogénèse) des sclérotés donne des germes (les stipes) qui portent des carpophores appelés apothécies (Photo 1). Ces carpophores portent des asques qui renferment 8 ascospores. La récolte des ascospores peut se faire de 2 manières différentes :

- Par récolte des apothécies mûres, qui une fois retournées sur boîtes de Pétri, crachent des nuages d'ascospores (Photo 2). Celles-ci adhèrent naturellement à la boîte à l'aide d'un mucilage. Après une dessiccation de 24 heures les boîtes sont conservées à -20°C et peuvent être utilisées durant dix années.
- Les sporées peuvent être également récoltées à l'aide d'un aspirateur muni d'un entonnoir de filtration analytique stérile Nalgene® 145. La membrane est en nitrocellulose seuil, 0,2 micron. Pour cela, quand les asques sont mûrs et que l'humidité relative des terrines baisse (le

¹ UMRE INRA ASP - Université Blaise Pascal 234 Avenue du Brézet 63039 Clermont-Ferrand cedex 02

matin entre 10 et 11 heures), il faut placer l'entonnoir au plus près des apothécies et aspirer les nuages. La conservation est identique à celle des boîtes de Pétri.

1.2.b. Préparation de l'inoculum

Avant de préparer l'inoculum, il faut réaliser un comptage des capitules fleuris. Il permet d'ajuster à la fois le volume d'eau total et de ne décongeler que l'inoculum nécessaire. La suspension de spores doit être préparée juste avant l'infection (2 heures au maximum) et maintenue au frais < 10°C. La récupération des ascospores varie selon la méthode de récolte :

- Sur les boîtes de Pétri, la récupération des spores est réalisée par simple grattage des amas d'ascospores suivi d'un court passage (10 secondes) aux ultrasons pour les séparer.
- Les filtres Millipore sont plongés dans un bain ultrasonique qui détache les spores adhérentes.

Un comptage est effectué au microscope à l'aide d'une cellule de Mallassez. La concentration de l'inoculum est ajustée à 5 spores par mm³.



Photo 1 : *Apothécies*



Photo 2 : *Sporées*



Photo 3 : *Inoculation stade F1*



Photo 4 : *Lecture*



Photo 5 : *Tâche de pourriture*

1.3 Méthode

1.3.a. Inoculation incubation

L'inoculation doit impérativement être réalisée à un stade morphologique précis F1 (Photo 3), c'est-à-dire début floraison (premier rang de fleurons avec étamines) à mi-floraison (fleurons épanouis sur la moitié du rayon). Selon les génotypes la floraison s'échelonne sur plus de 30 jours. Il faut un rythme de deux infections par semaine pour tester l'intégralité du matériel.

Nous apportons la suspension à l'aide d'un pulvérisateur manuel dont le débit est connu avec précision. Chaque capitule reçoit 5 cm³ de suspension soit 25 000 spores en 2 pulvérisations circulaires. Il est ensuite recouvert de son sac en papier sulfurisé attaché avec un lien. Le sac assure en plus de l'autofécondation, le maintient d'une hygrométrie favorable à la germination des spores. Une irrigation en couverture intégrale est indispensable pour apporter les conditions optimales au développement de la pourriture blanche. Nous apportons au minimum 20 mm par semaine ni la veille ni le lendemain d'une infection.

1.3.b. Lecture notation

Les premiers symptômes apparaissent en moyenne deux à trois semaines après l'infection (une semaine dans le cas de génotypes extrêmement sensibles et sous conditions climatiques favorables). L'observation s'effectue en appuyant avec les doigts sur le capitule à travers le sac (Photo 4). Ceci permet de détecter les symptômes de pourriture. Le sac est ouvert pour vérifier qu'il s'agit bien de *Sclerotinia sp.* (Photo 5). Nous en déduisons un délai de latence (temps écoulé entre l'infection et le symptôme) et un taux de réussite (nombre de plantes malades par rapport au nombre de plantes total).

2. RESULTATS

Code lignée expérimentale 3SC 227						Date	couleur	nombre
						178	noir	5
						182	bleu	15
Quantités	178	182	185	189	192	196	199	203
SD	45.97	47.00	39.09	42.76	42.68	41.33	34.25	39.67
GU	22.50	23.29	22.28	20.71	23.05	22.77	18.40	29.80
moyenne	34.24	35.15	30.69	31.74	32.87	32.05	26.33	34.74
N° Plante	Date d'infection en quantités	Date des symptômes en quantités	Délai de latence en jours	Indice	Taille	Poids	Huile	remarques
1	178	209	31	0.91	95			
2	182	223	41	1.17	100	6.1	45.3	
3	182	244	62	1.76	110	6	37.4	
4	182	212	30	0.85	100	8.6	49.5	
5	182	237	55	1.56	110	11.8	43.5	
6	182	244	62	1.76	115	12	42	
7	182	212	30	0.85	120	13.7	39.7	
8	182	244	62	1.76	110	9	45.1	
9	182	216	34	0.97	100	15.4	48.5	
10	182	sain			110	7.1	38.9	
11	182	216	34	0.97	110	7.2	38.3	
12	182	209	27	0.77	115			
13	182	216	34	0.97	115	10.5	42.9	
14	178	205	27	0.79	100			
15	182	244	62	1.76	115	9	44.4	
16	178	sain			105	8.1	39.4	
17	178	237	59	1.72	110	11.3	47.5	poursuivi
18	178	219	41	1.20	105	13.5	42.3	
19	182	244	62	1.76	110	4	36	
20	182	212	30	0.85	115	3		
Infectés		20						
Malades		18						
Taux d'attaque		90						

Tableau de résultats

2.1. Interprétation des résultats

Dans notre exemple dont les résultats figurent dans le tableau ci-dessus, nous testons la descendance d'une lignée F4 en cours de sélection généalogique. Nous remarquons que les infections ont eu lieu sur deux jours notés en quantième (178 = 27 juin 2003, 182 = 01 juillet 2003). Chaque descendance réagit différemment face au bio agresseur. Les dates de symptômes s'échelonnent du 24 juillet (205) au 1^{er} septembre (244).

Le délai de latence renseigne sur le temps écoulé entre l'infection et l'apparition du symptôme ex : Plante 17 (237-178 = 59 jours)

L'indice de latence correspond au rapport entre le délai du génotype et la moyenne des témoins de références. Exemple plante 17 (59/34.24 = 1.72)

Seul le matériel végétal dont l'indice est supérieur à 1.50 (cases grisées) peut être poursuivi en sélection. D'autres critères tels que la taille, la productivité (poids) et la teneur en huile (%), interviendront pour choisir le génotype définitif.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test ascospore est très bien corrélé avec les observations des attaques semi naturelles réalisées dans les essais multi locaux pour le CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection). Il est également employé en sélection par l'ensemble de la profession depuis 30 ans. Il est fiable quelles que soient les conditions météorologiques à condition d'avoir une irrigation en couverture intégrale. Il faut savoir, qu'aucun génotype ne montre de résistance absolue. En effet la résistance du tournesol vis-à-vis de la pourriture blanche est partielle, polygénique et de nature horizontale. Cependant ce test a permis d'améliorer sensiblement le comportement des hybrides actuellement commercialisés.

La biologie moléculaire développe des outils permettant de cartographier des régions génomiques impliquées dans la résistance aux attaques de *S. sclerotiorum*. Ces programmes de recherche de QTL (Quantitative Trait Loci) révèlent une organisation des facteurs de résistance du tournesol à *S. sclerotiorum* complexe. Ces nouvelles voies viennent compléter les études de génétique classique. A ce jour les deux outils demeurent complémentaires pour une sélection rapide.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vear F., Guillaumain J.J., 1977. Etude de méthodes d'inoculation du tournesol par *Sclerotinia sclerotiorum* et application à la sélection. Ann. Amélior. Plant., 27, 523-537.
- Tourvieille D., 1985. Contamination du capitule du tournesol par les ascospores de *Sclerotinia sclerotiorum*. Agronomie, 5, 564.
- Vear F., Tourvieille D., 1988. Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. Agronomie, 8, 503-508.

TEST DE CRIBLAGE AU CHAMP POUR LA RESISTANCE DU POIS A *Aphanomyces euteiches*

Marie-Laure Pilet-Nayel¹, Robert Esnault¹, Corinne Boitel-Devaux² et Martine Roux-Duparque²

La pourriture racinaire précoce du pois (*Pisum sativum* L.), due à *Aphanomyces euteiches*, est la maladie la plus importante du pois en France. Aucune méthode de lutte chimique et aucune variété résistante ne sont actuellement disponibles pour contrôler la maladie. Des travaux de recherche et de sélection visant à améliorer les niveaux de résistance actuels partiels et insuffisants chez le pois ont été développés depuis la fin des années 1990 et ont conduit à développer un test d'évaluation de lignées de pois au champ pour leur niveau de résistance partielle.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Conditions d'infestation au champ

Le test est effectué en parcelle dont le sol est naturellement infesté par la maladie. En cas d'insuffisance pluviométrique, le bon démarrage de la contamination est assuré en début de culture par l'irrigation de la parcelle.

1.2. Dispositif expérimental

Un dispositif en blocs complets randomisés à 3 répétitions est utilisé. Chaque parcelle élémentaire est une double ligne de 2 mètres comprenant un total de 60 plantes (densité de semis : 1 grain/6.6 cm). Des parcelles adjacentes d'un témoin sensible (Variété Solara) sont réparties toutes les deux lignées afin de contrôler l'hétérogénéité de la contamination (Figure 1). Quatre à dix témoins partiellement résistants et sensibles sont inclus parmi les lignées évaluées.



Figure 1 : Dispositif d'évaluation de lignées au champ en double lignes, avec témoin adjacent Solara (So1, So2, ...) toutes les deux lignées (L1, L2, ...)

1.3. Systèmes de notation

Deux critères principaux d'évaluation de la maladie ou de son impact sont utilisés.

1.3.1. L'Indice de Nécrose Racinaire (INR), mesurant les symptômes de pourriture racinaire sur les racines et l'épicotyle, est un critère d'évaluation de la résistance partielle. Cet indice est évalué dès le stade 4-5 feuilles sur 10 à 20 plantes par parcelle (selon l'expérimentation) arrachées, lavées puis notées individuellement selon une échelle de 0 à 5 (Moussart *et al.*,

¹ UMR INRA-Agro Campus APBV, Domaine de la Motte, BP35327, 35653 Le Rheu Cedex

² Groupement des Sélectionneurs de Pois protéagineux, Chaussée Brunehaut, Estrées-Mons, BP136, 80203 Péronne Cedex

2001) et (Moussart et Tivoli, 2005) La moyenne des notes obtenues sur plantes individuelles est calculée pour chaque parcelle.

1.3.2. L'Indice de Dépérissement Aérien (IDA), mesurant les symptômes de jaunissement et de nanisme sur les parties aériennes, est davantage un critère d'évaluation de la tolérance. Cet indice est mesuré sur la globalité de chaque parcelle deux ou trois fois dès le stade début floraison jusqu'au stade mi- à fin remplissage des gousses, avant l'arrivée de la maturité physiologique, selon une échelle de 1 à 9 (Duparque et Boitel, 2001 ; photo) :

- 1 : plante bien verte ;
- 2 : le feuillage commence à pâlir ;
- 3 : plante jaune sur 1/4 de sa hauteur, feuillage sensiblement plus pâle ;
- 4 : plante jaune sur 1/4 - 1/2 de sa hauteur, feuillage pâle sur la totalité ;
- 5 : plante jaune sur 1/2 - 3/4 de sa hauteur, début de nanisme (on remarque la fragilité des plantes) ;
- 6 : plante jaune sur 1/2 - 3/4 de sa hauteur, nanisme net (entrenoeuds courts, peu d'étages de gousses) ;
- 7 : plante jaune à plus de 3/4 de sa hauteur, nanisme prononcé (plante très courte - très peu d'étages de gousses) ;
- 8 : plante entièrement jaune, nanisme très prononcé (plante très courte- un ou pas d'étage de gousse) ;
- 9 : plante morte.

En cas de manque de symptômes de nanisme ou de difficulté à évaluer le nanisme, les classes de notations 5/6 et 8/9 peuvent être confondues et une échelle de jaunissement comprenant sept classes peut être alors appliquée. Duparque et Boitel (2001) ont montré sur une gamme de 9 géotypes variant pour leur niveau de résistance, que l'IDA était négativement corrélé au rendement (-0.95 ***) dans des conditions de forte infestation.



Photo (INRA) : Echelle d'Indice de Dépérissement Aérien

1.4. Analyse des résultats

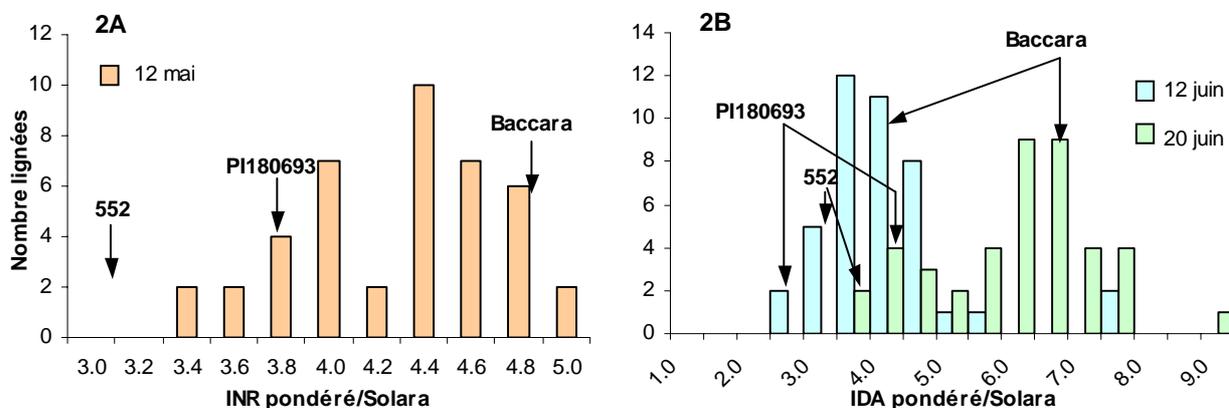
Les notes d'INR et d'IDA obtenues sur chaque parcelle sont pondérées par rapport à celles des parcelles adjacentes du témoin sensible Solara (Figure 1), selon la formule suivante (Dagnelie, 1981) :

$$\text{INR}_{\text{pondéré}}(\text{L1}) = \{ \text{INR}(\text{L1}) - \text{INR}(\text{Moyenne des Solara de la répétition}) \} \\ - \{ (2 * \text{INR}(\text{So1}) + \text{INR}(\text{So2})) / 3 \}.$$

Les notations pondérées sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SAS (analyse de variance, tests de corrélation, comparaison de moyennes...).

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

La gamme de variation d'INR observée au sein de lignées de pois à un instant donné se répartit le plus souvent sur 3 classes de notes (Figure 2A). Une plus large variation est le plus souvent observée pour l'IDA entre lignées partiellement résistantes et sensibles (Figure 2B).



Figures 2A et 2B : Exemples d'INR et IDA collectés à Riec-sur-Belon (29) en 2003 sur 42 ressources génétiques et 7 témoins différentiels de pois

(Témoins indiqués par des flèches: PI180693, 552, partiellement résistants, Baccara, sensible)
(données UMR INRA-Agro-Campus APBV, Le Rheu)

Les niveaux de résistance/tolérance observés chez le pois sont faibles. Seuls quelques génotypes restent verts en condition de fortes contaminations.

3. CONCLUSION

Ce test d'évaluation au champ de la résistance du pois à *Aphanomyces euteiches* est largement utilisé tous les ans par l'INRA, le GSP et les sélectionneurs de pois protéagineux en France. Il est appliqué à l'évaluation de ressources génétiques, de gammes de génotypes différentiels, de populations de lignées recombinantes et de lignées de sélection, sur un réseau INRA-GSP de parcelles infestées. Il contribue ainsi à faire progresser les programmes de recherche et de sélection en cours visant identifier de nouvelles sources de résistance et des facteurs génétiques impliqués dans le contrôle de la résistance ainsi qu'à sélectionner des géniteurs de type agronomique présentant des niveaux améliorés de résistance partielle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dagnelie P (1981). Principes d'expérimentation. Les Presses Agronomiques de Gembloux, ASBL (Eds), 158-160
- Duparque M, Boitel C (2001) Common root rot (*Aphanomyces euteiches*) reduces the yield of pea (*Pisum sativum* L.) depending on the resistance level of the genotype. Proc 4th Eur Conf Grain Legumes, 8-12 July 2001, Cracow (Pologne), AEP (Eds), 270-271
- Moussart A, Wicker E, Duparque M, Rouxel F (2001) Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. Proc 4th Eur Conf Grain Legumes, 8-12 July 2001, Cracow (Pologne), AEP (Eds), 272-273
- Moussart A., Tivoli B., (2005) Test de criblage en conditions contrôlées pour la résistance du pois à *Aphanomyces euteiches*. Le Cahier des Techniques de l'INRA

ÉVALUATION AU CHAMP DE LA RÉSISTANCE DU BLE A LA FUSARIOSE DE L'ÉPI

Jean-Yves Morlais¹, Maxime Trotter¹

La fusariose présente partout où les céréales sont cultivées, atteint les inflorescences et les grains en formation. Le risque associé à cette maladie est toujours présent et largement corrélé aux conditions climatiques, plus précisément aux conditions de pluie et d'humidité qui surviennent autour de la floraison des céréales. Les pertes de rendement en grain peuvent atteindre 30 à 70% dans le cas d'attaques exceptionnellement graves.

Ce n'est pas tant la baisse de rendement engendrée par la maladie qui pose problème (les grains échaudés sont éliminés au battage) mais la qualité des grains d'un point de vue technologique et sanitaire. En effet, les grains fusariés engendrent une perte de la valeur technologique puisque le développement du champignon, à l'intérieur même du grain, a une incidence sur de nombreux critères de qualité de la farine (force, ténacité, gonflement) se traduisant par des qualités boulangère et pastière moindres. D'autre part, le souci majeur posé par la fusariose est la présence de mycotoxines dans les grains infectés.

On peut trouver plus de 17 espèces répertoriées sur les céréales. Les plus fréquentes appartiennent à l'ancien complexe des *Fusarium roseum* de la classification de Messiaen et Cassini. Ce sont : *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. crookwellense* et *F. sporotrichioides*.

Les deux espèces les plus fréquentes sur le blé en France, *F. graminearum* et *F. culmorum*, sont les plus utilisées pour réaliser des tests de résistance en conditions contrôlées et au champ. Actuellement l'espèce la plus fréquente sur le blé est *F. graminearum* mais le classement des variétés de blé pour leur résistance aux principales espèces de *Fusarium* est relativement stable. Comme les spores de *F. culmorum* sont beaucoup plus faciles à produire au laboratoire que celles de *F. graminearum*, beaucoup de tests de comportement de génotypes de blé sont réalisés avec *F. culmorum*. Les méthodes de production d'inoculum sont différentes pour ces 2 espèces.

1. PRODUCTION D'INOCULUM ET CONTAMINATION

1.1. *Fusarium culmorum*

La multiplication du champignon pour produire l'inoculum doit se faire à partir d'une souche pure. Il est préférable qu'elle soit caractérisée pour son agressivité et la production de mycotoxines.

1.1.a. Multiplication

La multiplication se fait sur grains d'orge. Une fiole de Erlenmeyer de 250 ml permet de produire environ 5 litres d'inoculum final à la concentration de 10⁶ spores/ml.

- Dans chaque fiole de 250 ml, mettre un volume de grain d'orge (30 ml) et le même volume d'eau du robinet. Fermer les flacons avec du coton cardé et couvrir d'un papier sulfurisé maintenu avec un élastique.

- Stériliser deux fois : 20 minutes à 105 °C pour ne pas faire éclater les grains, puis 1 heure à 120 °C en laissant refroidir 24 heures entre les deux stérilisations pour permettre une imbibition complète des grains.

¹ UMR INRA – Agrocampus Rennes APBV, BP35327, 35653 Le Rheu, France

- Après avoir laissé refroidir, déposer en condition stérile (sous une hotte à flux lumineuse ou auprès d'un bec Bunsen) un fragment de culture pure de l'isolat choisi dans chaque flacon.
- Laisser incuber à température ambiante et à la lumière naturelle jusqu'à ce que tous les grains soient colonisés et qu'il y ait sporulation (environ 1 mois).
- Au début de la culture, agiter pour fragmenter le mycélium, assurer une colonisation rapide de l'ensemble des grains et éviter la prise en masse (2 à 4 fois à 48 h d'intervalle)

Après un mois environ, on peut extraire les spores par lavage et filtration sur mousseline. La suspension de spores pourra être utilisée immédiatement comme inoculum après dilution à la concentration voulue ou être congelée en suspension très concentrée ($>10^8$ spores/ml) qui pourra être conservée au moins 3 mois à -20°C . Il est pratique de conditionner l'inoculum en sachets correspondant aux quantités pouvant être utilisées en une journée en fonction des essais mis en place. Les spores de *Fusarium* sédimentent rapidement. La mesure des concentrations ainsi que la préparation des aliquotes doivent être réalisées à partir d'une suspension agitée en permanence.

1.1.b. Contamination au champ par pulvérisation d'une suspension de spores

La quantité de symptômes formés varie beaucoup avec le stade physiologique de l'épi au moment de la contamination. Elle passe par un pic à la floraison et devient quasi nulle à partir du stade aqueux du grain. Il est donc très important de contaminer tous les génotypes au même stade de développement. Nous réalisons nos contaminations début floraison.

- Repérer dans la journée les parcelles arrivant à floraison (minimum 10 % des épis ayant les étamines sorties par parcelle) avec une marque de couleur différente par jour de contamination.

- Sortir du congélateur des sachets d'inoculum concentré correspondant à la quantité d'inoculum nécessaire pour les parcelles à contaminer dans la journée et les laisser à température ambiante jusqu'à décongélation. Un litre d'inoculum final permet de contaminer environ 5 m². L'inoculum décongelé ne se recongèle pas.

- Ajouter la quantité d'eau nécessaire à la dose pour avoir la concentration finale voulue.

Lorsque la dilution est faite, utiliser l'inoculum dans les heures qui suivent.

- Irriguer pendant 20 mn avec un débit de 6 mm / heure avant de contaminer et après la contamination pendant 10 mn si le temps est desséchant puis tous les deux jours s'il ne pleut pas.

- Pulvériser l'inoculum sur les génotypes repérés dans la journée de préférence le soir si le climat est sec, la quantité apportée 200 ml / m² correspond au début du ruissellement.

1.2. *Fusarium graminearum*

1.2.a. Multiplication

Pour *F. graminearum* il y a deux possibilités pour produire de l'inoculum.

La production de conidiospores de *F. graminearum* étant difficile et dépendante de l'isolat, il est plus facile de produire des ascospores anémophiles au champ, soit en épandant sur le sol des grains contaminés par un isolat de *F. graminearum* (on obtient généralement de périthèces puis des ascospores en 3 semaines à un mois), soit en déposant en janvier février entre les lignes de blé des chaumes de maïs (ceux-ci produiront des périthèces et des ascospores). Dans le premier cas, la production de grains contaminés est analogue à celle de *F. culmorum*, sur grains d'orge ou de maïs ; mais on n'observe rarement une sporulation *in vitro*. Dans ce second cas, on ne contrôle pas la souche de *F. graminearum*. On aura donc une population de génotypes de *F. graminearum*.

Il est possible de produire des conidiospores dans un milieu liquide à base de haricot mungo. Faire bouillir 40 grammes de haricot mungo dans un litre d'eau pendant 20 minutes. Filtrer et stériliser le filtrat dans des boîtes de Roux. Après refroidissement ensemencer avec un explant d'une culture de *F. graminearum*. Après deux à trois semaines la concentration de la culture peut varier de 10^5 à 10^6 spores /ml. Le résultat dépend beaucoup de l'isolat de *F. graminearum*. Les spores peuvent être conservées comme celles de *F. culmorum*.

1.2.b. Contamination au champ

Les grains d'orge ou de maïs contaminés par *F. graminearum* sont produits comme pour la production de spores de *F. culmorum*, mais dans les fioles de Erlenmeyer de cinq ou six litres. Les grains sont sortis des flacons juste avant leur utilisation et épandus directement sur le sol de la parcelle au stade gonflement de la culture. Une quantité de 1,5 kg de grains permet de contaminer environ 60 m². Répéter l'opération toutes les semaines pendant trois à quatre semaines selon les écarts de floraison attendus entre les génotypes à tester.

Pour assurer une bonne production de périthèces, il est nécessaire de maintenir le sol humide en irriguant par aspersion durant 20 mn avec un débit minimum de 6 mm / heure après l'épandage puis tous les jours ou deux jours s'il ne pleut pas selon l'humidité ambiante.

Quelle que soit l'origine des tiges de maïs, la probabilité qu'elles soient contaminées par *F. graminearum* est forte. Il faut les prélever après la récolte du maïs grain, les conserver à l'extérieur et les placer dans les parcelles à contaminer entre les lignes de blé en janvier ou février. Il est important d'irriguer pour maintenir le sol humide à partir de la mi-montaison si le climat est sec. La notation de la précocité de floraison a lieu tous les 2 jours. Une marque de couleur différente est attribuée à chaque génotype à chaque passage. Les symptômes sont notés à temps constant après la floraison qui est le stade le plus sensible.

2. NOTATION DES SYMPTOMES.

Les symptômes sur épi ne permettent pas de distinguer les espèces de *Fusarium*. L'échelle de notation est donc identique quelle que soit l'espèce ou l'isolat de *Fusarium*.

Pour des tests de sélection, nous réalisons des notations visuelles selon une échelle de 1 à 9 (Figure 1). On estime le pourcentage d'épillets attaqués par la maladie en intégrant l'ensemble des épis de la parcelle. Il faut noter à temps constant après la contamination dans le cas de dépôt de spores sur l'épi ou à temps constant à partir de la floraison si la contamination est faite sur le sol pour tenir compte des différences de précocité entre les génotypes.

Nous réalisons une première notation 350°C jours après la contamination de la variété ce qui nous permet d'estimer la contamination primaire et une seconde à 450°C jours pour évaluer la progression de la maladie de fleur en fleur. Les variations de luminosité peuvent introduire un effet jour de notation. Pour les limiter, nous notons toujours avec la lumière du soleil dans le même sens par rapport au notateur (dans le dos de préférence).

Pour certains tests d'analyse génétique ou de méthodologie, nous réalisons des notations plus précises (et plus coûteuses) :

- Estimation de la proportion d'épis fusariés

Compter sur 50 à 100 épis, selon la précision souhaitée, le nombre d'épis ayant au moins un épillet fusarié. Un épillet est considéré comme fusarié lorsqu'au moins deux fleurs sont desséchées par la fusariose (Figure 2).

- Estimation du nombre d'épillets fusariés par épi.

Compter sur 50 ou 100 épis le nombre d'épillets desséchés par la fusariose pour chacun des épis.

Dans tous ces cas il est important de ne pas choisir les épis, mais de les prendre au hasard.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Figure 1 : *Échelle de notation des symptômes de fusariose de 1 à 9*

Figure 2 : *Epillet fusarié*



EVALUATION AU CHAMP DE LA RESISTANCE DE LA POMME DE TERRE AU MILDIOU DU FEUILLAGE

Roland Pellé¹, Michel Bozec¹, Didier Andrivon², Jacques Soyer³, Daniel Ellissèche¹

Le mildiou, dont l'agent pathogène est l'oomycète *Phytophthora infestans*, reste la maladie la plus grave à l'échelon mondial subie par les cultures de pomme de terre : elle se traduit par une destruction plus ou moins rapide des feuilles et des tiges, diminuant ainsi les potentialités de rendement des plantes, et elle peut également provoquer le pourrissement des tubercules, altérant ainsi la récolte en quantité et en qualité.

Il est donc important de pouvoir évaluer le degré et le type de résistance des géotypes de pomme de terre, que ce soit dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique de cette résistance ou dans celui de l'expérimentation officielle des variétés candidates à l'inscription au Catalogue Français des Espèces et Variétés. Cette information peut être utilement exploitée dans les systèmes d'aide à la décision relatifs aux traitements phytosanitaires.

Il existe 2 types de résistance au mildiou chez la pomme de terre. La résistance spécifique, due à des gènes d'hypersensibilité, est totale jusqu'à ce que le géotype résistant soit confronté à une souche du parasite possédant les gènes de virulence correspondants : la résistance est alors surmontée. La résistance partielle, en fonction de son niveau, permet à la plante de s'opposer plus ou moins efficacement aux processus de développement de l'épidémie (Ellissèche *et al.*, 1999).

L'évaluation au champ de la résistance des géotypes de pomme de terre au mildiou du feuillage peut être réalisée en conditions de contamination naturelle (particulièrement en climat océanique, très favorable au développement de la maladie) ou à l'aide d'une contamination artificielle. C'est le test en conditions de contamination naturelle qui est décrit ici.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal nécessaire comprend :

- Les géotypes et/ou les variétés à tester;
- Des variétés témoins représentatives des différents types et niveaux de résistance et appartenant à différents groupes de maturité (le groupe de maturité est à prendre en considération dans l'évaluation de la résistance : un géotype tardif a davantage de potentialité qu'un géotype précoce à reconstituer son feuillage après destruction par le parasite);
- Des hôtes différentiels ne possédant pas (r) ou possédant un ou plusieurs des 11 gènes (R1 à R11) d'hypersensibilité déjà répertoriés ;
- 1 variété sensible (Bintje) qui sert à propager la maladie.

Les tubercules de tous ces géotypes auront été conservés et préparés de la même façon avant plantation (p. ex. : conservation hivernale à +2, +4°C suivie d'une pré-germination d'environ

¹ INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Keraiber, F-29260 Ploudaniel, France

² INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes BiO3P, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France

³ GEVES, La Minière, F – 78285 Guyancourt Cedex, France

quatre semaines) afin de ne pas introduire un biais expérimental qui serait dû à une hétérogénéité de levée des plantes d'un génotype à l'autre.

1.2. Equipement d'irrigation

L'irrigation, apportée en fonction des conditions climatiques, permet de maintenir dans l'essai un microclimat humide, favorable au développement de l'épidémie. L'équipement se compose d'un réseau de sprinklers sur cannes de 1m de hauteur espacés de 12 m au carré. (photo 1).

1.3. Dispositif expérimental

Le principe du dispositif expérimental est de mailler le terrain à l'aide d'une variété sensible (par exemple Bintje) qui sera contaminée tôt en saison et capable ensuite de multiplier et de propager l'inoculum. Des témoins de comportement connu, représentatifs de différents niveaux et types de résistance sont répartis dans ce dispositif ainsi que des hôtes différentiels possédant chacun un ou plusieurs gènes d'hypersensibilité (Voir figure 1). Chaque parcelle de génotype à tester ou de génotype témoin est au contact d'une parcelle de Bintje. Le nombre de répétitions est au moins de 2. L'expérience prouve que l'effectif d'une parcelle élémentaire peut être réduit à 2 plantes mais que 4 plantes (2 rangs de 2 plantes) ou 5 plantes (1 rang) rendent les notations plus aisées.

Dans ce dispositif général on peut intégrer les dispositifs expérimentaux classiques : blocs de Fisher, carré latin, alpha-plans ...

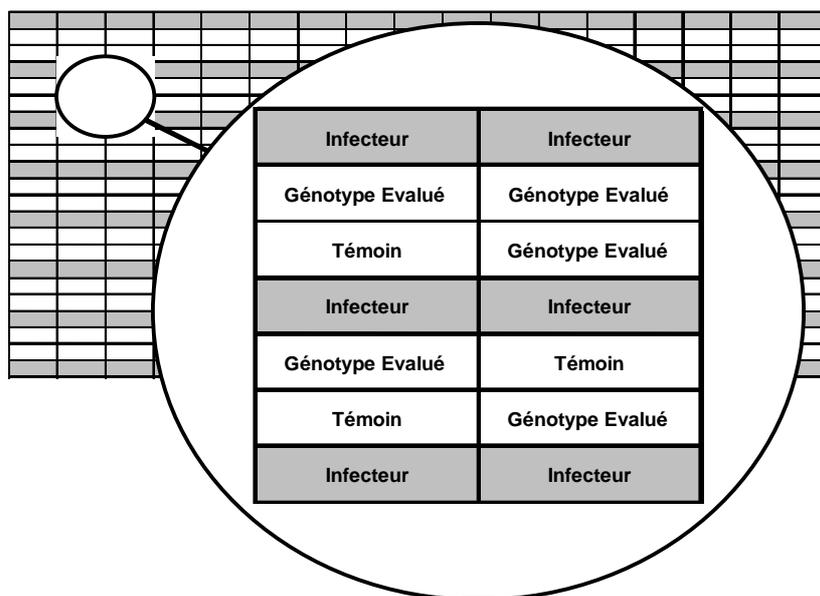


Figure 1 : Evaluation de la résistance au mildiou de la Pomme de Terre (*Phytophthora infestans*). Exemple de disposition sur le terrain.

1.4. Notation de la progression de la maladie sur les génotypes

Dès l'apparition de la première tâche foliaire, une notation hebdomadaire du degré de destruction du feuillage par le mildiou est réalisée. Plusieurs échelles de notation existent. L'échelle proposée ici repose sur l'évaluation visuelle du pourcentage de destruction du feuillage en s'en tenant aux valeurs : **0, 0.1, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 90, 95 et 100%**.

Ces notations permettent de tracer point par point pour chaque génotype évalué une courbe de progression de la maladie (Disease Progress Curve ou DPC), avec en abscisse le temps exprimé en nombre de jours à partir de la date de plantation et en ordonnée le pourcentage de destruction du feuillage. (photo 2)

1.5. Définition et calcul des paramètres descriptifs de la résistance

Les équations des courbes de progression de la maladie (ou de destruction du feuillage) pour les différents génotypes sont du type $y_i = f(t)$, où y_i est le pourcentage de surface foliaire attaqué chez le génotype i et t le temps. Ces courbes sont généralement des sigmoïdes de forme plus ou moins dressée.

Les aires sous la courbe se calculent selon les formules suivantes :

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n [(y_i + y_{i+n})/2] * [(t_i - t_{i+n})]$$

$$\text{AUDPCr (relative)}^1 = \text{AUDPC} / (100 * t_{\text{tot}})$$

Avec

y_i : % de destruction à l' $i^{\text{ème}}$ observation et y_{i+1} , % de destruction à l' $i^{\text{ème}}+1$ observation

t_i : date de l' $i^{\text{ème}}$ observation en jour après plantation et t_{i+1} , la date de l' $i^{\text{ème}}+1$ observation

t_{tot} : durée totale de la végétation.

Le changement des variables y_i en $Y_i = \text{Log} (y_i/1-y_i)$ permet d'obtenir à partir des équations des courbes de progression de la maladie des équations de droites $Y_i = a_i.t + b_i$. Il devient ainsi possible de calculer deux paramètres décrivant les relations entre les courbes des génotypes évalués et celles des variétés témoins (Ellissèche *et al.*, 1999).

$\Delta t = t_{0i} - t_{0t}$, où t_{0i} et t_{0t} sont les dates d'apparition des premiers symptômes visibles sur le génotype considéré et sur la variété utilisée comme témoin sensible respectivement;

$\Delta a = a_i - a_t$, où a_i et a_t sont les pentes des courbes de progression de la maladie transformées en droites pour le génotype considéré et pour la variété utilisée comme témoin sensible respectivement.

Les AUDPCr permettent de mesurer les différences entre niveaux de résistance des génotypes évalués et des témoins.

Δt et Δa permettent de préciser le type de résistance de chacun des génotypes évalués.

Δt est une mesure de la différence entre les dates d'attaque de chacun des génotypes évalués et du témoin sensible, qui caractérise une résistance spécifique (RS).

Δa est une mesure de la différence entre les vitesses d'évolution de l'épidémie sur chacun des génotypes évalués et sur le témoin sensible, qui caractérise une résistance non spécifique (RNS).

¹ La transformation des AUDPC en AUDPCr permet de rendre les données normales (Fry, 1978)

A partir des valeurs de ces deux paramètres, les génotypes peuvent être caractérisés de la manière suivante :

Δt	Δa	Type de résistance présent chez le génotype
≤ 0	≤ 0	aucun (sensible)
> 0	≤ 0	résistance spécifique (RS)
≤ 0	< 0	résistance non-spécifique (RNS)
> 0	< 0	RS + RNS (or RS pas encore contournée)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats présentés ici à titre d'exemple portent sur cinq variétés témoins dont le niveau et le type de résistance sont connus et deux génotypes en cours de sélection dont le niveau et le type de résistance ne sont pas connus (Figure 2 ; Tableau 1). Il s'agit des variétés et génotypes suivants (les gènes de résistance spécifique sont précisés) : Bintje (sensible), Maritta (R1), Arka (R1, R3), Pentland Dell (R1, R2, R3), Pimpernel (RNS), INRA 92T109.24 (inconnu) et INRA 92T120.16 (inconnu).

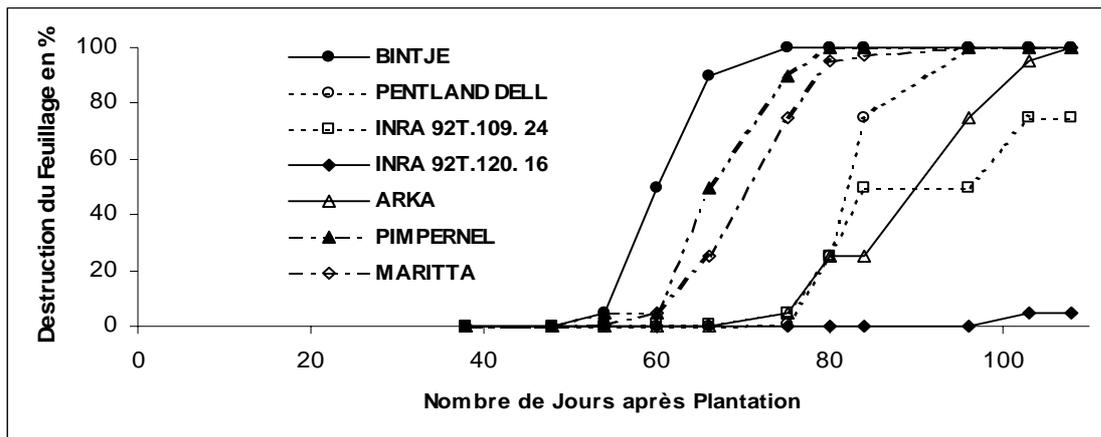


Figure 2 : Courbes de progression du mildiou (DPC) sur 7 génotypes.

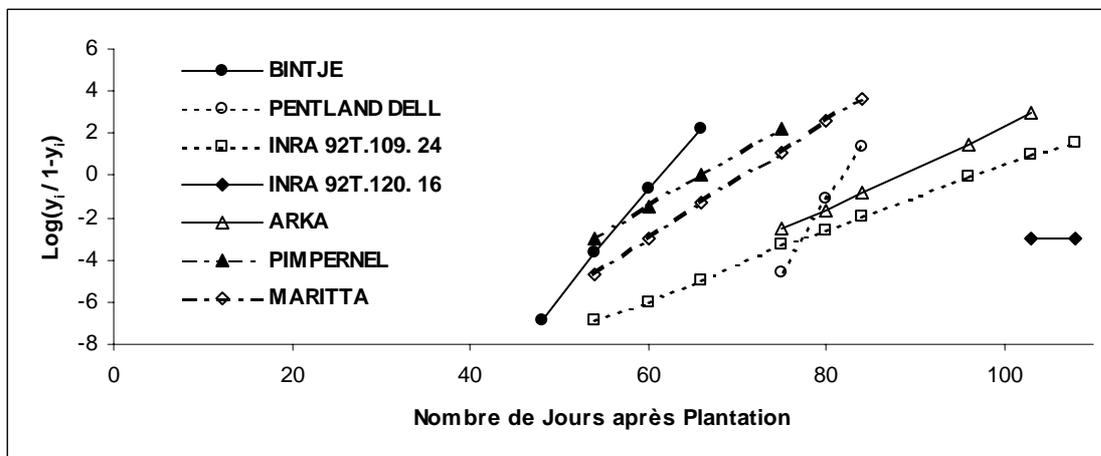


Figure 3 : DPCs des 7 génotypes transformées par $Y_i = \text{Log}(y_i/1-y_i)$

Génotype	AUDPCr	Δt	Δa	Type de Résistance
BINTJE	0.44	0	0	S
PENTLAND DELL	0.23	28	0.13	RS
INRA 92T.109. 24	0.16	10	-0.36	RNS
INRA 92T.120. 16	0.00	58	-0.50	RS + RNS
ARKA	0.17	28	-0.31	RS + RNS
PIMPERNEL	0.38	10	-0.24	RNS
MARITTA	0.35	10	-0.23	RNS

Tableau 1 : Paramètres dérivés des courbes de progression du mildiou chez 7 génotypes de pomme de terre et types de résistance (Ploudaniel ; 1995).

Ce tableau montre bien que le témoin sensible Bintje est affecté de la valeur d'AUDPCr la plus forte. La valeur élevée du Δt de Pentland Dell s'explique par le fait que, dans la région, très peu d'isolats de mildiou sont capables de contourner R2. En revanche, la grande majorité sont virulents vis-à-vis de R1. Les faibles valeurs de Δa des deux génotypes INRA 92T109.24 et INRA 92T120.16 sont caractéristiques de la présence d'une résistance non spécifique. Les valeurs de Δt (respectivement 28 jours et 10 jours) permettent de discriminer les 2 génotypes à valeurs d'AUDPC voisines Arka (0.17) et INRA 92T109.24 (0.16).

La transformation des données primaires par la fonction $Y_i = \text{Log}(y_i/1-y_i)$ (Figure 3) permet de mieux appréhender le début de l'infection que sur les courbes initiales (Figure 2). En outre, on voit bien le relatif parallélisme qui existe entre la droite de Maritta et celle de Pimpernel (valeurs de Δa très voisines) et la plus grande vitesse de progression du mildiou sur Pentland Dell que sur le témoin sensible Bintje, une fois que Pentland Dell est attaquée.

3. CONCLUSION

L'évaluation au champ de la résistance de la pomme de terre au mildiou du feuillage ne peut valablement être réalisée qu'en climat océanique (ex : Ploudaniel : 48°30'N, 4°19'W, 36m) et en situation régulièrement contaminée par le mildiou. Une construction précise des courbes nécessite des notations visuelles hebdomadaires. Une interprétation des résultats basée uniquement sur l'examen des courbes devient impossible dès que l'évaluation porte sur un nombre relativement élevé de génotypes (>10). L'utilisation des trois paramètres AUDPCr, Δt et Δa permet de préciser niveaux et types de résistance.

On peut penser que la méthode présentée ici puisse s'appliquer à d'autres pathosystèmes faisant intervenir des parasites foliaires à dissémination aérienne.

BIBLIOGRAPHIE

Ellissèche D. ; Pelle R. ; Andrivon D. (1999). Résistance variétale au mildiou : situation et perspectives. *La Pomme de terre française*, 510 : 16-22.

Ellissèche D. ; Pelle R. ; Andrivon D. (1999). A simple tool for using epidemiological data in breeding programmes for late blight resistance. 14th Triennial Conference of the EAPR, Sorrento, 1999/05/2-7, Abstracts of Conference Papers, Posters and Demonstration, 104-105.

Fry W.E. 1978. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. *Phytopathology* 68:1650-1655.



Photo 1 : *Système d'aspersion en action* (Photo : Roland Pellé)



Photo 2 : *Résistance au mildiou de la pomme de terre : essai au champ en contamination naturelle.* (Photo Roland Pellé)

EVALUATION AU CHAMP DE LA RESISTANCE DE LA POMME DE TERRE AU MILDIU DU TUBERCULE

Michel Bozec¹, Roland Pellé¹, Didier Andrivon², Jacques Soyer³, Daniel Ellissèche¹

Le mildiou, dont l'agent pathogène est l'oomycète *Phytophthora infestans*, est la maladie la plus grave à l'échelon mondial subie par les cultures de pomme de terre parce qu'elle se traduit non seulement par une destruction plus ou moins rapide des feuilles et des tiges, mais aussi par une contamination des tubercules, pouvant provoquer leur pourrissement partiel ou total, et altérant ainsi la récolte en quantité et en qualité. Il est donc important de pouvoir évaluer le degré de résistance des géotypes de pomme de terre au mildiou du tubercule, que ce soit dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique de cette résistance ou dans celui de l'expérimentation officielle des variétés candidates à l'inscription au Catalogue Français des Espèces et Variétés. D'autant plus que des tubercules contaminés constituent la principale source d'inoculum primaire au début d'une nouvelle saison de culture de la pomme de terre (Boyd, 1980; Zwankhuizen, Govers, and Zadoks, 1998), qu'ils aient été laissés dans les champs au moment de la récolte précédente ou dans des tas de déchets après le triage et le calibrage, cela étant particulièrement vrai dans les régions à climats doux où ils ne sont pas détruits par le gel. Quelle que soit la sévérité des symptômes (degré de pourrissement des tubercules), tout tubercule contaminé devient soit inconsommable, soit source de contamination ultérieure s'il est planté.

Le mode opératoire ci-après a donc été mis au point pour mesurer l'incidence de la maladie (pourcentage de tubercules contaminés), étant donné son fort impact économique. Ce mode opératoire est nécessaire, car le dispositif de mesure de la résistance au mildiou du feuillage présenté par ailleurs (absence de traitement phytosanitaire) se révèle insuffisant en matière d'évaluation du niveau de résistance des tubercules. Cette insuffisance est liée pour une part au fait que les attaques sur tubercules dépendent de la climatologie de l'année, en particulier du rythme et des périodes des précipitations (Bain R.A, Möller K., 1999), mais aussi à la moins bonne connaissance des composantes contribuant à déterminer la réaction des tubercules au mildiou (Flier, Turkensteen, and Mulder, 1998), et à l'absence d'une corrélation nette entre résistance au mildiou du feuillage et résistance au mildiou du tubercule (Lambert and Currier, 1997).

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal nécessaire comprend :

- Les géotypes et/ou les variétés à tester ;
- Des variétés témoins représentatives de différents niveaux de résistance :
Ackersegen : peu sensible ; Bintje : sensible ; BF15 : Très sensible

¹ INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Keraiber, F-29260 Ploudaniel, France

² INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes BiO3P, BP 35327, F-35653 Le Rheu Cedex, France

³ GEVES, La Minière, F – 78285 Guyancourt Cedex, France

Les tubercules de tous ces géotypes auront été conservés et préparés de la même façon avant plantation (p. ex. : conservation hivernale à +2, +4°C suivie d'une pré-germination d'environ 4 semaines) afin de ne pas introduire un biais expérimental qui serait dû à une hétérogénéité de levée des plantes d'un géotype à l'autre.

1.2. Conduite de l'essai

Le principe est de faire en sorte que de l'inoculum entre en contact avec les tubercules. Il faut donc obtenir une production de tubercules et d'inoculum. On y parvient en ne réalisant qu'une couverture phytosanitaire imparfaite du feuillage (fongicides de contacts appliqués à fréquence réduite). Ainsi, les plantes sont partiellement protégées, ce qui les maintient en végétation, et leur permet d'atteindre les stades de tubérisation et de grossissement des tubercules. Parallèlement, l'inoculum se multiplie pendant cette période. Une irrigation par aspersion, apportée en fonction des conditions climatiques, permet de maintenir dans l'essai un microclimat humide favorable à cette multiplication et facilite la migration de l'inoculum vers les tubercules. L'équipement d'irrigation se compose d'un réseau de sprinklers sur cannes de 1m de hauteur espacés de 12 m au carré.

1.3. Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé ici est un alpha-plan latinisé (ou carré semi-latin) qui permet de contrôler les hétérogénéités dans deux directions par un double système croisé de blocs. L'affectation des parcelles expérimentales dans chaque colonne et chaque ligne dépend de leur position dans chacune des autres colonnes et lignes (Anonyme, 2001). Ce dispositif a été privilégié à cause principalement de la nature aléatoire de la contamination naturelle dont on ne connaît pas a priori le sens. Les variétés témoins n'ont pas de position privilégiée dans le dispositif. Des parcelles élémentaires à 4 rangs d'au moins 10 plantes sont nécessaires. Elles permettent une récolte de tubercules à deux dates (deux rangs récoltés à chaque date), l'une au moment d'une forte pression de contamination (2^{ème} quinzaine de juillet) et l'autre à l'époque habituelle (courant septembre).

1.4. Notation de la maladie sur les géotypes

A chacune des deux récoltes, le nombre de tubercules contaminés est noté (observation visuelle). Les tubercules non contaminés ou apparemment non contaminés sont ensuite mis en incubation sous une bâche en jute dans un local à température ambiante pendant trois semaines, à la fin desquelles une nouvelle notation est réalisée. Le pourcentage total de contamination peut alors être calculé pour chaque parcelle et pour chaque géotype. Ces données une fois transformées [**transformation « Log (x+1) »**] peuvent être traitées en analyse statistique.



Photo 1 : *Symptômes de mildiou sur des tubercules de pomme de terre* (Photo : Michel Bozec)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats présentés ici portent sur les 3 témoins et 9 génotypes évalués en 1999 et 2000 (Figure 1). Ils ont été obtenus dans le cadre de l'évaluation officielle des variétés par le Comité Technique Permanent de la sélection (CTPS). La figure est un diagramme en bâtons, avec 4 bâtons par variétés qui représentent successivement les pourcentages de tubercules contaminés respectivement à la première et à la deuxième récolte de la première année, puis à la première et à la deuxième récolte de la deuxième année.

Ces résultats mettent bien en évidence des différences de réponse des génotypes et confirment que les témoins se classent dans l'ordre indiqué plus haut ; on note en particulier la forte sensibilité du témoin BF15 les 2 années. On observe que les effectifs de tubercules contaminés sont plus élevés lors de la première date de récolte (à l'exception près de la variété Bintje en 2000, chez laquelle le nombre de tubercules contaminés est très faible et sans différence notable entre les 2 dates de récolte). Ceci peut s'expliquer **1)** par la disparition complète, lors de la deuxième récolte, des tubercules les plus précocement attaqués, leur contamination par le mildiou pouvant être suivie par d'autres contaminations, cryptogamiques ou bactériennes et **2)** par le fait que le périoderme (la « peau ») des tubercules récoltés en juillet est encore très incomplètement subérisé et joue beaucoup moins un rôle de barrière à la pénétration du mildiou que chez les tubercules récoltés en septembre où cette subérisation est beaucoup plus avancée. Les résultats montrent également une interaction Génotype x Année, l'effet année pouvant être dû au climat et à des différences de pouvoir pathogène entre les races de mildiou présentes (en particulier de leur virulence).

Les facteurs de résistance au mildiou du tubercule et leur déterminisme génétique étant beaucoup moins bien connus que dans le cas du mildiou du feuillage, comme expliqué plus haut, il convient de parler de « moindre sensibilité » plutôt que de « meilleure résistance » chez les génotypes présentant de faibles pourcentages de contamination.

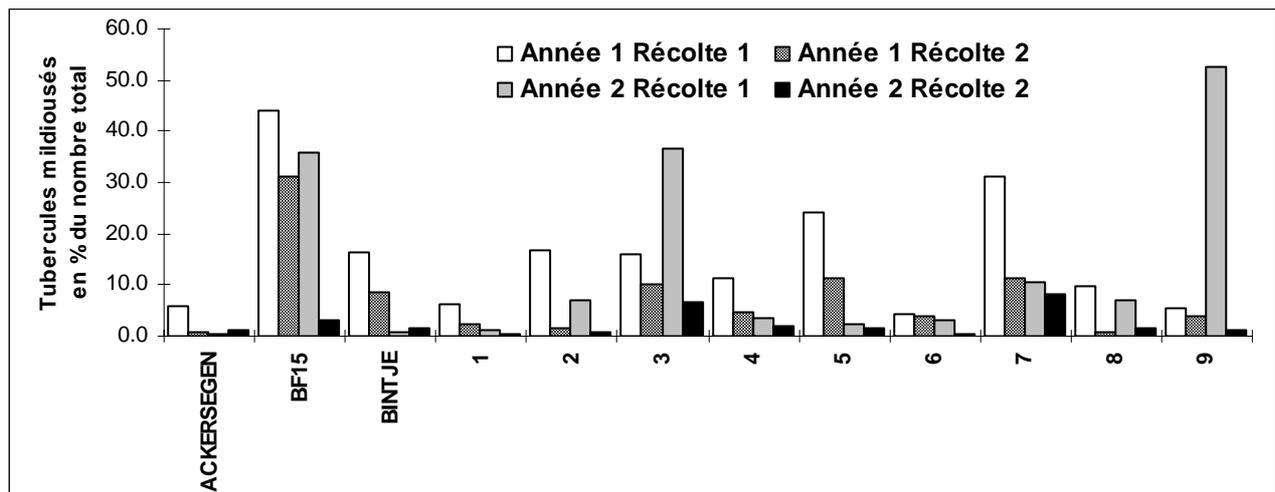


Figure 1 : Comportement vis à vis du mildiou du tubercule des 3 témoins et de 9 génotypes à Ploudaniel en 1999 et 2000 (Source GEVES)

3. CONCLUSION

La démarche adoptée ici consiste à placer les génotypes dans des conditions favorables à la contamination des tubercules. Sans aucune protection chimique, comme c'est le cas pour l'évaluation de la résistance au mildiou du feuillage, le système aérien des plantes, tiges et feuilles pourrait être très rapidement détruit chez les génotypes sensibles et très sensibles, en particulier les plus précoces, ce qui limiterait les possibilités de migration de l'inoculum vers les tubercules, ou même ne permettrait pas aux plantes d'atteindre avant leur mort le stade de tubérisation. De même l'irrigation par aspersion a pour rôle de compléter celui de la pluviométrie naturelle, pour augmenter l'hygrométrie, allonger la durée d'humectation du feuillage, deux facteurs favorables au développement du mildiou et pour faciliter la progression de l'inoculum vers le sol et les tubercules. Ces idées générales étant acquises, il est impossible dans ce mode opératoire d'être plus précis en terme de fréquences et doses d'irrigations ou de traitements pesticides, qui restent à gérer par l'expérimentateur en fonction du contexte climatique et épidémiologique local.

Le bilan des résultats acquis depuis maintenant sept ans donne à penser que les données les plus utiles sont obtenues à partir des tubercules de la première date de récolte, et que cette seule récolte pourra suffire à l'avenir. D'autre part, l'état des tubercules au moment de cette récolte les rend naturellement réceptifs à la contamination, alors que dans un certain nombre de tests de résistance réalisés en laboratoire ce sont des tranches de tubercules qui sont inoculées, situation assez éloignée de la réalité agronomique. C'est dans la même logique que nous avons choisi de baser notre évaluation sur les effectifs de tubercules contaminés et non pas sur les poids, c'est à dire à mesurer l'incidence de la maladie, plutôt que la sévérité des symptômes.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme, 2001. "Alpha-plans, carré semi-latins et autres dispositifs en répliques - Comment les utiliser ?" ; Brochure réalisée conjointement par l'INRA, Arvalis - Institut du végétal et le GEVES. Arvalis - Institut du végétal Ed., Boigneville, France.
- Bain R.A, Möller K., 1999. Factors influencing potato tuber infection by *Phytophthora infestans*. PAV Special Report 5: 210-227.
- Boyd AEW, 1980. Development of potato blight (*Phytophthora infestans*) after planting infected seed tubers. *Annals of applied Biology* **95**:301-309.
- Flier WG, Turkensteen LJ, Mulder A, 1998. Variation in tuber pathogenicity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands. *Potato Research* **41**: 345-354.
- Lambert DH, Currier AI, 1997. Differences in tuber rot development for North American clones of *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal* **74**: 39-43.
- Zwankhuizen MJ, Govers F, Zadoks JC, 1998. Development of potato late blight epidemics: disease foci, disease gradients, and infection sources. *Phytopathology* **88**:754-763.

ÉVALUATION DE LA RESISTANCE DU BLE AU PIÉTIN-VERSE.

Anne Lécuyer¹, Maxime Trotter¹

Le piétin-verse est, comme son nom l'indique, une maladie qui se développe à la base des tiges du blé pouvant entraîner la verse. Les contaminations d'automne ont lieu sur les gaines des jeunes plantes : le champignon traverse successivement les gaines en provoquant des lésions sur celles-ci. À la montaison, la tige est attaquée lorsque le champignon a traversé toutes les gaines qui l'entourent. La nécrose peut s'étendre à toute la section de la tige. Des attaques directement sur la tige peuvent également avoir lieu au printemps.

Les champignons responsables du piétin-verse des céréales sont séparés en deux groupes, considérés aujourd'hui comme deux espèces (Tableau 1) : *Tapesia yallundae* et *Tapesia acuformis*. Cette maladie touche surtout les cultures des régions à climat océanique et peut provoquer des pertes de rendement de 10 à 15 quintaux/hectare en cas de verse parasitaire. Différents facteurs favorisent la maladie qu'ils soient agronomiques (semis précoces, système de rotation : paille sur paille...) ou climatiques (automne/hiver doux et humide). Cette maladie devient de plus en plus inquiétante car depuis les années 80 on a vu apparaître des souches résistantes à certains fongicides. C'est pourquoi nos travaux s'orientent vers la création de lignées résistantes.

Pour cela, nous effectuons deux types de test : l'un stade jeune plante en condition semi contrôlée et un autre au stade adulte au champ. Au stade jeune plante nous cherchons à la résistance à la pénétration des gaines et à détecter les plantes ayant le gène *Pch1* (gène impliqué dans la résistance), en comptant le nombre de gaines attaquées de chaque plante. Cette observation nous permet d'avoir une bonne estimation de la résistance à la pénétration des gaines. Tandis qu'au stade adulte nous voulons estimer la résistance globale en notant le pourcentage de section nécrosée par tige.

forme sexuée (parfaite)	<i>Tapesia yallundae</i>	<i>Tapesia acuformis</i>
Forme asexuée (imparfaite)	<i>Ramulispora (Pseudocercospora) herpotrichoides</i>	<i>Ramulispora (Pseudocercospora) acuformis</i>
anciennes dénominations	souche rapide ou « blé » (type N ou W)	souche lente ou « seigle » (type L ou R)
Colonies	Colonies à marges uniformes	Colonies à marge, irrégulières
Mycélium	gris ou gris olive	gris ou gris marron
Conidies	Conidies courbes ou droites (52 µm)	Conidies toujours droites (65 µm)

Tableau 1. Classification et caractères des deux champignons agents du piétin-verse attaquant le blé.

Pouvoir pathogène : Le type N est en général plus agressif que type L sur jeunes plantes de blé et sur plantes adultes ; il atteint plus rapidement la tige que le type L. À maturité, l'intensité des attaques est presque identique pour les deux types.

¹ UMR INRA – Agrocampus Rennes APBV, BP35327, 35653 Le Rheu, France

1. ISOLEMENT DE CULTURES DE *Tapesia spp.*

Pour obtenir des cultures pures de *Tapesia yallundae* et *Tapesia acuformis*, c'est à dire indemnes d'autres champignons et de bactéries, on part de nécroses de piétin-verse sur tige de blé au stade adulte. Les échantillons sont d'abord nettoyés en milieu stérile (hotte stérile ou près d'une flamme d'un bec Bunsen sans courant d'air). On prélève 1 cm de gaine ou tige portant une nécrose typique qu'on lave dans de l'eau de Javel à 1 % pendant 30 secondes à une minute, puis on rince trois fois à l'eau stérile. Ensuite, on sèche les fragments sur du papier filtre stérile pour éviter les contaminations par des bactéries. On découpe la zone nécrosée en tous petits morceaux (environ 10 d'un millimètre ou moins) qu'on dépose dans une boîte de Pétri de 90 mm sur du milieu P.D.A. + pénicilline G et streptomycine. Pour assurer la purification de l'isolat on repique un fragment du front de croissance sur un milieu P.D.A. Plusieurs repiquages en boîtes de Pétri sont parfois nécessaires pour assurer la purification de l'isolat. La vitesse de croissance sur milieu artificiel permet de distinguer deux types d'isolats en fonction de leur vitesse de croissance, ceux à croissance normale et ceux à croissance lente (Figure 1)

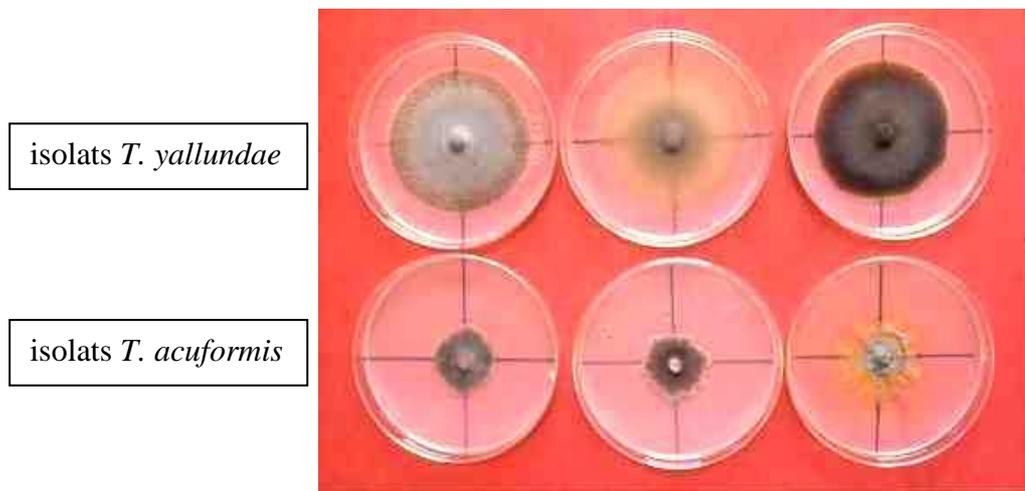


Figure 1 : Cultures de *Tapesia yallundae* et *T. acuformis* après 2 semaines à environ 20 °C

Il faut récupérer de nombreux isolats afin de retenir environ 10 isolats de *T. acuformis* ex-souches lentes (L) et 5 isolats de *T. yallundae* ex-souches rapides (N). Ceux-ci seront choisis en fonction de leur vitesse de croissance sur milieu artificiel (PDA). Après 8-10 jours, on peut caractériser les isolats comme appartenant à l'une ou l'autre espèce.

À partir des tests d'agressivité et de virulence sur les hôtes différentiels (Tableau 2) et de la vitesse de croissance en milieu artificiel, on choisit un isolat de *T. yallundae* se développant bien sur milieu artificiel et agressif sur les variétés Moisson et Cappelle, et peu agressif sur les autres hôtes. Les isolats *T. acuformis* doivent quant à eux se développer convenablement sur milieu artificiel et être agressifs sur le seigle. De plus, on choisira de préférence deux isolats ayant une agressivité (ou virulence) différente vis-à-vis de la variété de triticales Ampiac (Ampiac étant résistant à une des deux souches et sensible à l'autre).

L'isolat *T. yallundae* servira à la production d'inoculum sur grains d'avoine pour les tests de résistance au stade adulte au champ et les tests au stade jeune plante au tunnel.

espèce	Hôtes différentiels		isolats	
	variété		<i>T. yallundae</i>	<i>T. acuformis</i>
Blé tendre	VPM		R (peu virulent)	R
	Moisson		S (virulent)	S
	Cappelle		S (stade jeune plante)	S (stade jeune plante)
	Courtot (Roazon 7DR)		R	R
Seigle	Petkus		R	S
	Petkus spring		R	S
Triticale	Ampiac		R	R (sauf depuis 2000 pour certains isolats)
	Trimaran		S	R ?

Tableau 2 : Hôtes différentiels utilisés pour caractériser les isolats de *Tapesia yallundae* et *T. acuformis*

Les isolats *T. yallundae* sont virulents sur les variétés de blé sensibles telles que Moisson, pas ou peu virulents sur le seigle ainsi que sur des blés résistants comme VPM. Les isolats *T. acuformis* sont virulents sur seigle, sur les variétés de blé tendre sensibles (Moisson). En général la souche choisie est de l'espèce *T. yallundae* car de plus en plus présente par rapport à *T. acuformis* (Tableau 2).

L'isolat pour effectuer les tests étant choisi, on peut le multiplier

2. PRODUCTION D'INOCULUM DE PIÉTIN-VERSE

Le but est de pouvoir contaminer les plantes pour évaluer la résistance au piétin-verse de génotypes au stade jeune plante et au stade adulte. La multiplication de l'inoculum de piétin-verse se fait sur grains d'avoine blanche ce qui permet de mieux détecter les contaminations.

- Mettre une mesure de 1 kg d'avoine dans une fiole de Erlenmeyer de 5 l, y ajouter 1 l d'eau
- Boucher avec le coton cardé, fermer avec du papier sulfurisé et le fixer avec un élastique.
- Autoclaver les fioles deux fois à 24 heures d'intervalle, pendant 1 h à 120°C (1 bar).
- Bien agiter les fioles entre les deux stérilisations, en prenant garde de ne pas faire toucher les grains en contact avec le coton cardé pour éviter le risque de contamination.
- Laisser refroidir les fioles et les ensemercer avec une culture pure de *Tapesia*. Pour cela, travailler près d'un bec Bunsen ou sous une hotte à flux laminaire. Prélever avec un scalpel nettoyé à l'alcool et flambé à la flamme, un fragment du front de croissance ; ouvrir la fiole ; introduire l'explant ; refermer immédiatement la fiole avec son bouchon de coton cardé et du papier sulfurisé maintenu par un élastique.
- Agiter pour fragmenter et disséminer le mycélium dans la fiole et pour éviter que les grains ne prennent en masse, une fois par semaine environ. Les grains seront complètement contaminés au bout d'un mois et demi à deux mois.
- Sortir les grains de la fiole et les faire sécher à l'étuve à 30-35 °C pendant 24 à 48 heures.
- Conserver l'inoculum en sac papier en chambre froide en atmosphère bien sèche. La durée de conservation est de un an environ.

Deux types de test sont réalisés à partir de l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés pour évaluer la résistance des génotypes au stade jeune plante, en conditions semi contrôlées (tunnel maraîcher), et évaluer la résistance de génotypes au stade adulte, au champ.

3. TEST DE RESISTANCE AU PIETIN-VERSE AU STADE JEUNE PLANTE

L'objectif est de mesurer la résistance à la pénétration des gaines, et de détecter la présence du gène *Pch1*.

3.1. Mise en place le matériel végétal

Le semis est réalisé en tunnel maraîcher. Il s'effectue en lignes de 0,5 m (30 grains) espacées de 0,2 m, au début novembre. Prévoir 10 lignes de bordures. Echelonner le semis en fonction des possibilités de notation, afin de toutes les réaliser au bon stade. Désherber l'essai en post semis pré levée (Néburon à 10 g/l).

3.2. Inoculation les jeunes plantes

Répondre l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés séchés sur le sol, au stade 2 ou 3 feuilles, environ 10 g / m².

Pour une bonne contamination, l'hygrométrie doit être élevée. Pour cela, bien arroser les plantes la veille de la contamination et laisser le tunnel fermé. Puis arroser régulièrement.

3.3. Noter les symptômes

La date de notation dépend de la température hivernale. Il faut la choisir en fonction du développement de la maladie sur des témoins : moins de deux gaines foliaires attaquées sur des variétés possédant le gène *Pch1* (VPM, Roazon, Renan, Ralf, ...) et trois à quatre gaines attaquées sur des variétés sensibles (Moisson, Soissons, ...).

- Arracher les plantes en prenant soin de ne pas abîmer les gaines, les laver et écarter les gaines foliaires jusqu'à la dernière gaine attaquée sur laquelle le stroma du champignon est bien visible.
- Dénombrer les gaines attaquées de chaque plante.
- On peut aussi noter l'aspect du stroma qui permet de repérer facilement les plantes possédant le gène *Pch1* (Figure 2).



Présence du gène *Pch1* :
stroma peu développé de
couleur brune



Absence du gène *Pch1* :
stroma très développé de
couleur gris foncé à noir

Figure 2 : Nécrose des gaines foliaires en fonction de la présence ou de l'absence du gène *Pch1* de résistance au piétin-verse

4. TEST DE RESISTANCE AU PIÉTIN-VERSE AU STADE ADULTE

L'objectif est d'estimer la résistance de la tige à la colonisation par le champignon en estimant le pourcentage de nécroses des sections de tiges. Cette note représente la somme des effets de la résistance à la pénétration des gaines et à la colonisation des tiges. Ce type d'essai ne peut être réalisé que dans des régions à hiver doux et humide.

Les génotypes à tester sont semés sur N répétitions randomisées. Une date de semis précoce (15-20 octobre) est importante pour permettre de contaminer avant la période froide, le développement du piétin-verse dépendant directement de la somme de températures hivernales reçue. Le semis doit être dense : 90 grains environ sur une ligne de 1,50 m. Ceci permet de maintenir une hygrométrie élevée, favorable au développement du champignon, dans les parcelles. Chaque parcelle est ensuite délimitée à 1 m avec de la ficelle.

Une lignée très sensible au piétin-verse comme « Soissons » est semée entre chaque ligne à tester afin d'assurer une bonne contamination de l'essai et de minimiser les effets de voisinage (Figure 3).

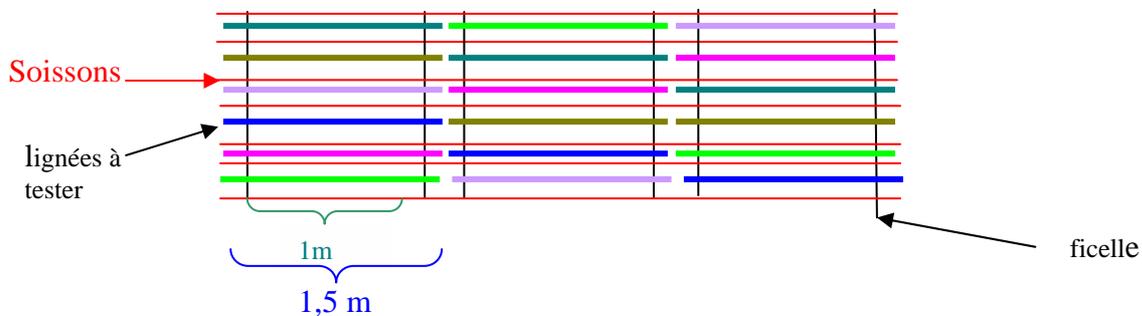


Figure 3 : Schéma de l'implantation au champ d'un test de résistance au piétin-verse.

La contamination des plantes se fait en répandant l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés séchés sur le sol au stade 2 - 3 feuilles en novembre, environ 10 g / m².

4.1. Notation des symptômes

La période de notation se situe entre la fin du gonflement et la fin du stade laiteux (une centaine de degrés-jour après la floraison). Il faut la fixer en fonction du développement de la maladie sur des témoins : noter dès que la différence entre les témoins résistants (VPM, Roazon, Renan, Ralf, ...) et les témoins sensibles (Moisson, Soissons) est significative. Il est utile de réaliser la notation en fonction de la précocité des variétés à tester et d'utiliser des témoins de précocités voisines. Si l'on attend trop longtemps pour noter, des saprophytes apparaissent et rendent difficile l'estimation de la part des nécroses due au piétin-verse. De plus, le champignon continue à se développer et la différence entre lignées résistantes et lignées sensibles devient moins visible.

- Arracher les plantes d'une même parcelle en ayant soin de ne pas abîmer le collet. L'expérience montre qu'un échantillon de 50 tiges prises au hasard donne une bonne représentation de la parcelle (ligne de 1 m).
- Couper les plantes à hauteur de 25 cm à l'aide d'une paire de ciseaux
- Nettoyer les tiges en enlevant les feuilles. Il ne doit plus rester que la tige à noter
- Couper au niveau de la plus grosse nécrose de piétin-verse

- Estimer à l'œil nu le pourcentage de section nécrosée par la maladie et répartir les tiges dans les classes d'attaque définies par le protocole. L'estimation du pourcentage de nécrose des sections de tiges peut varier avec l'observateur. Si le même notateur ne peut pas noter la totalité d'un essai, chaque notateur doit noter une répétition entière pour contrôler la variabilité due au notateur dans l'effet répétition (Figure 4).

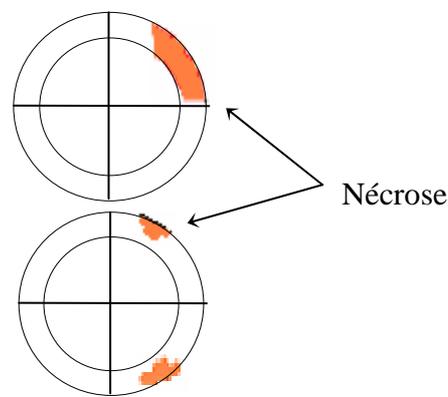
On peut :

- soit définir deux classes en fonction du niveau d'attaque des témoins sensibles et résistants.
- soit définir des classes à priori par exemple 6 classes : [sain], [1-<25], [25-<50], [50-<75], [75-<100], [100].

On calcule ensuite le pourcentage moyen de section attaquée à partir de la répartition des tiges en classes de chaque parcelle.



Symptômes au stade adulte



Exemple de tiges à mettre dans la classe [1-<25 %]

Figure 4 : *Symptômes de piétin-verse sur tige de blé et illustration de nécrose de section de tige.*

Il est important de faire en sorte que la notation d'un essai ne dure pas plus d'une semaine car l'attaque de piétin-verse peut évoluer rapidement après floraison et les génotypes notés à plus de cinq jours d'intervalle ne sont plus comparables entre eux. Si ce n'est pas possible, on peut arracher l'ensemble de l'essai et conserver les bases de tiges, soit dans une chambre froide à une température d'environ 5 °C et à l'obscurité pendant un maximum de 4 jours, soit pendant plusieurs mois dans un congélateur à -20°C.

DISPOSITIF D'ÉVALUATION PRÉCOCE DE LA RÉSISTANCE DU POMMIER À LA TAVELURE (*Venturia inaequalis*)

Bernard Petit¹, Pascale Expert², André Fouillet¹, Luciana Parisi² et François Laurens¹

Le pommier est la première espèce fruitière cultivée en France, la plus importante de ses maladies est la tavelure, un champignon ascomycète (*Venturia inaequalis*) qui provoque une défoliation précoce, des tâches sur les fruits qui peuvent aboutir à leur déformation, les déclassant ainsi pour la commercialisation.

La maîtrise de la tavelure en verger nécessite un programme phytosanitaire important, coûteux et dommageable pour l'environnement.

L'évaluation précoce en conditions contrôlées par un test rapide et fiable du niveau de sensibilité à la tavelure permet de sélectionner des géniteurs portant des résistances totales ou partielles afin de les inclure dans des programmes de création variétale. L'objectif final est d'obtenir des pommiers avec un niveau de résistance satisfaisant et durable pour l'arboriculture.

Le gène de résistance à la tavelure V_f a été mis en évidence en 1943. Il a fallu 50 ans pour créer des variétés porteuses du gène V_f et qui satisfassent les exigences commerciales. Dans les années 90 une race de *Venturia inaequalis* contourne le gène V_f . Cette nouvelle race (6) est encore peu répandue en Europe. L'année 1995 voit apparaître une autre race (7) qui aujourd'hui est répandue dans les vergers du nord de l'Europe.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODE

1.1. Le matériel végétal

Les variétés sont greffées fin janvier sur un porte-greffe vigoureux (MM 106), et placées en serre dans des pots de 1 litre avec un substrat de croissance composé essentiellement de terreau de feuilles et de tourbe blonde à pH 6,5. Pour avoir un matériel homogène, il est nécessaire de réaliser 10 greffes pour en utiliser 5 dans le test. Une période de trois semaines à 12–15°C permet une soudure effective entre le greffon et le porte-greffe. Une augmentation de la température (20°C) permettra ensuite aux bourgeons dormants des variétés greffées de pousser. Les tests sont réalisés après 10 à 12 semaines lorsque les pousses mesurent de 5 à 20 cm. L'état sanitaire des plantes a une grande importance, aussi des traitements préventifs sont réalisés 15 jours avant l'inoculation contre les acariens, les pucerons et l'oïdium. Ils n'affectent pas le développement de la tavelure. Pour prendre en compte l'hétérogénéité des conditions de la serre, les variétés sont réparties de façon aléatoire dans 6 blocs (répétitions). Des variétés et clones de différentes espèces de *Malus* sont inclus dans chaque expérimentation comme témoins. Elles sont choisies pour leurs comportements différents vis-à-vis des souches de tavelure testées :

- Gala, témoin de sensibilité à la tavelure
- Golden Delicious, sensible à la plupart des races mais résistante à la race 7
- *Malus floribunda* 821, clone d'origine du gène V_f , résistant à la race 1 et à la race 6

¹ UMR GENHORT, INRA, INH, UA Dépt. GAP

² UMR PAVE, INRA, INH, UA Dépt. SPE

Centre INRA d'Angers – 42, rue Georges Morel – 49071 BEAUCOUZE CEDEX

1.2. Préparation de l'inoculum et inoculation des pommiers

1.2.a. L'inoculum

• **Obtention des souches de *Venturia inaequalis* et multiplication sur feuilles**

Les souches sont isolées en verger à partir de tâches sporulantes de tavelure sur feuille ou fruit. Les spores récupérées par grattage au scalpel, mises en suspensions, sont étalées sur boîtes de Pétri. Chaque spore isolée est prélevée et mise en culture donne une souche. Chaque souche ainsi obtenue est rentrée sous numéro en collection dans des tubes gélosés en chambre climatique à 4°C.

Une première multiplication est réalisée sur milieu malt liquide en fioles de Roux. Une suspension de spores est obtenue dix à douze jours après. Pour la production d'une grande quantité de conidies, la suspension est pulvérisée sur de jeunes plants de pommier sensibles issus du croisement Golden Delicious X Granny Smith. Les conditions favorables au développement du pathogène (chambre climatique 20°C -HR= 80 à 99%) vont nous permettre dix jours après, de récupérer une grande quantité de feuilles tavelées (porteuses de spores). Celles-ci sont séchées à température ambiante et congelées à -20°C, elles serviront de base pour la préparation de l'inoculum.

• **Préparation de l'inoculum**

Les feuilles « tavelées » issues de la multiplication sur jeunes plants sensibles, sont immergées et brassées dans un bêcher d'eau distillée. Le mélange est filtré avec une gaze pour éliminer les débris végétaux. Au microscope, on compte à la cellule de Mallassez les spores en suspension et on ajuste si nécessaire la dilution. Pour les tests, nous utilisons 300.000 spores/ml. Des gouttes sont déposées dans des boîtes de Pétri avec milieu gélosé, pour évaluer 24h après le pourcentage de germination des conidies au microscope.

1.2.b. Conditions environnementales

Les tests sont réalisés en serre permettant la maîtrise des conditions environnementales. Celle-ci permet d'autre part de garantir un bon confinement pour éviter la dissémination des souches virulentes de tavelure (sas, blouses et sur-chaussures jetables). Les conditions optimales nécessaires au développement de la tavelure sont :

- une température entre 17 et 18°C. Elle est maintenue en fonction des conditions extérieures par : chauffage, ombrage (durant les fortes insulations), cooling et brumisation. Les tests sont réalisés au printemps et/ou à l'automne pour s'affranchir des fortes températures.
- une hygrométrie maintenue entre 80 et 100% assurée par : un arrosage au sol et une brumisation. Durant les premières 48 heures après l'inoculation, une bâche en plastique est disposée sur les plants pour maintenir une humectation pendant la période de germination du champignon pour pénétrer dans le végétal, (Chevalier *et al.* 1991).

1.2.c. Inoculation

L'inoculation est réalisée par brumisation, avec un pulvérisateur domestique. Le but est de déposer sur le végétal une fine pellicule (rosée) de suspension. Le dépôt doit être homogène sans lessiver les conidies par de trop grosses gouttelettes.

1.3. Lecture des symptômes de résistance

Les conidies déposées sur les limbes vont émettre un tube germinatif et pénétrer entre le limbe et la cuticule. Les variétés sensibles ne réagissent pas à cette attaque et le mycélium se développe par tâches concentriques sur la feuille au bout de 7 à 8 jours. A l'inverse, les variétés qui portent une résistance vont déclencher différents types de réactions qui freineront plus ou moins le développement du champignon. Les symptômes sont visibles macroscopiquement de 10 à 13 jours après l'inoculation. Trois types de notation sont utilisés pour apprécier le degré de résistance des variétés.

1.3.a. Grille de notation des symptômes (d'après Chevalier et *al.* 1991)

Note	Description des réactions
0	Aucune réaction ni sporulation ne sont visibles sur les feuilles. La plante est résistante à la race testée.
1	Une réaction est visible sous forme de piqûre d'épingle due à un affaissement des cellules autour de l'impact de la tavelure. Aucune sporulation n'est visible. La plante est résistante.
2	Aucune sporulation n'est visible macroscopiquement, les feuilles réagissent, elles se crispent voire se nécrosent. La plante est résistante.
3a	On observe une réaction des feuilles qui se gaufront ou se crispent, avec une légère sporulation qui est séchante. La plante est considéré comme résistante.
3b	sporulation qui tend plus ou moins à s'étendre. La plante est considérée comme moyennement sensible, elle réagit mais ne bloque pas totalement le développement de la tavelure.
4	Aucune réaction visible, la tavelure se développe de manière importante sur le limbe. Cette plante est sensible.

Tableau 1 : Classes et symptômes correspondants

1.3.b. Sévérité de la sporulation (Croxal et *al.*, 1952 modifiée par Parisi et *al.*, 1993)

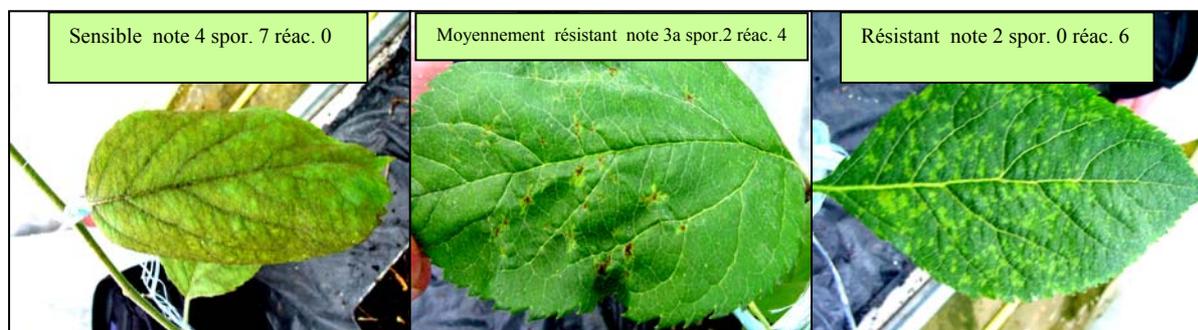
Cette échelle estime le % de surface sporulante sur la feuille. Elle est exponentielle, avec de nombreuses classes à faible pourcentage.

classe	0	1	2	3	4	5	6	7
% de la surface sporulante	0%	0,1 à 1%	1,1 à 5%	5,1 à 10%	10,1 à 25%	25,1 à 50%	50,1 à 75%	75,1 à 100%

Tableau 2 : Echelle de notation de la sévérité de la sporulation

1.3.c. Sévérité des réactions

Afin de conforter notre système de notation des symptômes de résistances, nous évaluons l'importance des surfaces qui réagissent. Cette notation suit la même échelle que celle proposée dans le tableau 2.



photos : quelques exemples de symptômes observés

2. RESULTAT ET INTERPRETATION

2.1. Résultat de l'observation macroscopique des symptômes

Entre 1998 et 2003 plus d'une centaine de variétés et de géniteurs ont été testés avec différentes souches. Les résultats se sont montrés très fiables, en effet les symptômes sont observés, par variété inoculée avec une même souche, plusieurs années (Laurens et *al*, 2004). Nous présenterons ici quelques-uns des résultats les plus marquants ainsi que ceux obtenus sur quelques variétés récemment créées par l'INRA d'Angers.

	1996, race 1 souche 104			1998, race 6, souche 302			2001, race 7, souche 1066			2003, souche NL24		
	Symptôme	sporulat°	réact°	Symptôme	sporulat°	réact°	Symptôme	sporulat°	réact°	Symptôme	sporulat°	réact°
Golden D.	4	5	0	4	3	0	3b	3	4	4	7	0
Gala	4	4	0	4	5	0	4	6	0	4	7	0
<i>Malus flo. 821</i>	0	0	0	0	0	0	4	7	0	4	2	0
Belle Fille de l'Indre	4	7	0	4	4	0	4	5	0	4	5	0
La Paix	2	0	4	3b	2	4	2	0	5	--	--	--
Pdt Roulin	3a	2	3	3a	2	4	1	0	3	--	--	--
Ariane	2	0	2	4	3	0	3b*	1	3	4	7	0
Doriane	2	0	3	3b	6	3	3b*	4	2	4	6	0

* symptôme de type Vg (nécrose en étoile)

Tableau 3 : Niveau de résistance des variétés, sévérités, des symptômes et de la sporulation

2.2. Interprétation des observations (tableau 3)

Golden Delicious et Gala sont bien connues pour leur sensibilité à la tavelure en verger. Elles sont utilisées comme témoins sensibles dans la plupart de nos tests. Sur Golden on observe des symptômes de résistance à la race 7 avec peu de sporulation et une forte réaction. Le champignon est freiné dans sa progression. En effet, Golden est porteur du gène Vg qui apporte une résistance à cette race.

M. floribonda 821 est résistant aux races 1 et 6 mais sensible à la race 7.

Belle Fille de l'Indre, une variété locale, est très sensible à l'ensemble des races.

La Paix, Président Roulin, variétés anciennes, ont un comportement assez intéressant vis à vis des différentes races de tavelures. En effet on ne distingue pas de résistance totale aux races testées, mais plutôt une résistance de type partiel.

Ariane et Doriane sont 2 nouvelles variétés créées à l'INRA d'Angers. Elles sont porteuses du gène Vf et donc résistantes à la race 1. Elles sont toutes les 2 fortement sensibles aux souches 302 et NL24, et présentent des symptômes de résistances de type Vg (nécrose en étoile). La nouvelle race NL24 provoque une sporulation intense sur les variétés testées (tableau 3). Toutefois nous avons trouvé, dans le matériel testé, des variétés résistantes à cette nouvelle race.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test nous donne entière satisfaction pour la fiabilité et à la rapidité de réponse. Il permet ainsi d'évaluer de manière précoce la résistance/sensibilité de variétés vis à vis de la tavelure. Les objectifs majeurs du programme d'amélioration développé à l'INRA d'Angers sont d'augmenter la résistance durable de géniteurs potentiels en combinant une résistance monogénique et polygénique. La méthodologie du test présenté dans cet article pourrait être

adaptée pour caractériser des hybrides au stade semis vis-à-vis de plusieurs souches de tavelure. En complément, des travaux de recherches sont également réalisés pour évaluer la faisabilité et l'efficacité de la sélection assistée par marqueurs moléculaires (SAM) pour combiner différents mécanismes de résistance.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient François Lebreton, Lysiane Leclout, Michel Boucourt pour le travail réalisé sur ces essais et leur souci constant de les perfectionner.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chevalier M., Lespinasse Y. and Renaudin S. A microscopic study of different classes of symptoms coded by the V_f gene in apple for resistance to scab (*Venturia inaequalis*). *Plant Pathology* (1991) 40, 249-256
- Croxal H. E., Gwynne D.C., and Jenkins J.E. The rapid assessment of apple scab on leaves. *Plant Pathology* (1952) 1, 39-41.
- Parisi L. et al. (1993) A new race of *Venturia Inaequalis* virulent to apples with resistance due to the V_f gene. *Phytopathology* 83 :533-537
- Laurens F.*, Chevalier M., Dolega E., Genari F., Goerre M., Fischer C., Kellerhals M., Lateur M., Lefrancq B., Parisi L., Schouten H., and Tartarini S., 2004. Local european cultivars as sources of durable scab resistance in apple. *Acta Horticulturae*, (sous presse)
- Expert P. et al, (2005) Dispositif d'évaluation des niveaux de sensibilité des variétés de pommier à la tavelure en verger. *Le Cahier des Techniques* de l'INRA, numéro spécial

DISPOSITIF D'ÉVALUATION DES NIVEAUX DE SENSIBILITÉ DES VARIÉTÉS DE POMMIER A LA TAVELURE EN VERGER

*Pascale Expert¹, Valérie Fouillet¹, Bernard Petit², Frédérique Didelot¹,
François Laurens², Luciana Parisi¹*

La tavelure est la maladie la plus importante du pommier, elle déprécie commercialement le fruit. Choisir des variétés résistantes est une des solutions face à cette maladie. En complément des études faites en serre sur plantes greffées en pots (Petit et al, 2005), cet essai a donc pour objectif de connaître la sensibilité de variétés de pommiers en verger soumis à un inoculum de *Venturia inaequalis* présent naturellement. La difficulté est d'obtenir une répartition homogène du pathogène sur la parcelle, mais aussi de trouver un système de notation prenant en compte l'arbre dans son ensemble. La suite de l'article présente les solutions trouvées face à ces difficultés techniques ainsi que les résultats de l'étude.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Vingt variétés

Essai en bloc avec 4 répétitions

Parcelle élémentaire : 6 arbres de la même variété.

1.2. Matériel végétal

L'implantation du verger sur le domaine du Bois l'Abbé à Beaucouzé (49) date de mars 1999. Les vingt variétés sont plantées sur porte-greffe M9-Pajam2. Les variétés européennes ont été choisies pour leur résistance monogénique ou partielle. La surface est de 0,45 ha. L'inter-rang est de 4m, la distance entre arbre de 1,5m.

1.3. Inoculum

La difficulté réside dans l'impossibilité de contamination artificielle. Aussi afin de favoriser le développement de la tavelure, une variété très sensible (Gala) est plantée régulièrement dans tout le verger. La disposition des arbres a été réfléchi pour avoir une bonne répartition de foyers de la maladie. Ainsi, l'ensemble de la parcelle est entourée de rangs de Gala. Tous les 4 rangs : 1 rang de Gala. Sur le rang, tous les 6 arbres : 1 arbre de Gala.

D'autre part, le verger est situé près d'une étendue d'eau, ce qui génère des conditions humides favorables au champignon. De plus, le système d'arrosage par sprinkler a été installé au dessus de la frondaison des arbres augmentant les chances de contamination.

Par ailleurs, pour le bon développement du pathogène, aucun traitement phytosanitaire anti tavelure n'est appliqué, et les fongicides choisis contre l'oïdium ou le chancre n'ont pas ou peu d'effet sur la tavelure.

¹ UMR PAVE, INRA, INH, UA Dépt. SPE

² UMR GENHORT, INRA, INH, UA Dépt. GAP

Centre INRA d'Angers – 42, rue Georges Morel – 49071 Beaucouze Cedex

Deux inoculum composent le cycle du champignon (cf. figure 1). L'inoculum primaire qui est constitué par les ascospores contenues dans les périthèces dans les feuilles mortes au sol. Leur projection nécessite une pluie de 0,2mm au moins. L'inoculum secondaire constitué de conidies. Plusieurs cycles secondaires ont lieu au cours de la saison (Biggs, 1990).

Les contaminations se font selon les conditions météorologiques (Schwabe, 1982). Une pluie ou une rosée avec une durée d'humectation variable suivant la température est nécessaire à la germination des ascospores et conidies. Les conidies sont ensuite disséminées par les projections d'eau et par le vent.

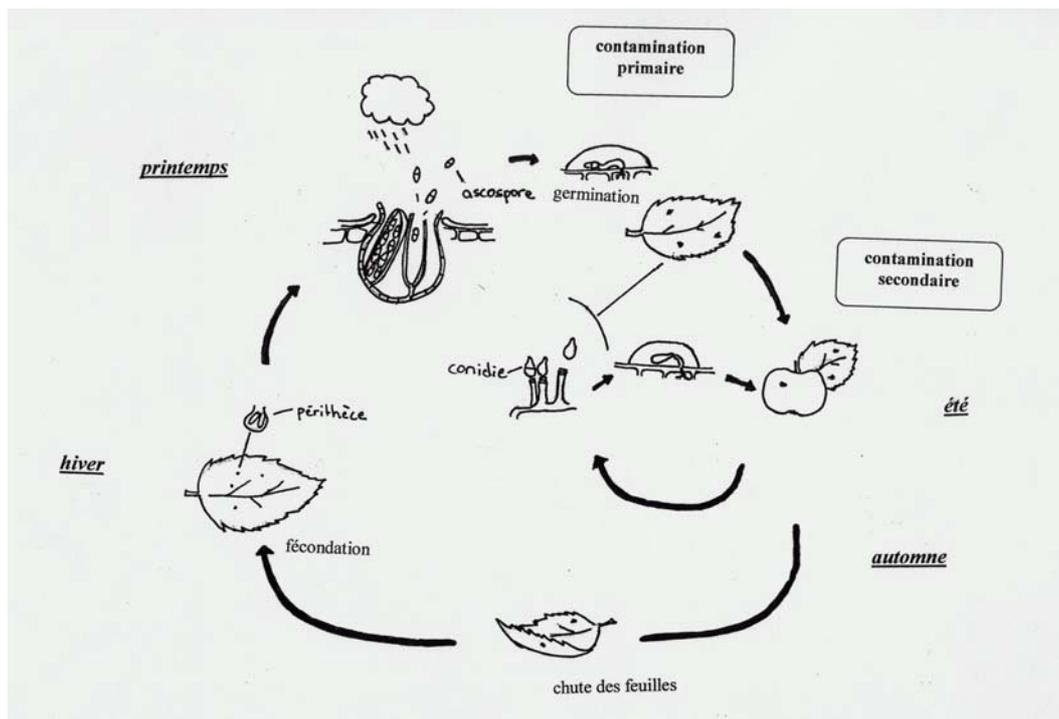


Figure 1 : Cycle de la tavelure (d'après Agrios, 1978 - schéma Pascale Expert

1.4. Système de notation

• sur feuille

Il est nécessaire de disposer d'une notation qui prenne en compte l'ensemble de l'arbre et qui soit relativement rapide. Pour cela une échelle représentant le niveau d'attaque de l'arbre dans sa globalité est utilisée (cf. tableau 1).

Les symptômes se présentent sous forme de tâches circulaires brun olivâtre avec un aspect velouté, en face supérieure ou inférieure.

Trois notations ont été réalisées à des périodes différentes (figure 1) sur tous les arbres des 4 blocs, à des périodes différentes :

- printemps (fin de première période de contamination)
- mi été (contamination secondaire)
- septembre (contamination secondaire)

Pour chacune, la médiane des notes est calculée.

Les périodes de contaminations et les projections d'ascospores (Machardy, Gadoury, 1989) peuvent être connues grâce à un logiciel de prévision des risques (logiciel Vintage) couplé à

une station météo (Cimel) ou aux avertissements agricoles fournis par le SRPV. Pour chaque notation il nous renseigne sur le risque potentiel et la présence d'ascospores ou de conidies.

Classe	Observation	Niveau de sensibilité
0	pas d'observation (arbre manquant,...)	x
1	pas de symptôme macroscopique visible	résistant
2	quelques tâches de tavelure sont détectées après un examen approfondi de l'arbre	très peu sensible
3	tavelure visible immédiatement, avec des lésions très fines, éparpillées dans l'arbre	peu sensible
4	niveau intermédiaire	
5	infection répartie sur l'arbre : la majorité des feuilles ont au moins une tâche de tavelure	moyennement sensible
6	niveau intermédiaire	
7	infection importante : multiples lésions ou large surface tavelée sur la plupart des feuilles. Les feuilles tavelées finissent par tomber	sensible
8	niveau intermédiaire	
9	infection maximum : presque toutes les feuilles sont noires de tavelure	très sensible

tableau 1 : *Echelle globale*

• sur fruit

Le fruit atteint présente des tâches noires légèrement feutrées, évoluant en croûte liégeuse (photo 1).

Une seule notation est faite en septembre avant la récolte, même si les fruits peuvent être attaqués par la maladie dès leur apparition.

Sont notés tous les fruits de chaque arbre portant plus de cinq fruits.

Le pourcentage de fruits atteints mesure l'incidence de l'attaque.



photo 1 : *symptômes sur fruit (François Laurens)*

1.5. Remarques sur l'essai

Le système de notation globale est fiable, car on constate peu de variation pour une même variété. L'implantation a en effet permis une pression homogène de la tavelure. Cela est aussi confirmé par sa présence sur chaque arbre de Gala situé entre les variétés.

Les conditions climatiques variant d'une année à l'autre et celles-ci ayant une influence sur la maladie, il est donc indispensable de noter ce type d'essais plusieurs années de suite.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Le tableau ci-dessous présente les résultats de l'année 2001 sur quelques unes des variétés de l'essai.

variété	origine	note sur feuille (médiane)			incidence sur fruits (%)
		mai	juillet	septembre	septembre
Gala	NZL	7	5,5	7	97,2
Golden Delicious	USA	4	4	6	93,6
Fiesta	GB	4	3	6	69,6
Reinette Clochard (1)	F	3	3	4	45,7
Lombarts Calville (1)	F	2	2	2	34,6
TN-10-8 (1)	F	2	2	2	17,4
Président Roulin (1)	B	1	1	1	10,3
Decio (1)	I	2	2	2	9,4
Prima (2)	USA	1	1	1	0,4
Priscilla (2)	USA	1	1	1	0

(1) Variétés à résistance polygénique – (2) Variété à résistance monogénique : gène Vf

Tableau 2 : Résultats 2001

D'après les résultats des mesures sur feuilles et fruits (tableau 2), on peut classer les variétés comme il suit :

Très Sensibles : Gala, Golden delicious

Sensible: Fiesta

Moyennement sensible : Reinette Clochard, Lombarts Calville.

Peu sensibles: TN-10-8, Decio, Président Roulin

Résistantes : Prima, Priscilla

Pour les variétés dites sensible à très sensibles, nous constatons une évolution au cours du temps de la note médiane sur feuille. Elle baisse pour le mois de juillet qui est une période relativement sèche, pour augmenter à nouveau très fortement au mois de septembre, mois beaucoup plus humide.

Les conditions climatiques ont donc leur importance sur l'atteinte des arbres par la maladie.

Les variétés portant le gène de résistance Vf n'ont aucune infection visible sur feuille. Cependant la variété Prima a subi une attaque (bien que légère) sur fruit. On assiste donc à un début du contournement du gène par l'agent pathogène sur cette variété.

Les variétés Lombarts Calville, TN-10-8 et Decio ont la même sensibilité sur feuille, mais l'incidence sur fruit varie de 9,4 à 34,6%. D'autre part la variété Président Roulin ne présente aucun symptôme sur feuille, alors que ses fruits sont infectés à 10%. Cela démontre que les notations sur feuilles et sur fruits ne sont pas toujours corrélées.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Avec cette étude en condition réelle d'exploitation, nous avons obtenu un classement des différentes variétés selon leur sensibilité. Nous constatons un contournement du gène de résistance Vf (Parisi et al, 1993) Il est donc utile de s'intéresser aux variétés à résistance polygénique, même si elle est plus difficile à évaluer.

Pour ce type de résistance, les résultats sur fruits peuvent être différents de ceux sur feuilles. C'est pourquoi il est bien nécessaire de compléter les essais faits en serre sur plants par des essais en verger, d'autant plus que c'est le fruit qui est ensuite commercialisé.

Il apparaît aussi utile de poursuivre ces études sur plusieurs années. D'une part, parce que les conditions météorologiques sont variables d'une année à l'autre. D'autre part, pour connaître la durabilité dans le temps de la résistance des variétés à la tavelure et ainsi choisir les futurs parents de nouvelles variétés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Biggs A.R (1990) Apple scab. In Compendium of Apple and Pear Disease – APS Press, StPaul, Minesota p6-9
- Schwabe WF (1982) Wetting and temperature requirements for apple leaf infection by *Venturia inaequalis*.
- Machardy WE, Gadoury DM (1989). A revision of Mill's Criteria for Predicting Apple Scab Infection Periods. *Phytopathology* 79 : 304-310
- Parisi et al. (1993) A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene –*Phytopathology* 83 : 533-537
- Petit et al (2005) Dispositif d'évaluation précoce de la résistance du pommier à la tavelure (*Venturia inaequalis*). *Le Cahier des Techniques* de l'INRA, numéro spécial

TEST DE RESISTANCE DU TOURNESOL AU MILDIOU (*Plasmopara halstedii*) EN CONDITIONS CONTROLEES

Sylvie Roche¹, Pascal Walser¹, Frédéric Serre¹

Depuis 1966, date de la première apparition du mildiou (race 100) en France, l'INRA a développé un outil de sélection du tournesol pour lui faire face. Ce test effectué sur graines germées, révèle rapidement la présence ou l'absence d'une résistance monogénique (gènes *PI*). Sa réalisation en chambre de culture le rend reproductible. Sa mise en œuvre sur les onze nouvelles races de mildiou apparues depuis 1988 permet une sélection du tournesol encore efficace. Cependant des résistances de type monogénique tendent vers leurs limites.

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Matériel

Semences en cours de sélection et témoins différentiels. Boîtes de Pétri de différents diamètres selon les quantités de graines, papier filtre, hypochlorite de sodium à 12°Chloré, terrines, substrat, étiquettes, sac polyéthylène.

1.2. Méthode

Les graines sont mises à tremper (4 heures) dans les boîtes de Pétri préalablement numérotées et munies de leurs papiers filtres. Après le trempage, vider l'eau en excès, les placer à 18-20°C. Soixante-douze heures sont nécessaires pour obtenir des radicules ayant 0,5 cm de longueur en moyenne. Cette durée peut être réduite à 48h en plaçant les graines à 25°C (étuve). Cependant il est préférable d'éviter ces températures sur du matériel non désinfecté car de nombreux parasites peuvent alors se développer sur les graines. La désinfection est réservée pour du matériel précieux. Les graines sont plongées dans une solution d'hypochlorite de sodium durant trois minutes. Rincer abondamment à l'eau courante jusqu'à disparition de l'odeur « chloré ».

Levée de dormance

Durant les deux mois qui suivent la récolte des graines, un produit libérant de l'éthylène est ajouté à l'eau de trempage afin de lever la dormance (50µl d'éthéphon par litre).

1.3. Préparation du matériel fongique en laboratoire

L'inoculum est produit à partir de plantules âgées de deux semaines préalablement infectées (Cohen & Sackston, 1973). La sporulation est provoquée en maintenant une humidité saturante durant 48 heures à une température de 18°C. Les spores sont récupérées en immergeant les cotylédons dans de l'eau et en agitant fortement. Nos études ont montré que les zoospores (propagules contaminantes) sont libérées dans la demi-heure qui suit la mise en suspension. Peu de zoospores restent visibles après six heures. Après la mise en suspension, l'inoculum doit donc être utilisé rapidement, il ne peut pas être conservé plusieurs jours de

¹ UMRE INRA ASP - Université Blaise Pascal 234 Avenue du Brézet 63039 Clermont-Ferrand cedex 02

manière fiable. Pour conserver des spores viables quelques jours, les cotylédons sporulant sont mis à sécher à température ambiante puis placés au frais (4°C).

1.4. Préparation de l'inoculum, inoculation et repiquage (figure 1)

Pour préparer la suspension de spores, les cotylédons qui présentent une sporulation sont lavés à l'aide d'un petit jet d'eau (petit pulvérisateur réservé à cet usage) ou bien mis directement dans de l'eau dans un récipient qu'on agite (type shaker). La concentration de l'inoculum doit être voisine de 100 000 sporanges / ml. Dans la pratique, nous ne dosons l'inoculum que lorsqu'il y a un doute sur sa qualité (faible sporulation sur cotylédon).

Inoculation des semences.

Les graines germées sont mises à tremper dans cette suspension. Le trempage doit durer 3 à 4 heures pour que l'infection soit réussie et s'effectuer à une température ambiante se situant entre 16 et 18°C. A ce stade, la température doit être contrôlée. En effet, des températures trop faibles ou trop fortes présentent des risques pour la fiabilité du test (mauvaise germination ou destruction des spores). L'eau utilisée pour préparer la suspension est de l'eau du robinet car malgré les produits de traitement de cette dernière, nous n'avons à ce jour pas remarqué de problème. En cas de doute, il est recommandé d'utiliser de l'eau permutée. Il est important de veiller à l'immersion totale des graines durant le trempage.

Repiquage.

Il s'effectue en terrines, préparées le temps du trempage des graines. Plusieurs substrats peuvent être utilisés (terreau, sable, vermiculite). Chaque utilisateur doit, avant de commencer des tests, s'assurer que son substrat est adéquat en cultivant un témoin sensible de référence. Par expérience, nous savons que le changement de substrat peut intervenir sur l'expression des symptômes de mildiou. A l'INRA de Clermont-Ferrand nous utilisons le support de culture Klasmann Seedlingsubstrat NF U 44-551.

Seules les graines ayant un germe de taille supérieure ou égale à 5 mm sont repiquées. Si des génotypes n'ont pas bien germé, elles peuvent être gardées 24 heures de plus et refaire une infection le lendemain, à condition d'avoir conservé des cotylédons sporulés afin de préparer un nouvel inoculum. Les graines repiquées sont placées avec soin dans des trous fait auparavant pour ne pas casser les germes ou le mildiou a pénétré. La graine est en surface, seule la racine est enterrée. Ce repiquage en surface a l'avantage d'assurer un développement rapide de la partie aérienne afin d'obtenir les premières feuilles lors de la lecture du test. Après le repiquage, un arrosage est nécessaire car il permet de mettre la racine en contact avec le substrat.

Développement.

Alimentation hydrique : La quantité d'eau apportée durant les douze jours suivant, varie en fonction des chambres climatiques. Un excès d'eau est à éviter car le mildiou se développe trop vite, les sporulations apparaissent trop tôt et la maladie entraîne une fonte des semis. La lecture du test est alors impossible. Il est préférable que les plantules soient en situation de légère sécheresse huit jours après le repiquage.

Il est souhaitable d'avoir un taux d'humidité voisin de 70 %.

Photopériode : Il faut chercher à obtenir des plantules non étiolées mais nous savons qu'un excès de lumière est néfaste au bon déroulement du test. Avec une intensité de 12 000 lux, le test se déroule de manière optimale. La photopériode est de 16 heures.

Température : Pour un bon développement des plantules et pour ne pas gêner le bon déroulement de l'infection la température idéale dans la chambre de culture se situe entre 17 et 19°C au niveau des plantes.

2. SYSTEME DE NOTATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Douze jours après le repiquage, les terrines sont mises en conditions d'humidité saturante. Pour cela, nous les plaçons dans des sacs plastiques. La lecture s'effectue 48 heures après. Avec la diversification des sources de résistance, trois cas peuvent se présenter :

a - porte sporulation sur les feuilles et les cotylédons
= Sensible Type **S**

b - pas de spores sur feuilles mais sur les cotylédons avec ou sans nécroses
= Résistance Type **R II**

c - absence totale de spores sur les feuilles et les cotylédons
= Résistance type **R I**

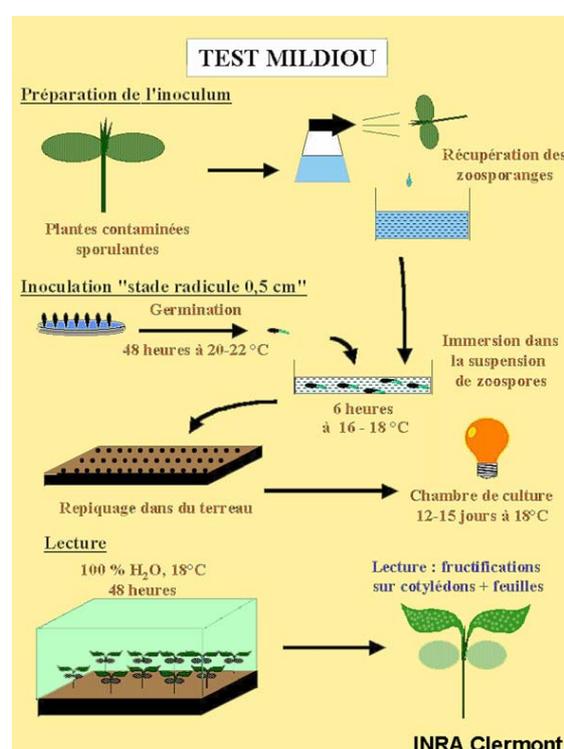
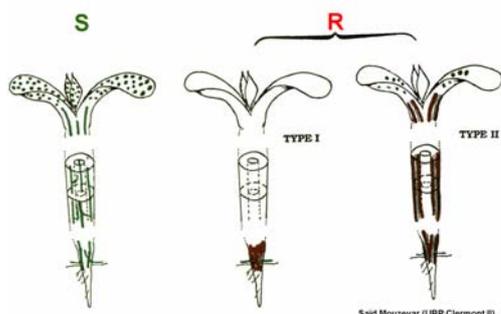
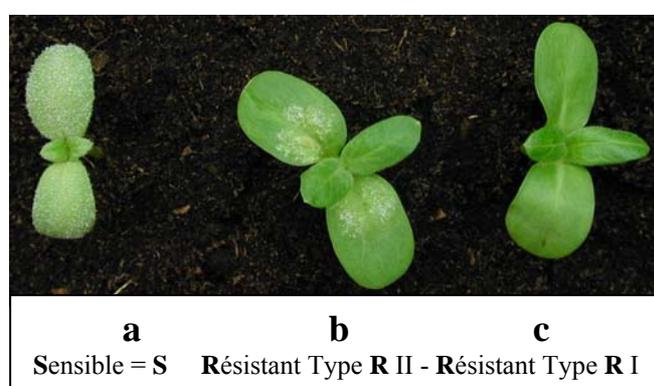


Figure 1 : Préparation de l'inoculum, inoculation et repiquage

Remarque

Si une même équipe doit travailler avec plusieurs races de mildiou, quelques précautions sont à prendre. Il est nécessaire de séparer les races en lieu et temps. Il faut disposer de chambres de culture distinctes et si possible, faire sporuler ces races à des jours différents. Aucun matériel n'est à utiliser en commun entre ces différentes races de mildiou (pulvérisateur, terrines, boîtes de germination...).

Il faut penser à utiliser des lignées discriminantes pour vérifier qu'un mélange de races n'a pas eu lieu. De plus, les témoins de sensibilité sont différents d'une race à l'autre.

3. CONCLUSION

Lors de sa mise au point en 1966, ce test répondait à l'exigence du moment qui était le contrôle de la seule et unique race présente en France. Dès 1988 un nouveau pathotype de mildiou a contourné le gène de résistance. Depuis, avec ce test, de nouveaux gènes ont été trouvés pour chaque nouvelle race. Celui-ci permet toujours de sélectionner en fonction de l'évolution de ces races. La manipulation des races devient lourde à gérer (organisme de quarantaine, chambres S3). En effet une race implique une chambre de culture climatisée spécifique et plusieurs personnes. A ce jour 4 races sont utilisées en sélection. Il est peu probable que la multiplication des installations puisse perdurer, sachant que les races présentes sur le territoire sont au nombre de huit.

4. PERSPECTIVES

L'évolution rapide des races de mildiou nous amène à orienter les recherches sur les résistances durables. Le contournement systématique des gènes des nouveaux hybrides mis sur le marché est une réalité. L'ensemble de la profession est conscient de la problématique. En effet il faut raisonner sur le long terme afin de ne pas favoriser le bio agresseur et se priver de toute parade. Plusieurs stratégies sont étudiées à l'heure actuelle :

- rotation longue avec alternance des sources de gènes.
- utilisation de variétés composites cumulant toutes les sources de gènes la même année.
- une résistance de type horizontale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cohen Y., Sackson W.E., 1973. – Factors affecting infection of sunflowers by *Plasmopara halstedii*. Can. J. Bot., 15-22
- Tourvielle de Labrouhe, D. (1999) La nouvelle nomenclature des races de *Plasmopara halstedii*, agent du mildiou du tournesol, appliquée aux races françaises. OCL, 6 : 219-221.
- Tourvielle de Labrouhe, D., (2000) et al. Le mildiou du tournesol. Points techniques. Paris – France : CETIOM-INRA Editions 2000. 176 p.

DETECTER ET CARACTERISER LES GENES D'AVIRULENCE DE *Leptosphaeria maculans* SUR COLZA AU STADE COTYLEDONAIRE

Magali ERMEL¹, Virginie HUTEAU²

Le **Phoma** du colza, ou Nécrose du collet, est causé par le champignon phytopathogène *Leptosphaeria maculans* (forme sexuée de *Phoma lingam*). C'est suite à l'intensification de la culture du colza que la maladie est devenue préoccupante pour les producteurs. Cette maladie génère des pertes de rendement estimées entre 5 et 20 %.

Le test permet de **détecter** et de **caractériser** les **gènes d'avirulence** présents dans différentes populations de *Leptosphaeria maculans* en utilisant une gamme différentielle de lignées de colza ou d'autres crucifères dont les **gènes de résistance** sont connus. Ce test est réalisé au **stade cotylédonaire** et en **conditions contrôlées**.

1. MATERIELS ET METHODES

- Enceinte climatisée.
- Terrine percée (30 cm x 44 cm et 10 cm de hauteur) + plateau (32 cm x 46 cm et 2 cm de hauteur).
- Substrat (mélange 1/3 terreaux, 1/3 sable et 1/3 terre).
- Couvercle (32 cm x 46 cm, hauteur 11,5 cm).
- Lien rigide (Filiac 4000054 – Ligaplast 4 mm - 10 cm vert).
- Etiquette en plastique
- Multipette + pointe de pipette à déplacement direct de 500 µL.
- Aiguille fine.
- Boîte de Pétri.
- Papier filtre stérile.
- Graines.
- Suspension de pycniospores à 10⁷ spores/mL.

1.2. Méthode

1. 2.a. Préparation de l'inoculum

- Récupérer les ascospores sur eau gélosée (gélose à 20g/L + 1 mL de streptomycine à 1%) à partir de périthèces présents sur les pailles de colza.
- Isoler les ascospores sous loupe binoculaire et repiquer individuellement chaque ascospore sur malt gélosé (20g/L d'agar + 20g/L de malt + 1 mL streptomycine à 1%).
- Mettre en culture des souches sur V8 (25g/L d'agar + 180mL/L de jus de légumes + 1 mL streptomycine à 1%).
- Placer les boîtes pendant 10 jours à 20°C et à environ 20 cm au-dessous d'une source de lumière noire (Réf : OSRAM L 40 W/73) avec une photopériode de 16H de lumière.
- Mettre de l'eau stérile à 4°C dans les boîtes afin de recouvrir tous les explants, racler les spores et filtrer le tout sur une gaze stérile dans un récipient stérile. Conserver immédiatement le filtrat obtenu dans de la glace pilée
- Réaliser ensuite un comptage à la cellule de Malassez, puis diluer avec de l'eau stérile si nécessaire afin d'obtenir une suspension de pycniospores à 10⁷ spores/mL.
- Aliquoter en tube de 5 mL et de 10 mL et conserver à -20°C.

¹INRA, UMR BIO3P, 35653 Le Rheu.

²INRA, UMR APBV, 35653 Le Rheu.

1.2.b. Préparation du matériel végétal

- **Prégermination** : Disposer les graines dans de grandes boîtes de Pétri sur 2 feuilles de papier filtre stérile imbibées d'eau. Laisser à température ambiante pendant 3 jours.

- **Repiquage** : Repiquer les graines germées dans une terrine contenant un mélange terreux en tenant la jeune plante par l'extrémité de la racine et l'enfoncer dans le terreau. Maintenir les terrines en serre à une température de $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ et à une photopériode de 16h de jour et 8h de nuit (en hiver apporter en fonction de la longueur du jour un supplément d'heures de lumière artificielle).

Arroser les terrines par capillarité avec modération (le terreau ne doit surtout pas être détrempé). Trois à quatre jours après le repiquage, tuteurer les plantes avec des liens rigides.

- **Inoculation** : Si nécessaire, couper les feuilles. Puis, à l'aide d'une aiguille, réaliser une légère blessure au centre de chaque lobe cotylédonaire (il ne faut surtout pas transpercer complètement le cotylédon). Déposer une goutte de $10 \mu\text{L}$ d'une suspension de pycniospores à 10^7 spores/mL à l'aide d'une multipette sur la piqûre. Maintenir une humidité relative saturante pendant 24h à l'**obscurité** à l'aide d'un couvercle. Les terrines doivent être placées dans une enceinte ayant une température de $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 16h de jour et une température de $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 8h de nuit. L'enceinte doit être maintenue à une humidité relative d'au moins 80 %.

- **Répétition** : Inoculer 2 plantes par souche dans 2 répétitions (dans 2 plateaux différents) = quatre plantes par lignée/souche.

Supprimer les nouvelles feuilles régulièrement afin de ne conserver que les cotylédons.

Mettre 25% de graines en plus à germer pour être sûr d'avoir la quantité nécessaire de graines pour réaliser le test.



Dans une terrine on peut mettre sept plantes maximum dans la longueur et six plantes maximum dans la largeur, soit 42 plantes au total dans une terrine. On peut tester sept souches par terrine (une répétition).

Figure 1 : Organisation d'une terrine

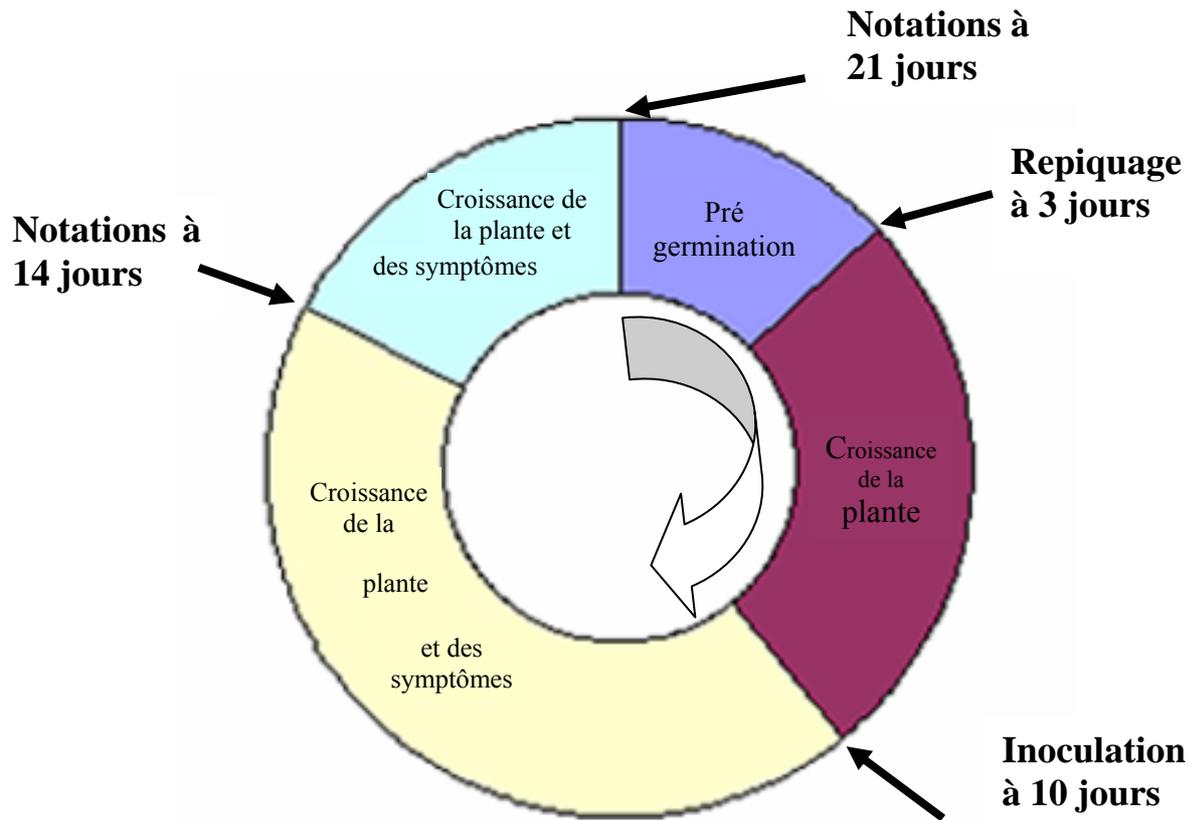


Figure 2 : Calendrier de réalisation du test.

1.2.c. Notations

Les notations se font à 14 jours après inoculation puis à 21 jours après inoculation. On note les symptômes visibles sur cotylédons en se référant à l'échelle de notation suivante :

- 1 ➤ légère chlorose ou noircissement autour de la blessure.
- 2 ➤ taille du symptôme entre 1 et 1.5 mm.
- 3 ➤ taille de la nécrose entre 1.5 et 3 mm.
- 5 ➤ taille de la nécrose entre 3 et 6 mm.
- 7 ➤ taille de la nécrose entre 6 et 7 mm.
- 9 ➤ taille de la nécrose > 7 mm le cotylédon doit être encore vert.
- 11 ➤ cotylédon entièrement desséché

Pour les notes 5, 7, 9 les signes suivants sont des indicateurs de résistance :

- j jaunissement du symptôme.
- Souligner la note en présence de symptôme noir

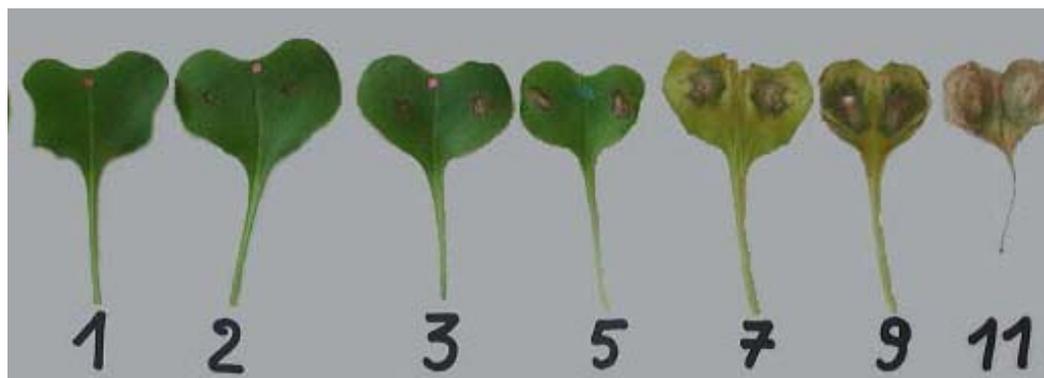


Figure 3 : Echelle de notation à 21 jours après inoculation
(les notes 5, 7, 9 présentent des symptômes noirs, signe de résistance)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2. 1. Résultats

Génotypes	Gènes de résistance			
HD Maxol-S006	<i>RLm1</i>	<i>RLm2</i> ?	<i>RLm3</i> ?	<i>RLm9</i> ?
Samouräi	<i>RLm2</i>			<i>RLm9</i> ?
02-22-1-1	<i>RLm3</i>			
Falcon	<i>RLm4</i>			<i>RLm9</i> ?
99-150-2-1	<i>RLm5</i>			
Darmor	<i>RLm9</i>			
Eurol	<i>RLm2</i>	<i>RLm3</i>		<i>RLm9</i> ?
EurolMX	<i>RLm2</i>	<i>RLm3</i>	RLm6	<i>RLm9</i> ?
DarmorMX	<i>RLm9</i>	RLm6		

Tableau 1 : Gènes de résistance présents chez les génotypes de la gamme d'hôtes différentiels.

Afin de détecter les gènes d'avirulence (*Avr*), on utilise une gamme de génotypes dont les gènes de résistance (*RLm*) sont connus.

VARIETES	<i>M I+14</i>	<i>M I+21</i>	écart-type <i>I+14</i>	écart-type <i>I+21</i>
HD Maxol-S006	6,13	10,13	1,02	1,45
Samouräi	6,25	10,38	1,44	0,96
02-22-1-1	9,63	11	1,75	0
Falcon	2,25	2,38	0,5	0,45
99-150-2-1	3,50	5,13	1,50	0,50
Darmor	7,38	11	1,09	0
Eurol	7,50	11	1,55	0
EurolMX	2,75	4,75	0,45	1,44
DarmorMX	2,56	3,75	0,51	1,18

Tableau 2 : Notes de maladie après inoculation par la souche BIV-1-1

Les notes sont saisies dans un tableau sous format Excel, puis on effectue les moyennes des notes des 2 répétitions ainsi que l'écart type, ceci pour les notes à 14 jours et à 21 jours (voir tableau 2).

Les résultats sont ensuite mis sous forme de graphique afin de mieux visualiser les résultats sur la gamme différentielle.

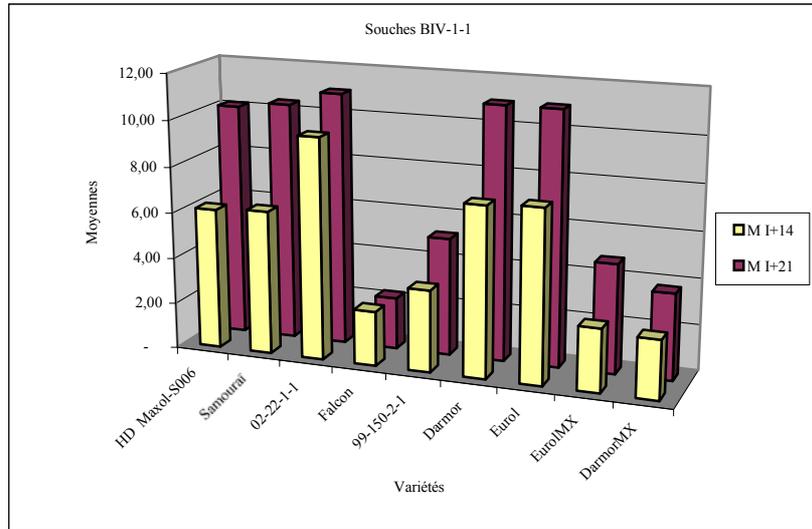


Figure 4 : Comparaison des notes à I+14 et à I+21

2.2. Interprétation

Afin d'homogénéiser l'interprétation des résultats au sein du laboratoire, nous avons mis en place des clés de lecture :

⇒ *Vision globale de l'essai, état de la souche sur les lignées Samourai et/ou 02-22-1-1 et/ou Darmor pour lesquelles les gènes d'avirulence sont inexistantes ou très peu fréquents dans les populations françaises :*

Caractérisation de l'agressivité

- ↳ Souche non pathogène → note ≤ 5 à 21 jours.
- ↳ Souche agressive → note ≥ 9 à 21 jours

⇒ *Dans le cas de la présence d'un gène d'avirulence (Avr4 par exemple) dans une souche :*

Détection des gènes d'avirulence

- ↳ A I+14 jours, note < 5 (moyenne + écart-type).
- ↳ Et à I+21 jours, note < 9 (moyenne+écart-type)

En suivant ces **clés de lecture** et en se référant à la **gamme différentielle** (voir tableau 1 et 2), nous avons pu mettre en évidence que la souche BIV-1-1 est une **souche agressive** car les notes à I+21 sont supérieures à 9. Elle possède les **gènes d'avirulence** suivants : **Avr4** puisque Falcon est résistant et possède le gène de résistance **RLm4**, **Avr5** puisque 99-150-2-1 est résistant et possède le gène de résistance **RLm5** et **Avr6** puisque EuroIMX et DarmorMX sont résistants et possèdent le gène de résistance **RLm6**.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test, utilisé en **routine** dans notre laboratoire, est réalisé pour l'étude de l'évolution au cours du temps de la structure génétique des populations de *Leptosphaeria maculans* afin de caractériser les fréquences **d'avirulence/virulence** dans des échantillons de souches prélevés au champ. Les résultats ainsi obtenus permettent de suivre la **durabilité des gènes de résistance** dans différentes variétés de colza.

Cette méthode peut être également utilisée pour **caractériser** des **gènes de résistance**, afin de permettre la détection de nouveaux **gènes de résistance** et la sélection de plantes résistantes utilisables par les améliorateurs. Dans ce dernier cas, on teste les plantes à étudier en utilisant des couples de souches dont les **gènes d'avirulence/virulence** sont connus.

TEST DE CRIBLAGE EN CONDITIONS CONTROLÉES POUR LA RÉSISTANCE À *Plasmodiophora brassicae* CHEZ LES BRASSICA

*Pascal Glory, Maria Manzanares-Dauleux*¹

La hernie des Crucifères, provoquée par le biotrophe obligatoire *Plasmodiophora brassicae*, est actuellement l'une des plus graves maladies des *Brassica* cultivés dans le monde, notamment *B. oleracea* (choux), *B. napus* (colza) et *B. rapa* (navette). En France, la hernie occasionne depuis longtemps de graves pertes de rendement et de qualité des produits sur les cultures légumières de choux (chou-fleur et brocoli). Sur colza, la hernie, en pleine expansion, a des conséquences économiques dramatiques dans certaines régions productrices où le colza est la seule tête de rotation. La lutte contre ce parasite tellurique s'avère difficile, les solutions de type chimique ou cultural donnent des résultats aléatoires et sont difficilement applicables en plein champ. Il est aujourd'hui admis que l'association des méthodes culturales à des résistances génétiques sera à terme le seul moyen efficace de contrôler la maladie. Actuellement, aucune variété résistante n'est disponible chez *B. oleracea*. Différents travaux de recherche et sélection sont développés avec l'objectif d'introduire et/ou d'augmenter les niveaux de résistance chez les choux et le colza. Une méthode efficace d'évaluation de la résistance en conditions contrôlées a été mise au point permettant d'apprécier à des stades précoces le comportement du matériel végétal en sélection.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal et parasitaire

Le matériel végétal évalué comprend des ressources génétiques, du matériel végétal en sélection (lignées, hybrides...), et des populations en ségrégation (F₂, F₃, BC) de *B. oleracea* et *B. napus*.

Des isolats monospores ou populations de *P. brassicae* appartenant à différents pathotypes sont utilisés pour les inoculations (Manzanares-Dauleux *et al.*, 1994 ; 2001).

1.2. Conditions du test

Le test de résistance est réalisé en chambre de culture en utilisant une photopériode de 16 heures avec des températures de 22°C le jour/19°C la nuit. Un niveau d'humidité relative de 80-90% est maintenu pendant toute la durée du test.

Les graines des différents génotypes sont semées dans un substrat de type «motte fertiss» composé de tourbe blonde-perlite-vermiculite et dont les caractéristiques sont les suivantes : matière sèche 40%, matière organique 25%, rétention en eau 75%, résistivité 4000 Ohm/cm, conductivité 0,25 mS/cm et pH 6. Ce support de culture est totalement dépourvu d'éléments fertilisants ; en conséquence, les mottes-fertiss sont trempées avant semis dans une solution nutritive diluée à 0,25% pendant 48 heures. Après semis et pendant les 3-4 premières semaines, la solution nutritive est apportée de façon régulière par sub-irrigation. Au delà, et en fonction du développement des plantes, il est possible d'arroser uniquement à l'eau claire.

¹ UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Domaine de la Motte, BP35327, 35653 Le Rheu Cedex

L'utilisation d'un substrat à pH acide et le maintien d'un degré d'humidité élevé est essentiel pour le test, car la germination des spores de repos de *P. brassicae* est optimale à des pH compris entre 5,8 et 6,5 et dans des milieux très humides. La durée du test est de 7 semaines.

1.3. Dispositif expérimental

Un dispositif en blocs complets randomisés comportant 2 blocs et 2 répétitions/ bloc est utilisé. La taille des unités expérimentales diffère en fonction de la nature du matériel végétal à tester : dans le cas d'évaluation de génotypes fixés (lignées, populations d'haploïdes doublés...) ou de descendances en ségrégation de type F₃, chaque répétition comporte 6 plantes (24 plantes au total) ; dans le cas de populations non fixées (ressources génétiques), l'unité expérimentale est de 12 plantes (48 plantes au total). Des témoins résistants (les 3 hôtes de la gamme différentielle employée à l'INRA : *B. napus* cv. Nevin, *B. napus* cv. Wilhelmsburger et *B. napus* cv Brutor) (Somé *et al*, 1994) et le témoin sensible ECD5 (*B. rapa* spp. *pekinensis* cv. Granaat) sont inclus dans toutes les expérimentations.

1.4. Méthode d'inoculation

1.4.a. Préparation de l'inoculum

P. brassicae, étant un parasite obligatoire, ne peut être conservé que sur de matériel vivant. Les isolats sont donc multipliés sur le témoin sensible universel *B. rapa* spp. *pekinensis*. Les galles formées sur le système racinaire contenant les spores de repos du parasite sont récoltées 7 semaines après inoculation et conservées à -20°C.

Au moment du test, les galles sont décongelées à température ambiante et ensuite broyées dans un petit volume d'eau distillée. La solution obtenue est filtrée d'abord à l'aide d'un tissu poreux puis sur trois tamis de maillage décroissant (500µ-250µ-100µ). L'estimation du nombre de spores de repos dans la solution mère est réalisée sur une solution diluée au 1/100^{ème} à l'aide d'une cellule de Malassez. La concentration finale de l'inoculum est ensuite ajustée à 10⁷ spores de repos/ml.

1.4.b. Méthode d'inoculation

Six jours après le semis, les mottes-fertiss sont ressuyées pendant 48 heures. Les plantes de 8 jours sont alors inoculées en déposant plante à plante 1 ml de la solution de spores de repos à 10⁷ spores/ml au niveau du collet. Le ressuyage évite ainsi une dilution de l'inoculum dans une motte imbibée d'eau. Pendant les 48 heures suivant l'inoculation, on ne réalise pas d'arrosage.

1.5. Lecture des symptômes

Sept semaines après inoculation, les plantes sont déterrées, les racines lavées à l'eau courante et notées individuellement selon une échelle de 0 à 3. Une attention particulière doit être donnée à conserver la totalité du système racinaire.

En fonction de l'intensité des symptômes observés sur les racines, les plantes sont réparties en cinq classes :

- **classe 0** : aucun symptôme,
- **classe 1** : une ou quelques petites galles sur le système racinaire secondaire,
- **classe 2** : le système racinaire primaire est légèrement atteint, de nombreuses galles sur le système racinaire secondaire,
- **Classe 2+** : le système principal est très atteint mais l'extrémité de la racine principale possède encore une forme normale et/ou un nouveau système racinaire s'est formé au dessus de la galle,
- **Classe 3** : tout le système racinaire correspond à une galle.

1.6. Analyse des résultats

Dans les cas d'évaluation de populations en ségrégation de type F₂ ou BC₁, chaque plante est affectée à une classe. Pour des lignées ou des populations F₃, un indice pathologique (IP) est calculé en affectant un coefficient (0, 25, 50, 75, 100) au nombre de plantes de chaque classe, divisé par le nombre total de plantes notées :

$$IP = \frac{(\text{nb pl cl1} \times 25) + (\text{nb pl cl2} \times 50) + (\text{nb pl cl2+} \times 75) + (\text{nb pl cl3} \times 100)}{\text{Nb pl total}}$$

La valeur de l'IP varie ainsi de 0 (plantes totalement résistantes) à 100 (plantes totalement sensibles). Ces données sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SAS (analyses de variance, tests de corrélation, comparaisons de moyennes...).

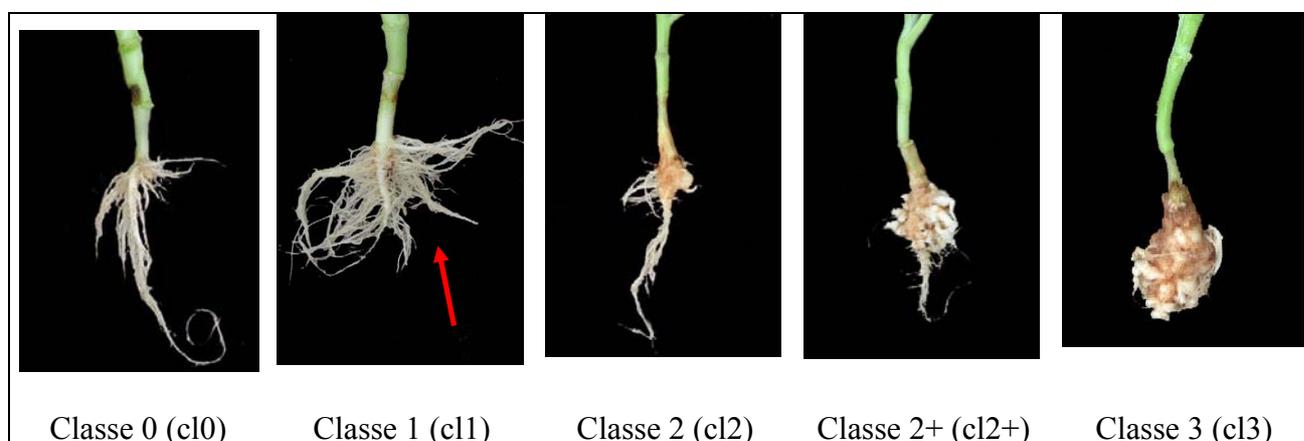


Figure 1: Classification des symptômes de la hernie en cinq classes de résistance.
(Pour la classe 1, la flèche indique une petite galle présente sur le système racinaire secondaire.)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Validation du test

Les valeurs d'IP attendues pour le témoin sensible ECD5 se situent entre 90% et 100%. Des valeurs d'IP inférieures à 60% traduisent des erreurs d'inoculation (concentration de la solution de spores) ou des problèmes de conduite des plantes (faible humidité, basses températures) et le test doit en conséquence être recommencé.

Les valeurs IP des hôtes de la gamme différentielle permettent de valider la caractérisation du pathotype de l'isolat utilisé.

2.2. Résultats

La gamme de variation de l'IP peut varier de 0 à 100%. Une interprétation qualitative des données IP est aussi réalisée en classant les géotypes possédant des valeurs IP compris entre 0-25% comme résistants (classes 0 et 1), et pour de valeurs de 26-100% (classes 2, 2+ et 3) comme sensibles.

3. CONCLUSION

Ce test d'évaluation en conditions contrôlées de la résistance des *Brassica* à *P. brassicae* est largement utilisé par l'INRA, et commence à être utilisé par les sélectionneurs privés en France. Ce test est employé en routine pour l'évaluation de ressources génétiques (Manzanares-Dauleux *et al*, 2000b), la caractérisation des différents pathotypes de *P. brassicae* en utilisant une gamme d'hôtes différentielle (Manzanares-Dauleux *et al*, 2001), les études génétiques de la résistance à la hernie chez les choux et le colza (Manzanares-Dauleux *et al*, 2000a ; Rocherieux *et al*, 2004) et l'appréciation du comportement de résistance de matériel en sélection (lignées, hybrides, populations...). De plus, il existe une très bonne corrélation entre les résultats obtenus avec ce test et ceux obtenus avec le test de résistance au champ. Il contribue ainsi à faire progresser les programmes de recherche et de sélection visant à identifier de nouvelles sources de résistance et à caractériser les facteurs génétiques impliqués dans le contrôle de la résistance ainsi qu'à sélectionner des géniteurs de type agronomique présentant des niveaux améliorés de résistance.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rocherieux J., Glory P., Giboulot A., Boury S., Barbeyron G., Thomas G., Manzanares-Dauleux M.J. 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108:1555-1563.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F. & Thomas G. 2001. Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathology* 50: 165-173.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F. & Thomas G. 2000a. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101: 885-891.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F. & Thomas G. 2000b. Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113: 211-218.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G. & Rouxel F. 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45: 432-439.
- Manzanares M.J., Laurens F., Baron F. & Thomas G. 1994. Production of single spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Cruciferae Newsletter* 16: 132-133.

TEST DE CRIBLAGE EN CONDITIONS CONTROLÉES POUR LA RÉSISTANCE DU POIS A *Aphanomyces euteiches*

Anne Moussart¹, Bernard Tivoli²

La pourriture racinaire précoce du pois est due à un oomycète d'origine tellurique, *Aphanomyces euteiches*. Cette maladie, apparue en France au début des années 1990, est responsable de pertes de rendement très importantes, pouvant atteindre 100% en cas de forte attaque. Afin d'étudier la résistance du pois à *A. euteiches* et de faire progresser la sélection variétale, il est apparu nécessaire de disposer d'un test en conditions contrôlées, utilisable en routine.

1. MATERIEL ET METHODES

Le test est réalisé en chambre climatique (thermopériode 25°C-23°C ; photopériode 16h-8h – intensité lumineuse : $160 \pm 2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

1.1. Préparation du matériel végétal

Le semis est réalisé 7 jours avant l'inoculation. Pour chaque lignée testée, 20 graines non désinfectées sont semées dans de la vermiculite, à raison de 5 graines par pot (pots de 9 cm). Les graines doivent être enfoncées à une profondeur d'environ 2 cm. Chaque pot constitue une répétition, il est donc disposé dans un des 4 blocs de la chambre climatique. Les pots sont répartis dans des plateaux, chaque plateau pouvant contenir 4 pots. Les plateaux sont remplis d'eau après le semis. Une variété sensible (Baccara) et une lignée partiellement résistante (lignée PI180693) servent de témoin à chaque test (Wicker *et al.*, 2003).

1.2. Préparation de l'inoculum

Huit jours sont nécessaires à la préparation de l'inoculum. La première étape doit donc commencer la veille du semis. Les différentes étapes doivent être réalisées en conditions stériles (hotte à flux laminaire ou Bec Bunsen).

Étape 1 : repiquage du champignon

La souche d'*A. euteiches* est conservée à 10°C dans un tube contenant un milieu gélosé Corn Meal Agar. Le champignon est repiqué à partir du tube de conservation, en boîte de Pétri (2 à 3 boîtes) sur milieu gélosé Corn Meal Agar et incubé pendant 4 jours à l'obscurité dans une étuve à 25°C.

Étape 2 : Transfert en milieu de culture liquide

Cette étape permet le développement du mycélium et l'induction de la fructification (reproduction asexuée). Vingt cinq explantats sont découpés à l'emporte pièce (5 mm) en marge des colonies et transférés dans une fiole de ligne de 300ml contenant 50 ml de milieu liquide Peptone Glucose. Les fioles sont placées pendant 3 jours à l'obscurité dans une étuve à 25°C.

¹ UNIP - UMR INRA/Agrocampus Rennes 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la protection des Plantes' (BiO3P). Domaine de la motte – BP35327 – 35653 LE RHEU

² UMR INRA/Agrocampus Rennes 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la protection des Plantes' (BiO3P). Domaine de la motte – BP35327 – 35653 LE RHEU

Etape 3 : Rinçage du mycélium

Cette étape est nécessaire au développement des sporanges et à la libération des zoospores. La veille de l'inoculation, trois rinçages sont effectués. Ces rinçages espacés de 2 heures doivent être réalisés avec de l'eau de Volvic du commerce.

Lors du premier rinçage, la solution de Peptone Glucose est éliminée en renversant doucement la fiole et en prenant soin de laisser les explantats à l'intérieur. Les explantats sont rincés une première fois en ajoutant 30ml d'eau de Volvic et en agitant légèrement. Puis, cette eau de rinçage est éliminée. Trente ml d'eau de Volvic sont à nouveau ajoutés et la fiole est placée pendant 2 heures à l'obscurité dans une étuve à 25°C, sans agitation.

Lors du deuxième et du troisième rinçage, l'eau de Volvic est éliminée et 30 ml d'eau de volvic sont à nouveau ajoutés. La fiole est placée à l'obscurité dans une étuve à 25°C, sans agitation.

Etape 4 : Obtention de la suspension de spores

Les zoospores sont libérées dans les 16 heures suivant le dernier rinçage. La suspension est disponible dès le lendemain matin et doit être impérativement utilisée dans la journée.

L'eau de Volvic contenant les zoospores est transférée dans un flacon stérile, en prenant soin de laisser les explantats à l'intérieur de la fiole. Les restes de mycélium présents dans la suspension de spores sont éliminés. Quelques microlitres de suspension sont prélevés et déposés sur cellule de Malassez afin de vérifier la présence de zoospores mobiles. Certaines zoospores sont enkystées mais restent viables.

Afin de déterminer la concentration de la suspension de spores, il est nécessaire de provoquer l'enkystement afin de les immobiliser. Pour cela, 2 à 3 ml de suspension sont déposés dans un tube et agités au Vortex pendant environ 30 secondes. La concentration est déterminée en utilisant la cellule de Malassez. Une fiole de 30ml contient $1 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^5$ spores/ml.

La concentration de la suspension de spores à préparer est 200 spores/ml. Cent ml de suspension sont nécessaires pour une lignée (5 ml par plante). Les dilutions sont réalisées dans une fiole de ligne avec de l'eau permutée stérile. Si le volume de suspension à préparer est important, il est préférable de préparer une fiole par bloc.

1.3. Inoculation et incubation

La suspension de spores à inoculer est mise en agitation très douce sur un agitateur magnétique afin de maintenir la suspension homogène pendant toute la durée de l'inoculation. L'inoculation est réalisée à l'aide d'une pipette en déposant 25ml de suspension de spores par pot, soit 5ml par plante. Si le nombre de plantes par pot est inférieur à 5, il est nécessaire d'ajuster le volume de suspension inoculé (exemple : 15ml pour 3 plantes). Il est important de répartir régulièrement la suspension à la surface du substrat.

Les plateaux doivent être remplis d'eau pendant les 3 jours suivant l'inoculation afin de maintenir la capacité en pot. Les plantes inoculées sont incubées pendant 7 jours.

1.4. Système de notation

Sept jours après inoculation, les plantes sont dépotées avec soin. Il n'est pas nécessaire de laver les racines. Chaque plante est notée selon une échelle de 0 à 5 (Wicker et al., 2001).

0 = absence de symptôme ; 1 = traces translucides à beiges sur les racelles ; 2 = zones beiges à brunâtres, molles, couvrant le quart du système racinaire ; la racine est touchée ; 3 = zones beiges à brunâtres, molles, couvrant au moins la moitié du système racinaire ; l'épicotyle peut tourner au beige mais reste ferme ; 4 = le système racinaire est au trois quart clair et mou. L'épicotyle est mou et paraît étranglé ; 5 = la plante est morte.

Pour chaque lignée, un indice de nécrose est calculé de la façon suivante :

$$IN \text{ moy} = \sum_{I=1}^4 (IN \text{ pot}_i) / 4$$

IN moy : Indice de Nécrose moyen

IN pot_i : Indice de Nécrose de la répétition (pot)_i

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats obtenus pour les 6 génotypes de la gamme différentielle (Wicker et al., 2003) sont représentés sur la figure 1. Les niveaux de résistance partielle actuellement disponibles sont faibles mais le test permet une bonne discrimination des génotypes entre eux. Les résultats du test sont corrélés avec les résultats obtenus lors de criblages au champ. La figure 2 représente la relation entre l'Indice de Nécrose du test et l'Indice Aérien (impact de la maladie sur les parties aériennes) mesuré au champ.

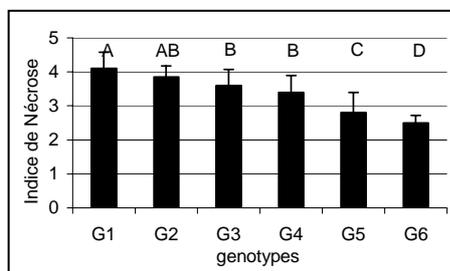


Figure 1 : résultats du test pour les six génotypes de la gamme différentielle

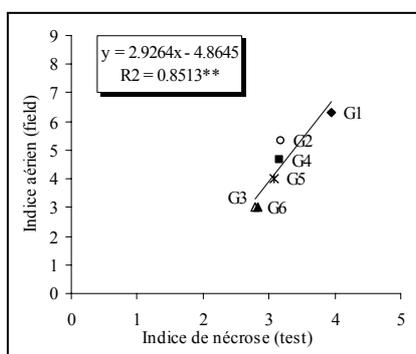


Figure 2 : corrélation obtenue en 2000 entre les résultats du test et les résultats du criblage au champ



Figure 3 : symptôme d'*A. euteiches* sur pois

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test en conditions contrôlées présente l'avantage d'être simple, rapide et reproductible. Il est actuellement utilisé par les pathologistes (appréciation du pouvoir pathogène, recherche de composantes), généticiens (sources de résistance, analyses génétiques) et sélectionneurs (sources de résistance, création variétale). Récemment, ce test a été adapté pour l'étude de la résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* à *A. euteiches*. De nombreuses autres adaptations sont possibles (tests de spécificité d'hôtes, ...).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wicker E, Hullé M and Rouxel F (2001) Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* 50: 433-442
- Wicker E, Moussart A, Duparque M, Rouxel F (2003) Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 47-60

TESTS DE RESISTANCE DU MELON A LA FUSARIOSE VASCULAIRE*Didier Besombes et Nathalie Giovinazzo¹*

Fusarium oxysporum f. sp. *melonis* est présent dans de nombreux pays. Il est bien souvent dommageable et peut provoquer la mortalité de l'ensemble des plantes d'une parcelle. De ce fait c'est une des maladies les plus graves sur Melon.

Quatre races ont été décrites pour lesquelles des gènes de résistance ont été trouvés : Fom-1 (résistance à la race 0 et à la race 2), Fom-2 (résistance à la race 0 et à la race 1) et une résistance partielle polygénique pour la race 1-2.

1. MATERIEL ET METHODES**1.1. Préparation de l'inoculum**

L'entretien des souches se fait par repiquage alterné sur milieu synthétique gélosé et sur milieu avoine (45g flocons d'avoine broyés, 15g gélose qsp 1 litre).

Une semaine avant l'inoculation, prélever un morceau de gélose (surface de mycélium d'environ 0,5 cm²) que l'on met dans 1 erlen de milieu MS50 (cf composition ci-dessous). Mettre en agitation en chambre de culture (20 à 23°C, 10 h de jour).

Solutions de base (pour 1 litre d'eau distillée)

Solution A :	Nitrate de calcium 100 g, Nitrate de potassium 25 g
Solution B :	Sulfate de magnésium 25 g
Solution C :	Phosphate monopotassique 25 g
Solution D :	Phosphate bipotassique 25 g
Solution E :	Acide citrique 25 g, Acide malique 25 g
Oligoéléments :	Fer (Sequestrène 138) 40 g, Sulfate de manganèse 3 g, Sulfate de cuivre 3 g, Sulfate de zinc 3 g, Borax 6 g

	Milieu synthétique liquide (MS50)	Milieu synthétique gélosé
Solution A	20 ml	10 ml
Solution B	20 ml	10 ml
Solution C	20 ml	5 ml
Solution D	-	5 ml
Solution E	1 ml	1 ml
Oligoéléments	1 ml	1 ml
Saccharose	50 g	5 g
Malt	5 g	1 g
Gélose	-	20 g
Eau distillée	qsp 1 litre	qsp 1 litre

¹ INRA, Station de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, BP 94 - 84143 Montfavet Cedex

Le milieu synthétique liquide est mis en fioles de ligne (100 ml dans une fiole de 500 ml) qui sont autoclavées 20 min à 120 °C.

Le jour de l'inoculation, filtrer l'inoculum au travers d'un morceau de gaze. Diluer 10ml de filtrat au 1/10^e avec de l'eau permutée et vérifier par comptage à la cellule de Malassez la concentration de l'inoculum. Ajuster la concentration à environ 10⁶ microconidies/ml. Pour la méthode par trempage prévoir une quantité suffisante d'inoculum (700 ml par terrine).

1.2. Inoculation et incubation

1.2.a. Méthode par repiquage

Cette méthode permet de tester les gènes majeurs de résistance (*Fom-1* et *Fom-2*) avec les races 0, 1 et 2.

Les graines sont semées dans des terrines remplies de sable désinfecté à la vapeur (8 lignes de 10 graines/terrine). Penser à inclure les témoins sensibles et résistants dans une terrine du test. Lorsque les plantules sont au stade "cotylédons étalés", elles sont arrachées ; les racines sont lavées dans de l'eau pour enlever le sable. L'extrémité des racines est coupée avec l'ongle (environ 1,5 cm). Les plantules sont mises à tremper dans la suspension de *Fusarium* pendant environ 2 min. Elles sont ensuite repiquées dans du terreau dans une nouvelle terrine (6 lignes de 10 plantules/terrine). L'incubation a lieu en chambre climatisée (18°C la nuit et 25°C le jour avec 12 h de jour). Il faut éviter les températures trop élevées (> 30°C). Les plantes du témoin sensible sont mortes environ 15 jours après l'inoculation.



Photo 1 : Test de résistance du melon à la fusariose vasculaire : Coupe des racines avec l'ongle (technique par repiquage)

1.2.b. Méthode par trempage

Cette méthode est utilisable pour tester la résistance partielle polygénique qui contrôle la race 1-2. Elle permet également de mettre en évidence les gènes majeurs de résistance (*Fom-1* et *Fom-2*).

Les graines sont semées dans des terrines de terreau (6 lignes de 10 graines/terrine). Lorsque les plantules sont au stade "cotylédons étalés" – "première feuille pointante", les terrines sont placées dans un bac contenant 700 ml de la suspension de *Fusarium*. Après absorption de cette suspension par le terreau, les plantes sont mises en incubation dans les mêmes conditions que précédemment. Les plantes du témoin sensible sont mortes environ 3 semaines après l'inoculation.

1.3. Notation

En règle générale une première lecture est effectuée lorsque les témoins sensibles présentent des symptômes nets de jaunissement et/ou de flétrissement. Une deuxième lecture est faite lorsque tous les témoins sensibles sont morts.

L'échelle de notation comprend 3 niveaux :

- Résistant = plante verte, développement normal
- Intermédiaire = plante jaune, présence de nécroses, arrêt de croissance
- Sensible = plante morte

1.4. Interprétation des résultats

Variétés	Allèles	Race 0	Race 1	Race 2	Race 1-2
Charentais T		S	S	S	S
Charentais Fom-1	<i>Fom-1</i>	R	S	R	S
Charentais Fom-2	<i>Fom-2</i>	R	R	S	S
Printadou, Margot	<i>Fom-1 Fom-2</i>	R	R	R	S
Isabelle	<i>Fom-1 Fom-2</i> + <i>Polygénique récessive</i>	R	R	R	r

S = Sensible

R = Résistant

r = Résistance partielle

Tableau 1 : Expression de la résistance d'une gamme de variétés témoins.

A partir des notations individuelles des plantes on classe chaque lot testé dans une des catégories suivantes :

- lot résistant : toutes les plantes se comportent comme le témoin résistant,
- lot sensible : toutes les plantes se comportent comme le témoin sensible,
- lot intermédiaire : la majorité des plantes sont du niveau « Intermédiaire »,
- lot en disjonction : présence de plantes sensibles et de plantes résistantes.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Code	nombre plantes	Résistant	Intermédiaire	Sensible	Conclusion
928	19	15	4	0	R
1030	20	20	0	0	R
1052	20	0	1	19	S
charentais Fom-1	15	15	0	0	R
charentais Fom-2	20	0	0	20	S

Tableau 2 : extrait des résultats d'un test de résistance au *Fusarium* race 2.

Dans l'exemple repris dans le tableau 2 les plantes ont été inoculées avec une suspension de spores de *Fusarium* race 2. Cela se vérifie au vu des résultats des témoins : le Charentais Fom-1 possédant le gène de résistance à cette race présente 15 plantules bien vertes alors que le Charentais Fom-2 qui possède le gène de résistance à la race 1 n'a que des plantules sensibles. La variété numéro 1030 est déclarée résistante avec 100% de plantules vertes. Le numéro 928 est également déclaré résistant, les 4 « douteux » (plantules jaunes) pouvant être dus à une différence d'état physiologique ou d'une taille des racines trop sévère lors de la réalisation du test. Si ces 4 plantules avaient été sensibles (plantules mortes) le lot aurait été déclaré « en disjonction ». Enfin la variété numéro 1052 est déclarée sensible avec 19 plantules mortes et une avec un fort jaunissement.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test est utilisé en routine dans le laboratoire notamment dans le cadre des vérifications des déclarations des obtenteurs auprès du GEVES. Il sert également pour la recherche de résistances et divers programmes d'analyse génétique. Actuellement il est utilisé dans le cadre d'une thèse sur « l'identification de QTL impliqués dans la résistance au *Fusarium* race 1-2 chez le melon ».

Pour les races 0 et 1 ce test est très fiable et simple à lire avec la technique par repiquage. Dans le cas de la race 2 il peut y avoir quelques difficultés avec certains génotypes. En effet l'utilisation d'une souche agressive permettant d'avoir une réponse nette des témoins peut gêner l'expression de la résistance dans certains types de variétés.

Enfin ce test présente parfois des difficultés d'interprétation avec la technique par trempage pour la race 1-2. Cette technique ayant pour but de tester une résistance partielle polygénique le choix du type et du nombre de témoins revêt une grande importance. On peut ainsi constater une hétérogénéité d'un test à l'autre dans la réponse des variétés témoins. Les raisons de cette hétérogénéité n'ayant pas été identifiées (terreau, inoculum, stade des plantules...) cette technique reste donc perfectible.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Blancard D, Lecoq H, Pitrat M (1991) Maladies des Cucurbitacées. Co-édition INRA – Revue Horticole.

TEST DE CRIBLAGE DU POIS PROTEAGINEUX AU STADE JUVENILE POUR LA RESISTANCE AU PATHOGENE FONGIQUE *Mycosphaerella pinodes*

Caroline Onfroy¹, Bernard Tivoli²

L'antracnose, due à *M. pinodes* et à *Phoma medicaginis* var *pinodella*, est la maladie foliaire la plus grave sur pois protéagineux en France. Relativement bien maîtrisée en semis de printemps par des traitements fongicides, elle est particulièrement préoccupante sur pois d'hiver car son apparition et son développement sont loin d'être jugulés. La recherche de résistance variétale constitue l'une des orientations actuellement privilégiées.

Une méthodologie visant à cribler le matériel végétal en chambre climatique sur des jeunes plantes et/ou sur organes foliaires excisés maintenus en survie, a été mise au point.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

Les tests sont mis au point sur une gamme d'hôtes différentielle composée de six génotypes : deux génotypes de la collection de Roger Cousin (INRA Versailles) considérés comme modérément résistants (DP et FP), deux autres venant du John Innes Center (JI 252 et JI 296 respectivement résistant et sensible) et les variétés Solara et Melrose.

Quatre graines sont semées dans des pots de 9 cm de diamètre dans un substrat stérilisé (1/1/1 sol/sable/terreau) et trois répétitions sont réalisées par génotype testé. Les pots sont placés dans des plateaux en chambre climatique sous une intensité lumineuse de $160 \pm 2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, une photopériode de 14h et une thermopériode $12^\circ\text{C}/8^\circ\text{C}$, jusqu'à ce que les plantes atteignent 3-4 feuilles ou 5-6 feuilles respectivement pour l'inoculation des jeunes plantes et pour les tests sur organes maintenus en survie.

1.2. Préparation de l'inoculum

Les cultures sont repiquées à partir de tubes de milieu gélosé à base d'extrait de malt. Les colonies se développent à 20°C , sur milieu V8 (30g d'agar, 199 ml de V8, 801 ml d'eau, autoclavage à 105°C pendant 30 minutes) sous lumière blanche sous 12h de photopériode. Afin de libérer les pycniospores de leur mucus, la suspension de spores est préparée en grattant la surface d'une colonie âgée de 10 jours recouverte d'eau distillée stérile, avec un agitateur coudé. La solution ainsi obtenue est filtrée au travers de la gaze stérile. La concentration de spores est déterminée à l'hématimètre.

1.3. L'inoculation et l'incubation

1.3.a. Les tests sur jeunes plantes

Les génotypes à cribler sont disposés selon un dispositif en bloc entièrement randomisé. La concentration de spores est ajustée à 10^5 spores/ml. Deux gouttes de mouillant (Tween 20) sont ajoutées à un litre de suspension de spores. La suspension de spores est appliquée à l'aide d'un pulvérisateur à main à raison de 2ml de suspension par pot de quatre plantes et chaque plateau est recouvert d'un couvercle de mini serre pour maintenir une atmosphère humide

¹ UNIP INRA UMR BiO3P, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

² INRA UMR BiO3P, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

autour des feuilles. Les plantes sont incubées jusqu'à la fin du criblage, sous 14h de photopériode et une thermopériode de 15°C/18°C.

Comme les plantes continuent de croître après l'inoculation, la maladie est appréciée seulement sur les parties inoculées de chaque plante, par l'évaluation de l'intensité de maladie sur les quatre premiers étages foliaires. La gravité de la maladie est appréciée visuellement en utilisant l'échelle de notation de 0 à 5 (Tivoli *et al.*, 1996) : 0 = absence de lésions, 1 = quelques ponctuations, 2 = de nombreuses ponctuations, 3 = 10-15% de la surface atteinte (premières nécroses), 4 = 50% de la feuille déshydratée et nécrosée, 5 = 75-100% de la feuille déshydratée et nécrosée. Ces notations sont réalisées 10 et 20 jours après l'inoculation. Les valeurs moyennes de maladie par plante sont calculées et analysées par une analyse de variance.

1.3.b. Les tests sur folioles ou stipules excisés maintenus en survie

Les tests sur des stipules ou folioles détachés maintenus en survie sur un film d'eau et inoculés en leur centre par une goutte de suspension de spores, permettent de mettre en évidence les composantes de la résistance partielle.

Les stipules (ou folioles) du 3^{ème} ou 4^{ème} étage sur des plantes de 6 étages sont prélevés à partir des plantes précédemment préparées, en conservant environ 5mm de l'entre-noeud (ou du pétiole) sur lequel ils sont attachés. Ils sont déposés sur un film d'eau préalablement disposé au fond d'une boîte de Pétri (l'entre-noeud ou le pétiole étant immergé). Les résultats de criblage les plus discriminants sont obtenus en déposant au centre de chaque stipule, 10 microlitres d'une suspension de pycniospore à 10⁵ spores par ml, de la souche agressive *Mp* 91.31.12 âgée de 10 jours. Après avoir soigneusement fermé chacune de boîtes à l'aide d'une bande de parafilm, afin d'éviter toute évaporation de la goutte, les boîtes sont placées à 20°C, dans une chambre climatique sous 14h de photopériode, et sous une intensité lumineuse de 160±2μEm⁻²s⁻¹. Les boîtes sont placées selon un dispositif entièrement randomisé.

La gravité de la maladie est appréciée quotidiennement en utilisant deux échelles de notation successives. La première échelle de 0 à 3 vise à estimer la densité de ponctuations, représentatives de l'apparition de la maladie au niveau de la goutte : 0 = absence de lésions ; 1 = quelques lésions ; 2 = de nombreuses lésions ; 3 = des ponctuations recouvrant 100% de la surface de la goutte. La seconde échelle consiste à mesurer (en mm) la nécrose en avant de la bordure de la goutte, montrant ainsi la progression du champignon dans les tissus.

Les résultats sont analysés par l'étude de la variance (ANOVA)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Tests de criblage sur jeunes plantes

Souche	Génotypes de pois					
	JI 296	Solara	JI 252	Melrose	DP	FP
<i>M. pinodes</i> ¹	3.9a	3.0b	3.0b	2.7c	2.6c	2.3d
<i>P. medicaginis</i> ¹	2.6a	1.0c	1.4b	1.1c	1.0c	0.8c

¹ Les moyennes suivies par la même lettre sur la ligne ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) selon le test de Newman Keuls

Tableau 1 - Moyenne de l'intensité de maladie (échelle de 0-5) sur les feuilles de 6 génotypes de pois, 10 jours après l'inoculation par des souches de *M. pinodes* (moyenne de 10 souches) et *P. medicaginis* var. *pinodella* (moyenne de 6 souches), d'après Onfroy *et al.* (1999).

Les premiers symptômes apparaissent sur les plantes après 36 et 48 heures d'incubation. Les résultats (Tableau 1) montrent toujours le même ordre de classement des génotypes que ce soit vis à vis de *M. pinodes* ou de *P. medicaginis* var *pinodella*. Les lignées DP, FP et JI 252 présentent un niveau élevé de résistance partielle; la variété Solara est modérément sensible et la lignée JI 296 est particulièrement sensible.

2.2. Tests de criblage sur stipules maintenus en survie (Figure 1)

A 2 jours après inoculation, tous les génotypes sont dans la phase d'apparition des ponctuations, les premières ponctuations apparaissant 30 à 40 heures après l'inoculation. Un léger retard est observé chez les génotypes moins sensibles

A 3 jours d'incubation à 20°C, deux phases du cycle sont observées simultanément : entrée dans la phase d'extension des lésions pour les génotypes plus sensibles (JI296 et Solara) à partir de la coalescence des ponctuations, tandis que les moins sensibles sont encore dans leur phase d'installation.

A partir de 5 jours après inoculation, tous les génotypes sont dans une phase active d'extension des lésions. La différence de sensibilité des génotypes observée pendant la phase d'installation est toujours nettement visible. Le prolongement des notations et donc la durée du test, sont limités par la trop petite taille des stipules de certains génotypes (en particulier JI252, Melrose et ensuite FP).

Les fructifications sous forme de pycnides apparaissent pendant la phase d'extension des lésions, environ 6 jours après l'inoculation sur les génotypes plus sensibles, et un à deux jours plus tard sur les moins sensibles.



Figure 1 : Effet de trois doses de spores de *M. pinodes* (D1=500, D2=1000, D3=2000 spores par goutte) sur la réaction des génotypes JI 296 et DP, observée après 10 jours d'incubation.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces deux tests de criblage sont largement utilisés par les sélectionneurs du pois et par les généticiens : pour détecter ou caractériser des sources de résistance, cribler des lignées recombinantes, analyser la génétique de la résistance. Ils ont également été adaptés pour l'étude du comportement de la plante modèle *Medicago truncatula* vis à vis de ces parasites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Onfroy C., Tivoli B., Corbière R., Bouznad Z. (1999). Cultural, pathogenic and molecular variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var *pinodella* isolates from dry pea in France. *Plant pathol.*, 48 : 218-229.
- Tivoli B, Béasse C, Lemarchand E and Masson E (1996) Effect of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea plant under field conditions. *Annals of Applied Biology* 129: 207-216

TEST DE RESISTANCE VIS-A-VIS DE LA MALADIE DE L'ENCRE SUR TIGES EXCISEES DE CHATAIGNIER

Ramos Guedes-Lafargue Maria¹, Franzini René¹, Laigret Frédéric¹

La châtaigneraie, traditionnelle française constituée de l'espèce *Castanea sativa*, est sensible à deux maladies cryptogamiques qui sont la maladie de l'encre (causée par *Phytophthora cinnamomi* et *P. cambivora*) et le chancre de l'écorce (causée par *Cryphonectria parasitica*). Depuis 1986, un programme d'amélioration génétique est réalisé à l'UREFV en utilisant les espèces *C. crenata* et *C. mollissima*, avec l'objectif de créer et de sélectionner des châtaigniers performants sur le plan fruitier et d'un meilleur niveau de résistance à la maladie de l'encre que les cultivars interspécifiques INRA existant actuellement (Salesses, 1993a). L'utilisation de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de l'encre est nécessaire pour préciser le comportement du matériel existant, définir la valeur des géniteurs, des résistances (Salesses, 1993b) et sélectionner parmi les hybrides créés.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

Le matériel végétal est prélevé sur des arbres âgés de 6 à 7 ans implantés en parcelle d'étude. On utilise des tiges, rameaux de l'année excisés, maintenues en survie au laboratoire en conditions contrôlées (Salesses, 1993c). Ces tiges doivent être en croissance au moment du prélèvement, c'est-à-dire début juin en ce qui concerne l'espèce châtaignier. On prélève 6 à 8 rameaux par génotype. Chaque échantillon est identifié, et placé dans un récipient contenant de l'eau dans l'attente de la réalisation du test.

Les tiges sont décapitées au-dessous de la 6^e ou 7^e feuille à compter du bourgeon terminal. On laisse sur le rameau 3 ou 4 feuilles que l'on tronque avec des ciseaux pour faciliter la survie du matériel. Les tiges peuvent parfois être raccourcies à leur base afin d'homogénéiser tous les échantillons à une hauteur de 30 cm environ.

En même temps, des témoins de sensibilité (une variété de *Castanea sativa*) et de résistance (un cultivar de *C. crenata* et/ou un hybride interspécifique) sont prélevés et le matériel est préparé de façon identique.

1.2. Préparation de l'inoculum ou du matériel "bioagresseur"

Le matériel fongique utilisé est une souche de *Phytophthora cinnamomi* (isolat 9) fournie par l'UMR BIOGECO (Département EFPA, Centre INRA de Bordeaux). Cet isolat a été isolé à Ainhoa au Pays Basque sur *Quercus rubra* en mars 1988.

L'inoculum est constitué de cylindres de 4mm de diamètre prélevés à l'emporte-pièce, à la périphérie d'une culture de la souche fongique en croissance depuis 8 jours sur milieu V8 gélosé. La croissance du champignon se déroule dans une étuve à 26°C et à l'obscurité.

1.3. Inoculation et incubation

La tige décapitée est entourée d'un petit tube de papier aluminium qui sert à maintenir le pathogène. La pastille contenant le mycélium du pathogène est placée sur la section de la tige.

¹ INRA, CR Bordeaux, UREFV, 71 av. Edouard-Bourleaux, BP81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex.

On s'assure que le champignon est bien en contact avec le végétal en enfonçant le manche d'une lancette lancéolée dans le tube de papier aluminium. Un autre capuchon d'aluminium fermé à une extrémité est placé sur l'ensemble de façon à conserver une bonne humidité relative autour de l'inoculum. La tige est ensuite placée dans du sable de rivière soigneusement désinfecté. Pour chaque génotype à évaluer, 6 rameaux sont inoculés et ils sont répartis aléatoirement en deux blocs à raison de 3 répétitions par bloc.

L'incubation est réalisée dans une pièce climatisée avec 90% d'humidité relative obtenue grâce à un humidificateur de type « Défensor », un éclairage journalier de 16 heures et une température de 25°C. La température ne doit pas dépasser 30°C, car ce seuil bloque la croissance du pathogène.

1.4. Système de notation

La lecture se fait 10 jours après l'inoculation. Les capuchons d'aluminium, sont ôtés et on mesure la longueur de la nécrose due au pathogène depuis le point d'inoculation (Photo 1). La notation est effectuée en mm avec un pied à coulisse. Pour chaque tige, on note le génotype, les blocs et les répétitions.



Photo 1 : Test sur tiges excisées : exemple de nécrose développée sur un hybride (*C. sativa* x *C. crenata*) relativement sensible, 10 jours après inoculation.

1.5. Interprétation des résultats

Tous les rameaux inoculés doivent présenter des nécroses. Si ce n'est pas le cas, alors la contamination ne s'est pas faite et le matériel est éliminé. Les témoins de sensibilité et de résistance doivent présenter des longueurs de nécrose très différentes (<80 mm pour les résistants et >150 mm pour les sensibles). Ce point permet de vérifier que l'incubation s'est réalisée dans de bonnes conditions expérimentales : la croissance du pathogène ne s'est pas bloquée. Une analyse de variance permet de vérifier les effets répétitions et blocs de l'essai réalisé. Si ces effets sont non significatifs au seuil de 5%, on peut effectuer un test de comparaison du comportement de chaque hybride par rapport aux deux témoins sur les données moyennes. Le test de Newman et Keuls ou le test de Dunnett permettent de classer les hybrides les uns par rapport aux autres et par rapport aux témoins.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Le résultat présenté ci après est un essai réalisé en 2002 sur 27 génotypes hybrides (*Castanea sativa* x *C. crenata*) et (*C. sativa* x *C. mollissima*). Le témoin de sensibilité est la variété *C. sativa* Montagne (Ca 520) et le témoin de résistance est le cultivar interspécifique le plus planté actuellement dans les nouveaux vergers de châtaignier : Marigoule (Ca 15).

L'analyse de variance montre un effet bloc et répétition non significatif au seuil de 5%. Les dimensions des nécroses sont significativement différentes entre elles. Elles varient de 53mm à 163 mm, les longueurs des nécroses des témoins étant de 84mm pour Ca15 et 142.6 mm pour Ca520 (figure 1).

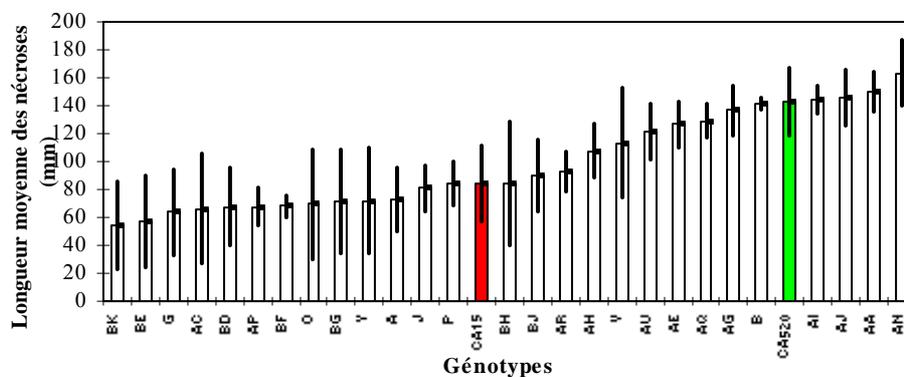


Figure 1 : Longueur moyenne des nécroses, en mm, provoquées par *Phytophthora cinnamoni* sur différents géotypes de châtaignier

Le test de Dunnett par rapport au témoin de résistance conduit à classer les clones de châtaignier de la façon suivante :

- les très sensibles : V, AU, AE, AQ, AG, B, AI, AJ, AA, AN,
- les peu sensibles, autant que le témoin Marigoule : AH, AR, BJ, BH, P, J, A, BG, Y, O, BF, AP, BD, AC, G,
- les très peu sensibles : BE et BK.

Seuls les géotypes peu et très peu sensibles continueront à être évalués sur des critères fruitiers et agronomiques.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test sur rameaux de l'année excisés a été développé dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique et de sélection du châtaignier afin de pouvoir déterminer le comportement d'arbres adultes vis-à-vis du pathogène. Les arbres adultes peuvent être des hybrides à évaluer ou des ressources génétiques dont il faut connaître le niveau de résistance pour les utiliser dans des plans de croisement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Salesses G., Chapa J., and Chazerans P., 1993a. The chestnut in France – Cultivars – Breeding programs. Proceedings of the International Congress on Chestnut, Spoleto, Italy, October 20-23, 331-337.
- Salesses G., Chapa J., and Chazerans P., 1993b. Screening and breeding for ink disease resistance. Proceedings of the International Congress on Chestnut, Spoleto, Italy, October 20-23, 545-549.
- Salesses G., Ronco L., Chauvin J.E., and Chapa J., 1993c. Amélioration génétique du châtaignier. Mise au point de tests d'évaluation du comportement vis-à-vis de la maladie de l'encre. L'Arboriculture Fruitière. 458: 23-31.

INOCULATION AVEC *Mycosphaerella sp.*, AGENT DE CERCOSPORIOSES, DE FRAGMENTS DE FEUILLES DE BANANIERS MAINTENUS EN SURVIE

Catherine Abadie, Luc Pignolet, Abdelbasset Elhadrami, Rémy Habas, Marie-Françoise Zapater et Jean Carlier.¹

Les bananiers, cultivés dans plus de 120 pays de la zone tropicale, constituent une base alimentaire majeure pour plus de 400 millions de personnes. Les cercosporioses, maladies foliaires graves dues à *Mycosphaerella fijiensis* ou *M. musicola*, affectent la totalité des zones de culture et sont considérées comme une des contraintes majeures pour les productions bananières. Bien qu'efficace, l'utilisation de fongicides est polluante, non durable (apparition de résistance) et inaccessible pour les petits producteurs. Ainsi, l'utilisation de variétés résistantes est considérée comme le moyen de lutte le plus approprié et le plus durable. Un test miniature d'interaction Bananier/*Mycosphaerella* a été mis au point afin d'étudier la résistance des bananiers et la variabilité du pouvoir pathogène.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

1.1.a. Culture des bananiers

Les bananiers sont cultivés en conditions contrôlées pendant 6 mois, à 80% environ d'humidité relative, une température ambiante de 26 à 28°C et une photopériode de 12h sous lumière blanche d'intensité variant de 40 à 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ils sont issus de vitroplants qui sont sevrés après un traitement des racines dans un bain de benlate à 3g/l pendant 10 mn dans du terreau (Nehauss n° 9) en godets de 0.25 l puis après 1.5 mois en pot de 1 litre. A l'issue de 3 mois de culture en cellule de sevrage, les bananiers sont transplantés dans des pots de 5 litres contenant un mélange de terreau Nehauss n° 9 et de pouzzolane (3 à 5mm de granulométrie) selon une proportion 3/1. Pendant ces phases de culture, des applications d'engrais liquide (Hortal à 1g/l) et solide (2 gr de granulés d'Osmocote N10 P11 K18/ pot de 5l) sont réalisées régulièrement (tous les 3 semaines environ) et en alternance. Des traitements insecticides et acaricides sont appliqués en cours de culture si nécessaire.

Les bananiers doivent être dans des conditions physiologiques optimales avant le prélèvement de feuilles.

1.1.b. Mise en survie des fragments foliaires

Les deux plus jeunes feuilles déployées sont coupées au niveau du pétiole et déposées dans un récipient d'eau. Les deux faces des feuilles sont nettoyées à l'aide d'un coton imbibé d'eau stérile. Des carrés foliaires de 6 cm de côté sont découpés sur une plaque de verre, à l'aide d'un modèle plastique rigide et d'un scalpel tranchant.

Ces carrés sont déposés sur un milieu de survie (4g d'agar, 50 ppm de benzimidazole –Sigma B-9131-, 1l d'eau distillée) dans des boîtes de Pétri carrées ou rondes (diamètre 100 mm), la face supérieure contre le milieu de culture. Les fragments foliaires sont plaqués sur le milieu de culture à l'aide des pochoirs plastiques préalablement stérilisés et dégageant une fenêtre de 5 cm de côté.

¹ CIRAD, UMR BGPI, TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

1.2. Préparation de l'inoculum conidien

1.2.a. Préparation des cultures

Les isolats, conservés à -80°C dans une solution de glycérol à 15 %, sont après décongélation mis en croissance en boîte de Pétri sur du milieu PDA (39 g/l de potato dextrose agar additionné de 200 ppm de sulfate de streptomycine) pendant 10 jours à 25°C et une photopériode de 12h. Environ 5 implants mycéliens sont transférés sur du milieu V8 300 (300 ml de jus de légumes V8, 3g de CaCO_3 , 20 g d'agar, 700 ml eau ; 100 UI de pénicilline et 100 μg de streptomycine sont amendés par ml de milieu après autoclavage) et incubés pendant une dizaine de jours à 25°C et une photopériode de 12h.

1.2.b. Mise en sporulation

Environ 5 implants mycéliens prélevés dans les cultures de V8 300 sont mis en suspension dans un tube conique contenant 20 ml d'eau stérile, puis sont fractionnés à l'aide d'une sonde à ultrason (diamètre 3 mm) pendant 1 mn à une puissance de 80W.

Deux ml environ de la solution obtenue sont versés dans des boîtes de Pétri (diamètre 90 mm) contenant du milieu V8 sporulation (100 ml de jus de légumes V8, 0.2g de CaCO_3 , 20 g d'agar, 900 ml eau amendés des mêmes antibiotiques que le milieu V8 300). Les boîtes sont scellées et incubées à 20°C en lumière continue (d'intensité égale à 60 à 65 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pendant 14 jours.

1.2.c. Préparation des suspensions conidiennes

L'inoculum est préparé par récupération des conidies produites à la surface du milieu V8 sporulation. Pour cela, après avoir versé 3 à 5 ml d'eau stérile par boîte, la surface de la culture est grattée légèrement (pour éviter la récupération de fragments mycéliens) à l'aide d'une spatule stérile. Cette suspension est titrée au microscope à l'aide d'une cellule de Malassez à raison de 3 comptages minimum. Des dilutions sont réalisées afin d'obtenir des suspensions conidiennes concentrées généralement à 3000 conidies/ml de suspension.

1.3. Inoculation et incubation

Les suspensions conidiennes sont soit déposées sous forme de goutte de 3 μl (à raison de 4 gouttes réparties régulièrement sur chaque fragment foliaire), soit pulvérisées sur la totalité de la surface foliaire. La pulvérisation est réalisée à l'aide d'un aérographe (Badger air-brush n°150-1-M) relié à un compresseur délivrant une pression d'air de l'ordre de 1,5 kg.cm^2 . Un ml de suspension conidienne est pulvérisé sous forme de très fines gouttes (buse de 0.2 mm de diamètre) verticalement à une distance de 40 cm du fragment foliaire. Ces conditions permettent de répartir de façon homogène l'inoculum sur toute la surface foliaire de 25 cm^2 .

Les boîtes de pétri contenant les fragments foliaires inoculés sont scellées avec du cellophane et mises en incubation dans une cellule climatique à 25°C dont le niveau d'éclairage (tubes Sylvania blancs et Grolux violets) est de 4000 Lux, la photopériode de 12h et une circulation d'air à fort taux de brassage (assurés par 2 ventilateurs centrifuges) pour éviter la production de condensation à l'intérieur des boîtes de Pétri.

1.4. Observations

Les lésions, typiques des cercosporioses des bananiers apparaissent 3 semaines après inoculation (photo 1). Un dénombrement des lésions est réalisé sur chaque fragment foliaire, chaque semaine pendant 8 à 10 semaines. Selon la même fréquence, la taille de 5 lésions choisies au hasard sur le fragment sera déterminée visuellement à l'aide d'un calibre

millimétré. En cas d'inoculation par goutte, seule la surface des lésions produites au point d'inoculation sera suivie.

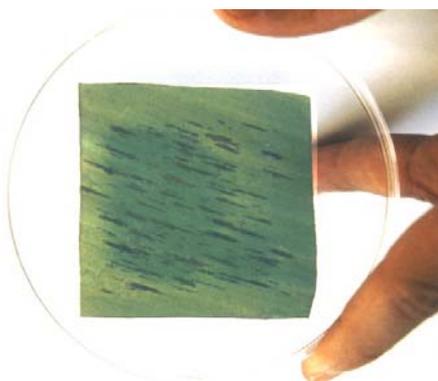


photo 1 : Symptômes de la maladie des raies noires obtenus sur un fragment de feuille de bananier sensible à la maladie, 49 jours après inoculation.

1.5. Interprétation des résultats

Les cinétiques d'évolution du nombre et de la surface des lésions permettent de déduire différents paramètres : le nombre maximum et la surface maximum des lésions (valeurs du plateau des cinétiques), la durée d'incubation 50 (permettant d'atteindre 50% du nombre maximum de lésions) et la vitesse d'extension des lésions. Les 2 derniers paramètres sont calculés après linéarisation des courbes d'évolution.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

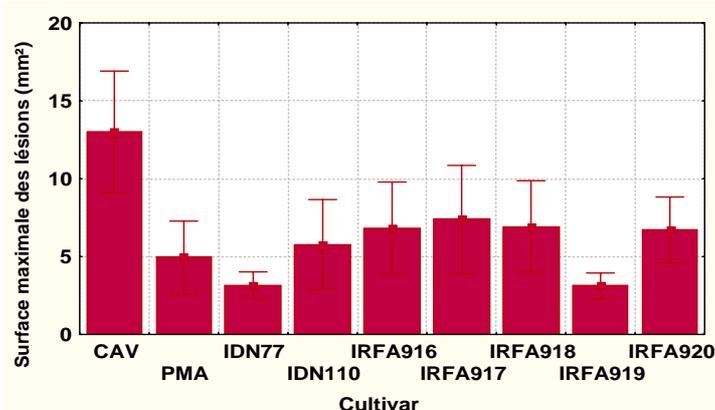


Figure 1 : Evaluation de la résistance à *M. fijiensis* de 5 hybrides. Surface maximale des lésions obtenue par inoculation en condition contrôlées (moyenne sur 3 isolats)

L'analyse des résultats dépend de l'objectif de l'étude. Dans le cas de la recherche de composantes de résistance partielle, l'analyse des résultats portera sur l'ensemble des paramètres observés. La surface maximale des lésions est le paramètre principal dans les études de sensibilité variétale. Une surface moyenne des lésions inférieure à celle obtenue sur le témoin sensible exprimera le caractère de résistance pour la variété évaluée. Dans une évaluation vis-à-vis de la maladie des raies noires, la taille des lésions était 2 à 3 fois plus petite pour des géniteurs résistants (PMA, IDN77 et IDN110) et les hybrides créés (à partir de ces géniteurs) en comparaison avec le génotype sensible –CAV– (figure 1). Ces résultats

montrent également la transmission des caractères de résistance. Pour les études de variabilité du pouvoir pathogène, l'inoculation est réalisée sous forme de goutte et seule la surface des lésions produites au point d'inoculation est comparée entre les différents isolats.

3. CONCLUSION

Cette méthode d'inoculation permet de reproduire le développement des symptômes dans les cas d'interactions compatibles et incompatibles, qui est similaire à celui observé en conditions naturelles d'infestation.

Cette méthode permet d'acquérir différents types d'informations portant sur l'évaluation de la résistance des bananiers (composantes de résistance partielle, sources de résistance, recherche de QTL de résistance), le niveau de sensibilité de nouvelles variétés (sélection variétale) ainsi que sur la variabilité du pouvoir pathogène et l'évolution des populations pathogènes (durabilité des résistances).

METHODE D'EVALUATION DES BANANIERES VIS-A-VIS DES MALADIES DE CONSERVATION INDUITES PAR LE *Colletotrichum musae* (BERK. & CURT.) ARX

Luc de Lapeyre de Bellaire¹, Marc Chillet¹, Yolande Chilin-Charles¹

Les maladies de conservation (anthracnose de blessure, anthracnose de quiescence, pourritures de couronnes) sont des facteurs qui limitent fortement la commercialisation des bananes exportées. Le *Colletotrichum musae* est à l'origine des deux formes d'anthracnose, tandis qu'un complexe parasitaire plus important est impliqué dans les pourritures de couronnes : *C. musae*, mais aussi d'autres espèces parmi lesquelles des *Fusarium*, des *Verticillium*, des *Botryodiplodia*. La sensibilité à ces maladies est variable en fonction des zones de production, mais aussi en fonction du stade de maturité des fruits, et la lutte est essentiellement chimique. Les variétés de bananiers cultivées pour l'exportation, sont triploïdes et généralement fortement stériles. Ceci complique les schémas d'amélioration génétique et peu de produits issus de l'amélioration ont été diffusés à ce jour. Par le passé, les objectifs des programmes d'amélioration génétique des bananiers ont essentiellement concerné l'obtention de variétés résistantes aux cercosporioses des bananiers et à la maladie de Panama. Aujourd'hui, les caractères relatifs à la qualité des fruits sont intégrés dans les programmes d'amélioration.

1. MATERIEL ET METHODES

L'évaluation des comportements variétaux est basée sur des inoculations artificielles avec le *Colletotrichum musae* pour les deux formes d'anthracnose et pour les pourritures de couronnes. L'objectif de cette méthode est de se rapprocher au mieux des conditions des contaminations naturelles.

1.1. Préparation du matériel végétal

Pour minimiser les contaminations naturelles qui peuvent se produire au champ, les pièces florales des fruits sont éliminées à la floraison (au stade doigts horizontaux), puis les régimes sont protégés par une gaine plastique. On utilise toujours des fruits provenant de la troisième main (éventuellement aussi ceux de la quatrième main). Enfin, les fruits sont récoltés à un stade physiologique comparable. Ce stade physiologique est mesuré en sommes de températures (mesurée en base 14), et correspond à 75% de la somme thermique nécessaire pour parvenir au stade « premier fruit jaune ou mûr »². La variété sensible Grande Naine est toujours utilisée comme référence.

1.2. Echantillonnage

La situation idéale est de disposer d'un échantillon de 20 régimes de chaque cultivar (ou traitement) étudié, et chaque régime est alors considéré comme une répétition³. Pour comparer

¹ Cirad-Flhor, Station de Neufchâteau - 97130 – Capesterre belle eau - Guadeloupe

² Pour les clones du sous-groupe Cavendish, cette somme thermique est de 900°C.jours, mais cette somme diffère en fonction des différents autres génotypes de bananiers.

³ Cet échantillon peut être facilement obtenu si l'on travaille sur une parcelle d'hybrides d'au moins une centaine de plants, ou bien si l'on compare un même clone (Cavendish, par exemple) dans différentes situations pédoclimatiques ou à différents stades de maturité.

des génotypes pour lesquels le nombre de bananiers disponibles ne permet pas de récolter 20 régimes au même stade physiologique (cas des collections de bananiers), on effectue un minimum de 10 répétitions à différentes époques de l'année¹, en récoltant à chaque fois un même nombre de régimes appartenant à la variété Grande Naine.

Pour chaque régime, on prélève sur la troisième main, en position médiane, deux fruits externes et un bouquet de 4 fruits, respectivement pour les inoculations : 'anthracnose de quiescence', 'anthracnose de blessure', et 'pourritures de couronnes'.

1.3. Préparation de l'inoculum ou du matériel « bioagresseur »

Une souche monospore de *Colletotrichum musae*² est cultivée sur milieu de Mathur (Mg SO₄, 7H₂O 2.5 g ; KH₂PO₄ 2.7 g ; Peptone 1 g ; Extrait de levure 1 g ; Saccharose 10 g ; Agar 15 g). La culture ne doit pas subir plus de 5 repiquages successifs³. Les cultures sont incubées à 25°C pendant 10 jours, avant de préparer deux suspensions calibrées à 10⁴ et 10⁶ conidies/ml au moyen d'une cellule de comptage de Malassez.

1.4. Inoculation et incubation

1.4.a. anthracnose de blessure

- Déposer une gouttelette de 25 µl d'une suspension calibrée à 10⁶ conidies/ml au centre d'une zone identifiée sur la face latérale d'un fruit. Déposer une pastille de papier Whatman de 5 mm sur la gouttelette. Appliquer ensuite un coton humide (eau distillée stérile), puis une bande de « scell-o-frais » autour du fruit. Transférer les fruits dans une enceinte régulée à 25°C.

- Au terme de 24 h, meurtrir la zone d'inoculation en effectuant une compression standardisée. Cette dernière est réalisée avec un piston à bout arrondi, de 1 cm de diamètre, qui exerce, durant 4 secondes et avec une vitesse de 5 mm/s, une déformation de 5mm. Le piston est piloté par un analyseur de texture TA-XT2 couplé au logiciel X-TRAD. Transférer les fruits dans une enceinte régulée à 20°C.

1.4.b. anthracnose de quiescence

Réaliser l'étape 1 de l'inoculation pour l'anthracnose de blessure comme au § 1.4.a. Ne pas effectuer les meurtrissures réalisées à l'étape 2.

1.4.c. pourritures de couronnes

Après la découpe du bouquet, attendre 20 minutes pour permettre l'écoulement du latex. Rafraîchir alors la couronne sur chaque face avec un couteau. Tremper la couronne dans de l'alcool 50%. Déposer une gouttelette de 50 µl d'une suspension calibrée à 10⁴ conidies/ml au sommet de la couronne. Appliquer une pastille de papier Whatman de 5 mm sur la gouttelette. Laisser les fruits à température ambiante pendant 3 h avant de les transférer à 13°C pendant 10 jours. Au terme de ces 10 jours, traiter les fruits à l'éthylène (1000 µl/l) pendant 24 h à 20°C. Aérer les fruits qui seront ensuite conservés encore 2 jours à 20°C.

¹ Veiller à ce que ces récoltes soient échelonnées et balayent les différences saisonnières.

² Plusieurs espèces de *Colletotrichum* cohabitent sur les bananiers. L'identification de l'espèce *C. musae* doit être établie auparavant. Les cultures de ce champignon ont généralement une croissance rapide (plus de 60 mm en 5 jours, à 25°C), un mycélium peu cotonneux et une sporulation abondante qui confère une coloration orangée à la culture. Un test de pouvoir pathogène sur fruits verts blessés doit obligatoirement être effectué. La comparaison des séquences des zones ITS1 et ITS2 avec des souches de références peut aussi confirmer l'appartenance à cette espèce.

³ Au-delà, de nouvelles cultures sont initiées à partir de suspensions conidiennes conservées à -80°C, dans du glycérol 30%.

1.5. Système de notation et interprétation des résultats

1.5.a. anthracnose de blessure et de quiescence : Dix jours après l'inoculation, commencer à mesurer la longueur (L) et la largeur (l) des nécroses, qui ont une forme elliptique. Leur surface (S) est estimée par la formule suivante : $S = L \times l \times \pi/4$. Répéter cette mesure de surface tous les 2-3 jours, jusqu'à ce que les fruits soient mûrs¹. Les valeurs des surfaces (S) sont ensuite soumises à une analyse de variance.

1.5.b. pourritures de couronnes

- Au terme des 10 jours de conservation à 13°C, faire une notation du développement externe des lésions (SEL)². Cette évaluation correspond à celle qui est faite en entrée de mûrisserie. Les valeurs des SEL sont ensuite soumises à une analyse de variance.

- Trois jours après le traitement à l'éthylène, mesurer la progression interne des lésions (PIL) : couper la couronne du bouquet en deux parties et mesurer la surface interne de la couronne (SC) et la surface interne de la nécrose (SN). Calculer alors $PIL = (SN/SC) \times 100$. Cette évaluation correspond à l'évaluation faite en sortie mûrisserie. Les valeurs des PIL sont transformées en arc Sinus racine carrée, si nécessaire, avant d'être soumises à une analyse de variance.

1.5.c. précautions pour les analyses de variance : Dans les cas où tous les régimes ont été récoltés à la même date, en dehors des vérifications d'usage, l'analyse de variance peut s'effectuer normalement sur les variables observées, et un test de comparaison de moyenne adapté permet de comparer les différents génotypes entre eux et à la variété de référence. Dans le cas où les régimes sont récoltés à des dates différentes, les génotypes sont évalués comparativement à la Grande Naine qui sert de contrôle des effets saisonniers³.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Anthracnose de blessure et de quiescence

Stade de récolte (°C.J)	S (mm ²)
700	644 (b)
900	1002 (a)

S (mm²) moyenne des surfaces des lésions. Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas selon le test de Newman-Keuls

Tableau 1: Comparaison du niveau de sensibilité à l'anthracnose de blessure de fruits récoltés à différents degrés de maturité (700 ou 900°C.J.)

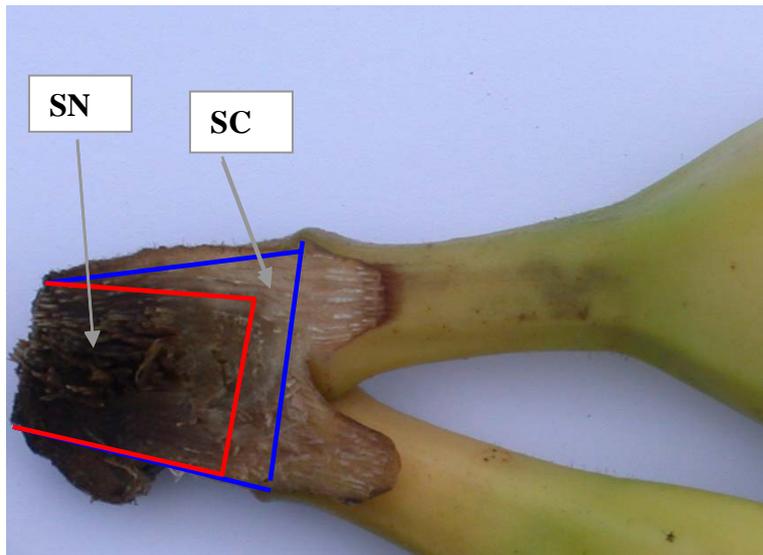
Ce résultat montre que le niveau de sensibilité des fruits à l'anthracnose de blessure est influencé par leur stade de maturité physiologique.

¹ Pour les tests de comparaison entre lots de bananes de type Cavendish, conserver les fruits 10 jours à 13°C, puis 10 jours à 20°C, avant de mesurer les surfaces des lésions.

² Note qualitative de 0 à 4 : 0, pas de symptômes ; 1, nécrose inférieure à 25% de la surface ; 2, nécrose comprise entre 25 et 50% de la surface ; 3, nécrose comprise entre 50 et 75% de la surface ; 4, plus de 75% de la surface est nécrosée.

³ Si les écarts par rapport à la grande Naine sont constants entre dates, additivité entre effet saisonnier (contrôlé par la Grande Naine) et effet génotype on peut conduire l'analyse de variance sur les écarts à la Grande Naine ou réaliser une analyse de covariance avec les valeurs de Grande Naine en covariable. Si les écarts sont proportionnels à la valeur de la moyenne, multiplicativité des effets, il faut alors analyser le rapport génotype/Grande Naine, et on se ramène à une situation d'additivité pour l'analyse de variance ou de covariance en analysant les transformés logarithmiques des valeurs observées. On choisit entre ces deux situations en testant la nullité de la pente de la droite de régression entre les écarts des valeurs génotype-Grande Naine et les valeurs de la Grande Naine.

2.2. Pourritures de couronnes



Mesure de la PIL sur une couronne découpée en deux.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La méthode décrite permet d'apprécier le niveau de sensibilité de différents génotypes de bananiers (clones cultivés, géniteurs, hybrides) à ces différentes maladies. Elle est utilisée pour mesurer le niveau de sensibilité aux maladies de conservation des hybrides obtenus par le Cirad-Flhor. Cette méthode est aussi utile pour évaluer la sensibilité de différents lots de fruits d'un même clone cultivé, en fonction de leur origine géographique ou de leur stade de maturité physiologique. Elle a été utilisée en Guadeloupe pour mettre en évidence des niveaux de sensibilité à l'antracnose de blessure en fonction des zones de production.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bakry F, Carreel F, Caruana ML, Côte FX, Jenny C, Tezenas du Montcel H (1997) Les bananiers. In *L'amélioration des plantes tropicales*, edited by Charrier A, Hamon S, Jacquot M, Nicolas D. Montpellier: CIRAD et ORSTOM.
- Chillet M, de Lapeyre de Bellaire L, Dorel M, Joas J, Dubois C, Marchal J, Perrier X (2000) Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and influence of edaphic conditions. *Scientia Horticulturae* 86:33-47.
- de Lapeyre de Bellaire L, Nolin J (1994) Amélioration du contrôle du chancre sur les bananes d'exportation et traitements post-récolte. *Fruits* 49 (3):179-185.
- de Lapeyre de Bellaire L, Chillet M, Dubois C, Mourichon X (2000) Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination. *Plant Pathology* 49:782-790.
- Finlay AR, Brown AE (1993) The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant Pathology* 42:67-74.
- Marin DH, Sutton TB, Blankenship SM, Swallow WH (1996) Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. *Plant Disease* 80:525-528.
- Meredith DS (1960) Studies on *Gloeosporium musarum* Cke and Masee causing storage rots of Jamaican bananas. I. Anthracnose and its chemical control. *Annals of Applied Biology* 48:279-290.
- Muirhead IF, Deverall BJ (1981). Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. *Physiological Plant Pathology* 19:77-84.

**EVALUATION DE LA SENSIBILITE DE GENOTYPES D'IGNAMES
A L'ANTHRACNOSE (*Colletotrichum gloeosporioides*) :
TEST *IN VITRO* SUR FEUILLES ISOLEES**

Guy Jacqua¹, Lise Frézal^{1,2} et Claire Neema²

L'igname *Dioscorea alata* représente 70 % des surfaces cultivées en igname en Guadeloupe. Sur cette espèce, le champignon *Colletotrichum gloeosporioides* est l'agent causal de l'antracnose, qui peut provoquer plus de 80 % de perte de production. Les traitements fongicides sont inopérants, la résistance variétale apparaît comme le meilleur moyen de lutte. Sa mise au point repose sur une caractérisation quantitative de la résistance. L'efficacité de l'évaluation dépend de la représentativité de la gamme d'isolats de *C. gloeosporioides* utilisée dans les tests. La méthode d'évaluation de la sensibilité de génotypes de *D. alata* est illustrée ici par le test des cultivars Pacala, Kabusah et Tahiti, inoculés à l'aide de 46 isolats de *C. gloeosporioides* collectés dans la région de Morne-à-l'Eau.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal

Pour chaque cultivar, des tubercules issus de culture saine sont utilisés. Ils sont immergés dans un bain fongicide de Banko Plus pendant une heure. Après 24 h de séchage, les tubercules sont découpés en semenceaux de 15 g, recouverts de cendres de bois et séchés à l'air libre pendant 48 h. Ils sont ensuite plantés en pots dans du terreau désinfecté à la vapeur et légèrement humidifié, et sont placés en serre. Des apports d'engrais (Mairol) sont effectués toutes les 3 semaines ainsi que des traitements insecticides et acaricides.

1.2. Obtention des isolats fongiques

Les colonies de *C. gloeosporioides* sont isolées à partir d'attaque sur les jeunes feuilles d'igname fraîchement collectées. Les feuilles sont désinfectées à l'aide d'un coton imbibé d'alcool. Une surface d'1mm² de lésion est découpée en bordure d'attaque, et placée sur milieu nutritif PDA. L'identité des colonies est vérifiée au microscope et, sur celles de *C. gloeosporioides*, des conidies prélevées et mises en suspension dans l'eau stérile, sont étalées sur de l'agar en boîte de Pétri. Après 4 h d'incubation à 30°C, le taux de germination des conidies est supérieur à 90 %. Pour réaliser des cultures monoconidiennes, 4 conidies sont prélevées individuellement et placées en tube sur milieu PDA incliné.

1.3. Test de sensibilité à l'antracnose

Les tests portent sur la gamme de cultivars dont on veut quantifier la sensibilité : Tahiti, Kabusah et Pacala, et sur un cultivar de référence pour la sensibilité à l'antracnose en Guadeloupe (Plimbite). De jeunes feuilles déployées sont prélevées avec 1 à 2 cm de pétiole. Elles sont ensuite lavées à l'eau du robinet et placées en boîtes de Pétri de 15 cm de diamètre, face supérieure posée sur du papier-filtre humidifié. Cinq feuilles indépendantes sont testées pour chaque cultivar. Les spores de cultures de *C. gloeosporioides* de 7 jours sont mises en

¹ INRA URPV, Centre Antilles Guyane, Domaine Duclos, 97170 Petit-Bourg

² INA-PG, Laboratoire de Pathologie Végétale, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris CEDEX 05

suspension à la concentration de 3.10^5 spores/ml. On vaporise 1,5 ml d'inoculum de façon homogène sur la surface de chaque feuille et 5 feuilles témoin sont vaporisées avec de l'eau. Les feuilles sont placées dans les boîtes de Pétri, dans une chambre de culture, pendant 11 jours (photopériode de 12 h de jour à 27°C et 12 h de nuit à 22°C). Une humidité saturante est maintenue par une aspersion d'eau quotidienne sur les feuilles.

1.4. Paramètres évalués et système de notation

Les pourcentages de surface saine et nécrosée des feuilles ont été quotidiennement notés. La différence entre ces deux surfaces correspond à une surface piquetée de lésions ponctuelles noires sur fond vert. L'observation des surfaces permet d'évaluer le temps d'incubation de chaque interaction (t incub), le pourcentage de la surface nécrosée maximale sur la surface foliaire totale (Nmax), le jour où la surface maximale est atteinte (tmax) et la cinétique d'évolution des symptômes (V0 : vitesse initiale ; V20-70: vitesse de croissance des nécroses entre les 20% et les 70% de la surface nécrosée N maximale, Nmax).



Photo 1 : test d'inoculation de l'antracnose sur feuilles d'ignames détachées

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Sensibilité des cultivars à la gamme de *C. gloeosporioides*

Deux isolats sur 46 sont avirulents sur les 4 génotypes, les 44 autres isolats interagissent de façon compatible avec au moins un des génotypes testés. Les interactions compatibles correspondent pour 92% des cas à des lésions typiques en nécrose continue (N) et pour 8% des cas à des lésions nécrotiques piquetées sur une zone foliaire verte (Vm). Sur un total de 44 interactions, 19 sont compatibles (N) avec Tahiti, 26 avec Kabusah, et 42 avec Pacala et Plimbite. On observe 8 interactions compatibles piquetées (Vm) avec Tahiti, 2 pour les Kabusah et Pacala, aucun pour Plimbite. Ainsi, aucun des génotypes ne possède de résistance totale à l'infection par des souches de l'échantillon de Morne-à-l'Eau dans nos conditions. Néanmoins, les génotypes Tahiti et Kabusah ont une résistance quantitative supérieure à celle de Pacala et Plimbite. Le fort taux de compatibilité Vm observé chez Tahiti indique la présence de déterminants de la résistance chez ce génotype car au niveau de l'extension du champignon dans les tissus foliaires, les infections avortent.

2.2. Déterminants de la résistance

Les résultats relatifs aux interactions compatibles champignon/génotype aident à différencier les comportements de chaque cultivar. La sensibilité de Pacala est caractérisée par une courte période d'incubation (69 h), une grande surface nécrosée dès l'apparition des symptômes (Nap=30) et une grande vitesse d'accroissement des surfaces nécrosées (V0 et V20-70). La faible résistance et l'importance des souches virulentes dans les populations de *C. gloeosporioides* expliquent la forte sévérité de l'antracnose observée sur Pacala. Les 3 autres génotypes ont des temps d'incubation et de mortalité des feuilles similaires (75h et 179h). La pénétration du champignon dans une feuille d'un de ces trois cultivars est plus lente que la pénétration dans la feuille de Pacala. La surface nécrosée au jour d'apparition des symptômes (Nap), les vitesses d'extension des nécroses initiale et V20/70, le nombre de feuilles totalement nécrosées, montrent qu'un déterminant de la résistance de Tahiti ralentit la colonisation des tissus ou le processus de nécrose des cellules foliaires. Par ailleurs, si le nombre de feuilles de Tahiti totalement nécrosées est de 2 à 5 fois inférieur que chez les autres génotypes, le temps de mortalité ne diffère pas significativement de ceux observés sur Plimbite et Kabusah. Tahiti semble posséder une composante de la résistance relative au développement intra foliaire du champignon. Cependant, il faut noter qu'il existe en Guadeloupe des souches qui ont contourné ce déterminant. La vitesse d'extension des surfaces nécrosées sur Kabusah est un peu moins rapide que celle sur Plimbite (V 20-70 de 14 pour Kabusah et 18 pour Plimbite). Les autres déterminants de la résistance de ces deux cultivars sont similaires. Ainsi, la plus grande résistance en champ de Kabusah à l'antracnose réside dans la composition des populations de *C. gloeosporioides* et leur manque d'adaptation. Comme pour Plimbite, les pressions de sélection pourraient mener à une adaptation des souches quasi totale.

Génotypes		Tahiti	Kabusah	Pacala	Plimbite (référence sensible)
Sensibilité des génotypes : interactions compatibles (IC)	ICN sur 44 interactions	19	26	42	42
	ICVm sur 44 interactions	8	2	2	0
	IC total sur 44 interactions	27	28	44	42
	IC total	61	64	100	95
Etapas impliquées dans la sensibilité observée : recherche des paramètres liés à la sensibilité	T incub (h)	75	74	69	76
	Mort (h)	183	172	157	181
	% nb mort	10	18	50	22
	Nmax	56	71	88	74
	t max (h)	255	253	226	247
	V0	6	10	19	10
	V20-70	11	14	21	18
	N Ap	0,5	1,6	8,3	1,6
N Ap+3	18	30	66	31	

ICN, ICM : nb de cas d'IC à symptômes N et M ; % nb mort : nb d'IC conduisant à la mort totale de la feuille en 11 j, en % du total observé ; t incub et mort : temps nécessaire à l'incubation et à la totale nécrose foliaire ; t max : temps nécessaire pour atteindre le maximum de surface nécrosée ; V0 : vitesse de croissance des nécroses pendant 72 h après l'apparition de la 1^{ère} nécrose, en % de surface nécrosée par jour ; V20-70 : vitesse de croissance des nécroses de 20%Nmax et les 70%Nmax, en % de surface nécrosée par jour.

Tableau 1 : composantes de la sensibilité des génotypes testés

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette méthode a permis d'étudier la variabilité de pouvoir pathogène présente dans une population de *C. gloeosporioides* sur une gamme de cultivars hôtes. Elle participe à la caractérisation des populations du *C. gloeosporioides* existant en Guadeloupe et à la détermination d'une gamme différentielle de souches pouvant être intégrée dans un processus de screening de résistance de différents cultivars de *D. alata*. Elle rend possible la comparaison des populations fongiques d'années et de lieux différents. Par ailleurs, elle peut contribuer à l'évaluation des degrés de résistance des génotypes de *D. alata* à l'antracnose. Un tel test rend aussi possible l'étude comparative de la résistance à l'antracnose entre deux îles ou pays, indépendamment des facteurs d'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bayard JD, Pallas B (1994) Résistance de l'antracnose de l'igname à un benzimidazole. *Phytoma*, 461 : 37-40
- Toribio A, Jacqua G (1978) Traitements fongicides contre l'antracnose de l'igname. *Nouvelles Agronomiques Antilles-Guyane* 4(3) : 147-152

INOCULATION EN CONDITIONS CONTROLEES DE FOLIOLES DETACHEES DE POMME DE TERRE, POUR DETERMINER L'AGRESSIVITE ET LA VIRULENCE D'ISOLATS DE *Phytophthora infestans*

Isabelle Glais¹, Roselyne Corbière¹

Le mildiou provoqué par *Phytophthora infestans* est une maladie redoutable vis-à-vis des Solanacées sauvages et cultivées (pomme de terre, tomate...). Les épidémies sont explosives avec un cycle majoritairement aérien et peuvent provoquer jusqu'à 100 % de pertes de rendement. L'évaluation de la diversité des populations et du pouvoir pathogène des isolats (virulence et agressivité) est nécessaire pour apprécier le comportement du matériel végétal. Le test décrit ici permet d'apprécier l'agressivité des isolats ou le niveau de résistance partielle des variétés. Il est réalisé en inoculant des folioles détachées provenant de plantes cultivées en serre avec une suspension de sporanges de *P. infestans*. Après incubation, différents critères sont notés. Les spécificités liées à l'application du test pour la détermination du profil de virulence seront expliquées en encart (page 146).

Une variété possède une **résistance** dite **spécifique** lorsqu'elle résiste totalement à certaines souches du parasite mais est sensible à d'autres. Toute race (pathotype) d'un agent pathogène qui est capable de surmonter un gène de résistance spécifique est dite **virulent**, à l'égard de la variété correspondante. L'**agressivité** (composante quantitative) correspond à l'attaque plus ou moins sévère d'un agent pathogène virulent. Elle fait référence à la **résistance partielle** ou polygénique. La virulence et l'agressivité sont les deux composantes du pouvoir pathogène.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal et de culture

- Tubercules (calibre 28/35) âgés de 6 à 7 mois, conservés à 7 °C, de variétés choisies et une variété témoin sensible comme Bintje (~ 4 à 6 plantes par variété pour 20-30 isolats à tester).
- Pots de 14 cm de diamètre (2 litres) et plateaux
- Mélange terreux : 1/3 sable, 1/3 tourbe, 1/3 terre
- Tuteurs (d'environ 80-100 cm de long)
- Engrais

1.2. Matériel

- Eau gélosée à 1 % (agar 10 g/L) en boîte de Pétri Ø 9cm (3 boîtes par isolats)
- Eau stérile
- Pipettes de 10 mL
- Pipettes de précision
- Pipettes Pasteur
- Hémacytomètre (cellule de Malassez, ...)
- Compteur à particules (si disponible)
- Tubes à hémolyse de 5 et 15 mL
- Boîtes transparentes en plastique
- Double décimètre
- Enceinte climatisée et serre
- Scalpel

¹ UMR BiO3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, iglais@rennes.inra.fr
corbiere@rennes.inra.fr

1.3. Production du matériel végétal

Avant la plantation, les tubercules sont placés à température ambiante (à l'abri de la lumière) entre 1 jour (si les germes sont bien formés) à 2 semaines (pour obtenir des germes d'environ 5 mm). Si les tubercules sont âgés et qu'ils présentent de grands germes à la sortie du local de conservation, les supprimer et ne garder que quelques petits pour obtenir de belles tiges.

Les tubercules sont plantés individuellement (profondeur 2 cm) dans des pots contenant un mélange terreux préalablement humidifié.

Les plantes sont cultivées en serre à 15-20 °C de préférence, avec une photopériode d'environ 16 heures. En plus des arrosages réguliers, une solution nutritive (ligne NPK 15/10/15 à une concentration finale de 2 g/L) est distribuée une fois par semaine.

Les tiges sont attachées régulièrement sur le tuteur dès qu'elles atteignent 15-20 cm.

Aucun traitement fongicide n'est effectué pendant la culture (si besoin traitement insecticide).

Multiplication des génotypes

Les plantes sont cultivées environ 4 mois. Les arrosages sont interrompus lorsque les feuilles deviennent jaunes et commencent à se dessécher. Les fanes sont coupées lorsque les plantes sont complètement desséchées et les tubercules sont laissés en pot pendant 15 jours sans arrosage. Ils sont ensuite récoltés pot par pot. Les conserver en sac papier ou filet dans un local sec et aéré, à l'obscurité vers 4°C. Il ne faut pas les conserver au delà d'un an, et prévoir qu'il faut plus de 5 mois entre la récolte des tubercules et leur plantation pour obtenir de nouvelles plantes (dormance des tubercules).

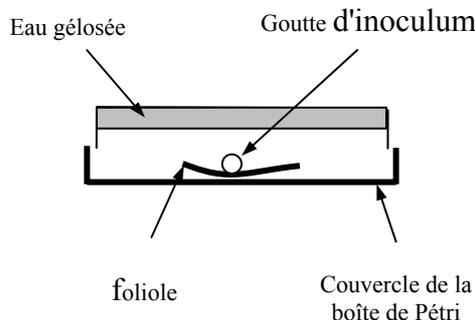
1.4. Préparation de l'inoculum (suspensions de sporanges)

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes et bien sporulées, cultivées en boîte de Pétri sur milieu petit pois¹ (~ 3 semaines à 15-18°C) ou sur folioles détachées. Les sporanges sont récupérés en versant environ 10 mL d'eau permutée stérile par boîte et en raclant légèrement la surface de la culture à l'aide d'une pipette Pasteur recourbée à la flamme en forme de râteau. La suspension obtenue est récupérée dans un tube à hémolyse et sa concentration estimée à l'aide d'un hémacytomètre. La concentration est ensuite ajustée à 5.10^4 spores/mL, puis la suspension est placée à 4°C pendant au moins 2 heures afin de libérer les zoospores.

1.5. Préparation des folioles

Six folioles, par variété de pomme de terre et par isolat à tester, sont prélevées à l'aide d'un scalpel, sur les étages intermédiaires des plantes, âgées de 6 à 8 semaines. L'âge physiologique de la plante pouvant influencer les résultats, il est préférable de prendre des folioles jeunes et latérales, de taille similaire.

La largeur (l) et la longueur (L) de chaque foliole sont mesurées au double décimètre, afin d'estimer leur surface, assimilée à une ellipse ($\pi \times L/2 \times l/2$). Deux folioles sont ensuite déposées l'une à côté de l'autre, face inférieure vers le haut, dans le couvercle d'une boîte de Pétri renversée, contenant de l'eau gélosée (afin d'éviter la dessiccation des folioles).



¹ **Milieu petit pois gélosé** : faire bouillir 125 g de petits pois congelés dans une casserole contenant 1 litre d'eau permutée (+200 mL pour tenir compte de l'évaporation), puis laisser mijoter pendant 30 à 45 min à petit bouillon. Verser le jus de cuisson à travers une passoire dans un flacon contenant 15 g d'agar (pour un litre de jus). Stériliser à 120 °C pendant 20 min, puis couler en boîte de Pétri.

1.6. Inoculation et incubation

Une goutte de 20 µL d'inoculum est déposée sur la face inférieure, au centre de chacune des 6 folioles. Les boîtes de Pétri sont repérées (nom de l'isolat et de la variété), puis rangées dans des boîtes plastiques transparentes (en n'oubliant pas d'ajouter une boîte de Pétri supplémentaire, contenant de l'eau gélosée sur chaque pile de boîte pour limiter l'évaporation). Les folioles sont ensuite mises à incuber pendant 7 jours en chambre climatisée, réglée à 18°C durant la période éclairée (16h/jour) et à 15 °C pendant la période sombre (attention il ne faut pas trop de lumière).

1.7. Système de notation

Plusieurs variables permettent d'apprécier les différentes composantes de l'agressivité des isolats :

1.7.a. Les variables mesurées

La période d'incubation, qui correspond au temps entre l'inoculation et l'apparition du 1er symptôme (environ 3 jours), est notée en nombre de jours pour chaque foliole.

La période de latence est définie comme le laps de temps, en jours, compris entre l'inoculation et l'apparition des premiers sporanges ; elle est déterminée par l'observation quotidienne, à la loupe, des folioles présentant des symptômes.

La taille des lésions est déterminée généralement à 7 jours (ou tous les jours à partir de la date d'apparition du symptôme, pour déterminer une vitesse de croissance) en mesurant le plus petit et le plus grand diamètre de la lésion. La surface de la lésion est calculée en l'assimilant à une ellipse.

La production de spores est généralement déterminée après 7 jours en dénombrant le nombre total de sporanges produits sur chaque foliole. Les suspensions de sporanges sont obtenues, en plaçant chaque foliole, par exemple dans un flacon de 50 mL contenant 10 mL d'eau pour un comptage à l'hémacytomètre ou 10 mL d'Isoton II (tampon salin) pour l'utilisation d'un compteur à particules (Coulter Z2, Beckman Coulter France SA, capillaire de 100 µm de diamètre et seuils de mesure de 7 µm et 25 µm).

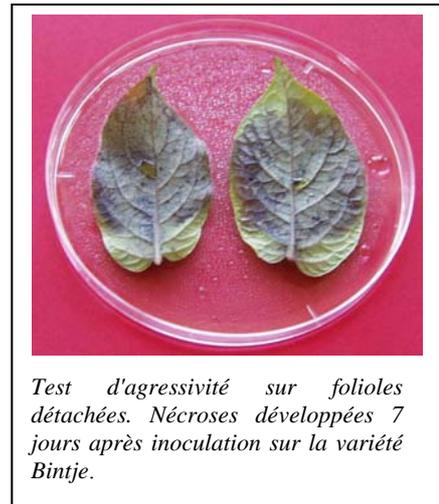
Les flacons sont agités doucement pendant 20 à 30 secondes. La concentration de spores doit être déterminée assez rapidement après le prélèvement (surtout pour un comptage au compteur, car les spores germent). Sinon, les suspensions, sans les folioles, peuvent être conservées au congélateur, de préférence dans un tube en verre car le plastique adsorbe les spores. Deux comptages successifs sont réalisés sur chaque suspension (bien homogénéiser la suspension entre chaque mesure).

1.7.b. Les variables calculées

L'efficacité de l'infection, c'est-à-dire le pourcentage de folioles ayant développé un symptôme à la fin de l'expérimentation, par isolat et par variété.

Le pourcentage de surface foliaire nécrosée est calculé en divisant la taille de la lésion par celle de la foliole correspondante.

La capacité de sporulation qui représente le nombre de sporanges produits par cm² de lésion, est calculé pour chaque foliole, comme le rapport : production de spores / taille de la lésion.



Test d'agressivité sur folioles détachées. Nécroses développées 7 jours après inoculation sur la variété Bintje.

Application du test à la détermination du profil de virulence

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal et de culture

Les variétés utilisées pour ce test correspondent à une gamme différentielle internationale constituée de 11 génotypes différents de pomme de terre, possédant chacun un gène majeur de résistance au mildiou (R1 à R11) et 2 témoins sensibles Bintje et Craig's Royal dépourvus de gène R. Le matériel de culture est identique au précédent.

1.2. Matériel

- boîtes cloisonnées (12x12 cm à 4 compartiments avec 3 boîtes par isolat x 2 répétitions) ou boîtes d'eau gélosée.
- papier filtre stérile.
- et même matériel. (Voir §1.2)

1.3. Production du matériel végétal identique au test précédent

1.4. Préparation de l'inoculum (suspensions de sporanges) identique au test précédent

1.5. Préparation des folioles

Deux folioles sont prélevées sur chaque génotype de la gamme et par isolat à tester. Les folioles sont déposées individuellement dans chacun des compartiments des boîtes cloisonnées, face inférieure vers le haut sur un papier filtre humidifié par 1 mL d'eau. Noter le nom de l'isolat et des génotypes sur les couvercles de chaque boîte.

La taille des feuilles n'est pas mesurée pour ce test.

1.6. Inoculation et incubation

Deux gouttes de 20 µL sont déposées sur chaque foliole (soit 1 goutte par demi-foliole). Mêmes conditions d'incubation que pour le test d'agressivité.

1.7. Système de notation

Seule la présence (+) ou l'absence (-) de symptômes sporulants est notée visuellement pour chaque demi-foliole, après 7 jours d'incubation. En cas de doute, la présence de sporanges est vérifiée sous loupe.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les réactions compatibles vis-à-vis des variétés de la gamme différentielle définissent un profil de virulence caractéristique d'une race (ou pathotype) du parasite. Si un isolat est de race 1-4-7 par exemple, cela veut dire qu'il contourne les gènes majeurs de résistance R1, R4 et R7, mais pas les autres gènes de résistance testés et donc qu'une nécrose s'est développée uniquement sur les génotypes possédant R1, R4 et R7.

La répartition des races peut être plus ou moins diverse selon l'origine des isolats et les années d'isolement. En général, les races sont assez complexes, chaque isolat contournant au minimum 4 à 5 gènes résistance.



L'isolat testé ici ne contourne pas le gène R2, mais contourne les gènes R1 et R3. Le témoin Bintje est positif. (profil partiel 1-3).

1.8. Elimination des déchets

Les souches étrangères ou de type sexuel A2 sont incinérées, et les déchets évacués selon les normes de l'unité.

P. infestans présente un hétérothallisme avec deux types sexuels A1 et A2. La reproduction sexuée a lieu lorsque les deux types sexuels sont en présence et se traduit par la formation d'oospores. Les souches A2 sont peu présentes en France actuellement.

1.9. Analyses et traitement des données

Pour chaque variable mesurée, les résultats sont comparés entre isolats ou entre variétés selon l'objectif de l'expérimentation. Si besoin et en fonction du nombre d'isolats ou du nombre de variétés testées, une analyse statistique (ANOVA) est effectuée pour comparer les différentes variables.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

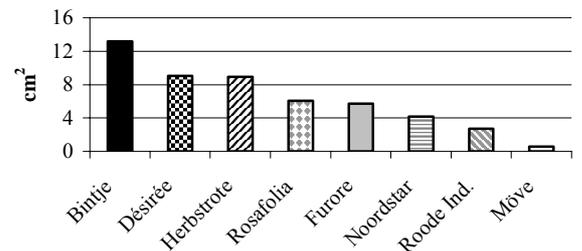
Les graphiques ci-contre montrent les résultats obtenus pour deux des composantes de résistance. D'une part, la taille des symptômes causés par une souche de *P. infestans* varie en fonction des variétés testées. La variété sensible Bintje présente les lésions les plus importantes, tandis que la variété Möve présente de très petites lésions, avec la souche testée (Bmt 2). A l'inverse, la période de latence est importante sur Möve et courte sur d'autres variétés.

Les résultats permettent de déterminer si l'agressivité des isolats est différente en fonction de leur origine géographique, de l'année d'isolement ou des variétés (d'où ils ont été prélevés ou qui sont utilisées dans le test).

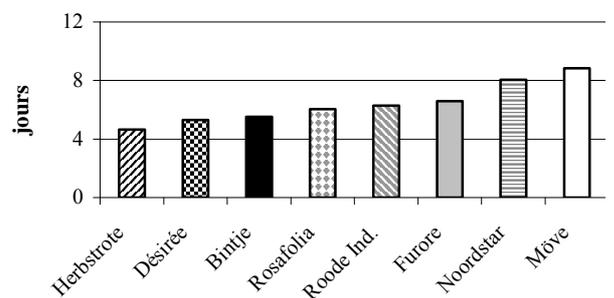
Le niveau de résistance partielle des variétés doit être testé avec différentes souches de *P. infestans*. Pour apprécier l'agressivité d'un isolat ou le comportement d'une variété, il est souvent important d'analyser plusieurs composantes de la résistance, car elles ne sont pas nécessairement liées entre elles. La période d'incubation et l'efficacité d'infection traduisent la capacité de pénétration de l'agent pathogène dans les tissus végétaux ; la taille des lésions représente la progression de *P. infestans* dans les folioles ; la sporulation correspond à sa multiplication.

3. CONCLUSION

Ces tests peuvent également être réalisés sur tomate. Ils permettent de comparer des variétés selon différentes composantes ou de comparer des isolats (diversité des populations, adaptation,...). Ces composantes sont des éléments intéressants à prendre en compte pour comprendre l'épidémiologie de la maladie, réaliser des programmes de sélection efficaces ou pour étudier la durabilité des résistances. Ces tests ont été mis en œuvre à l'UMR BiO3P de Rennes pour étudier entre autre, l'adaptation de souches de *Phytophthora infestans* à des génotypes de pomme de terre présentant différents types ou niveaux de résistance.



Taille des lésions foliaires en cm², observée sur différents cultivars de pomme de terre, 7 jours après inoculation avec la souche Bmt 2 de *Phytophthora infestans*.



Période de latence en jour, observée sur différents cultivars de pomme de terre après inoculation avec la souche Bmt 2 de *Phytophthora infestans*

EVALUATION DU COMPORTEMENT DE GENOTYPES DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DE LA FORME SEXUEE DE *phytophthora infestans*, AGENT DU MILDIOU

Roselyne Corbière, Isabelle Glais¹

Phytophthora infestans, agent du mildiou de la pomme de terre, est un Oomycète hétérothallique, avec deux types de compatibilité sexuelle, A1 et A2. La présence simultanée de souches de type opposé, sur une même plante, peut conduire à la formation d'oospores, organes de la reproduction sexuée, qui constituent une forme de conservation à long terme de l'inoculum. La résistance des génotypes de pomme de terre est généralement évaluée vis-à-vis de la forme asexuée de *P. infestans*, mais la gestion des résistances doit aussi prendre en compte le comportement des génotypes vis-à-vis de la forme sexuée de *P. infestans*.

Le comportement des génotypes est estimé, en conditions contrôlées, sur folioles détachées, inoculées avec un couple d'isolats A1/A2. La quantité d'oospores produites est le critère retenu pour déterminer la résistance ou la sensibilité des génotypes à la forme sexuée de *P. infestans*.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal et de l'inoculum

La culture en serre des génotypes de pomme de terre, ainsi que la préparation des folioles et celle des suspensions de sporanges de *P. infestans* sont présentées dans l'article « Inoculation en conditions contrôlées de folioles détachées de pomme de terre, pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *P. infestans* » (Glais et Corbière, 2005).

Inclure dans le test un génotype sensible, comme Bintje, qui sert de témoin positif.



Oospore, diamètre d'environ 35 µm, observée au microscope (x 1000)

Isolements de *P. infestans*, à partir de nécrose foliaire ou de tige malade

Les isolements sont réalisés sur tubercules de pomme de terre d'une variété sensible, par exemple Bintje.

- couper des tubercules, préalablement lavés et désinfectés (ou pelés), en tranches épaisses, puis les recouvrir de papier filtre pour absorber l'humidité.
- placer ces rondelles dans des boîtes plastiques hermétiques, sur un tampon éponge humidifié.
- prélever de petits fragments de tissu malade, à la lisière de la nécrose, avec un scalpel stérile.
- déposer 2 fragments sur chaque rondelle, un à chaque extrémité (face sporulante de la nécrose au contact du tubercule).
- bien fermer les boîtes et mettre à incuber à 15°C, pendant environ 5 jours.
- dès qu'un amas de mycélium s'est formé, le prélever stérilement, en évitant de toucher le tubercule et le déposer sur milieu solide petit pois contenant des antibiotiques (ampicilline 200 mg/L, rifamycine 30 mg/L ; benlate 10 mg/L, piramycine 0,4 mL/L).
- mettre à incuber à 15°-18°C.
- lorsque les colonies ont un peu poussé, les repiquer à nouveau sur milieu.

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

1.2. Choix des isolats A1 et A2 pour constituer les couples

- inoculer des folioles des génotypes à tester avec des isolats A1 et A2 individuellement, pour choisir ceux qui causent des lésions sur la majorité des génotypes.
- tester la fertilité de couples A1/A2, en confrontant les isolats sur milieu de culture. Sélectionner de préférence les couples produisant un nombre important d'oospores.

1.3. Inoculation des folioles et incubation

- préparer deux suspensions de sporanges (à 5.10^4 spores/mL), l'une d'un isolat A1 et l'autre d'un isolat A2.
- mélanger en proportion égale les deux suspensions dans un tube à hémolyse.
- déposer, au centre de chaque foliole (préalablement disposée, face inférieure vers le haut, dans une boîte de Pétri avec de l'eau gélosée), une goutte de 20 μ L de la suspension d'inoculum (mélange de sporanges A1 et A2).
- faire cinq répétitions : inoculer cinq folioles par génotype analysé et par couple d'isolats.
- ranger les boîtes de Pétri dans des grandes boîtes fermées, en plastique transparent.
- mettre les folioles à incuber, en enceinte climatisée 21 jours, à 15°C (photopériode de 16 h).

1.4. Révélation des oospores (technique adaptée de Cohen *et al.*, 1997)

- plonger les folioles dans un bain d'éthanol bouillant pendant 5 min, afin de les rendre translucides, puis les rincer dans un bain d'eau.
- découper chaque foliole, avec un scalpel, dans le sens de la longueur après l'avoir déposée sur une surface plane et dure, par exemple une lame de microscope (attention à ne pas déchirer la foliole qui est devenue très fragile).
- déposer avec précaution chaque demi-foliole sur une lame de microscope et la recouvrir immédiatement d'environ 1 mL d'une solution de glycérol à 50 % dans de l'eau stérile.
- monter la foliole entre lame et lamelle (L = 65 mm ; l = 24 mm), sans plisser la foliole.
- écraser légèrement la foliole, en appuyant de façon homogène sur la lamelle, avec une gomme par exemple.

1.5. Système de notation

- dénombrer les oospores sous le microscope, au grossissement total d'environ 100, dans deux champs, situés autour du point d'inoculation. L'observation est réalisée sur cinq demi-folioles par génotype et par couple d'isolats (seule une demi-foliole est observée, pour chacune des folioles inoculée).
- si le nombre d'oospores, autour du point d'inoculation, est très faible à nul, vérifier la présence ou l'absence d'oospores sur l'ensemble de la foliole.

1.6. Elimination des déchets

- incinérer obligatoirement les isolats de type sexuel A2, les isolats étrangers, les boîtes de confrontation et les folioles inoculées (les isolats A2 étant très rares en France).
- éliminer les isolats français A1, ainsi que l'alcool, selon les normes de l'Unité.

Détermination du type de compatibilité sexuelle des isolats

Le test est réalisé sur milieu petits pois, en boîte de Pétri, par confrontation de l'isolat à tester avec une souche de référence A1 et une A2.

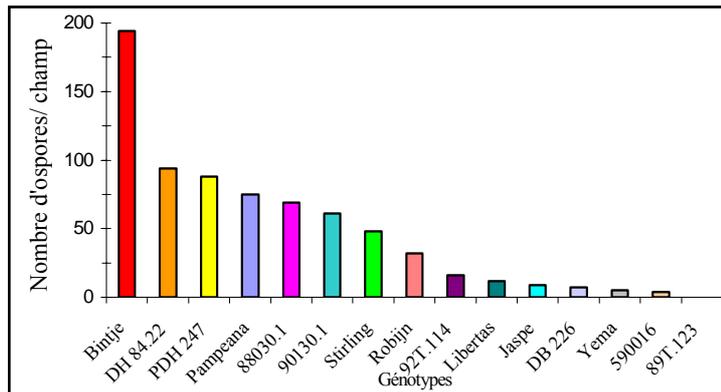
- déposer dans trois boîtes, 2 explants à 1,5 cm de distance : isolat à tester + A1, isolat + A2 et isolat avec lui-même
- mettre à incuber à 15°C, pendant 12 à 15 jours.
- observer la présence des oospores, à la ligne de confrontation, sous loupe binoculaire (X 40), en retournant les boîtes de Pétri.
- l'isolat testé est A1 si des oospores sont observées lors de la confrontation avec A2, mais pas avec A1 ; l'isolat est A2, dans le cas contraire. Si des oospores sont observées dans les deux cas, il s'agit d'un mélange d'isolats ou d'un isolat autofertile.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Avec cette technique, les oospores sont bien visualisées dans les tissus, comme le montre la photographie ci-dessous. La production d'oospores est très variable selon les génotypes : elle est importante chez Bintje, faible à nulle dans certains autres, ce qui permet de déterminer leur comportement vis-à-vis de la forme sexuée.

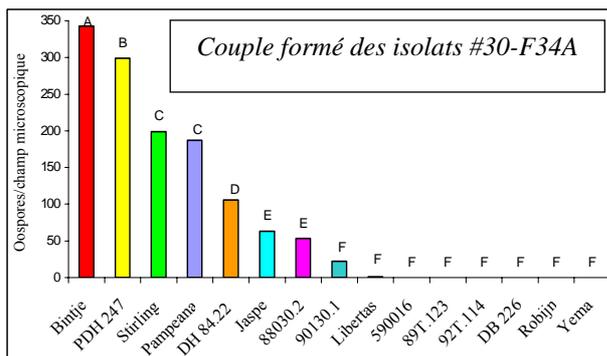


Oospores observées au microscope (x100) dans les tissus foliaires décolorés.

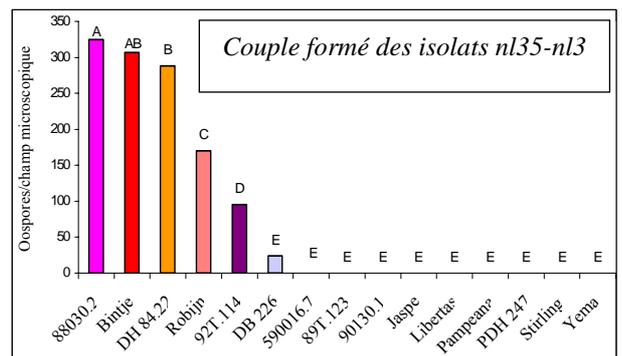


Nombre moyen d'oospores, par champ microscopique et par génotype testé avec sept couples d'isolats A1/A2.

Cependant, il est important de tester les génotypes avec plusieurs couples, car leur classement varie selon le couple choisi, comme l'illustrent les deux graphiques ci-dessous.



Couple formé des isolats #30-F34A



Couple formé des isolats nl35-nl3

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De grandes différences dans le comportement des génotypes vis-à-vis de la forme sexuée de *P. infestans* sont observées. Certains, partiellement résistants au champ, se révèlent sensibles à la forme sexuée ; d'autres montrent un bon niveau de résistance aux deux formes de reproduction. Comme la réponse des génotypes est spécifique du couple considéré, on pourrait envisager de réaliser ce test avec plusieurs couples en mélange. La prise en compte de la forme sexuée de *P. infestans* dans des programmes de sélection est indispensable, car les oospores peuvent jouer un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie (conservation de l'inoculum dans le sol) ; elles favorisent l'apparition de nouvelles populations de l'agent pathogène, due au brassage génétique, induisant ainsi des risques d'érosion des résistances.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cohen Y, Farkash S, Reshit Z, Baider A (1997) Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology* 87 :191-196.
- Glais I, Corbière R (2005) Inoculation en conditions contrôlées de folioles détachées de pomme de terre, pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *P. infestans*. Cahier des Techniques de l'INRA.

TESTS DE RESISTANCE DU MELON A L'OÏDIUM SUR DISQUES DE FEUILLES

Didier Besombes et Nathalie Giovinazzo ¹

L'oïdium du melon se rencontre dans le monde entier en plein champ comme sous abri. Cette maladie qui atteint principalement les tiges et les feuilles (aspect blanc poudreux) provoque une baisse de rendement et une baisse de qualité des fruits.

Les deux principaux agents responsables de l'oïdium sur melon sont *Sphaerotheca fuliginea* et *Erysiphe cichoracearum* (récemment rebaptisés respectivement *Podosphaera xanthii* et *Golovinomyces cichoracearum*). Au sein de ces deux espèces des races sont définies en fonction de réactions d'hôtes différentiels (à ce jour 2 races pour *E. cichoracearum* et 6 races pour *S. fuliginea*). Il s'agit de parasites obligatoires qui ne peuvent être multipliés que sur une plante sensible.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation de l'inoculum

Les différentes souches sont conservées par repiquages successifs sur cotylédons détachés de *Lagenaria* maintenus en survie sur milieu gélosé en boîte de Pétri (Saccharose 10g/l, Mannitol 20g/l, Gélose 5g/l). Les cotylédons sont préalablement désinfectés superficiellement au bichlorure de mercure (0,05% HgCl₂, 2% Ethanol, 0,04% Tween).

La multiplication de l'inoculum doit se faire environ dix jours avant la date du test. Le nombre de cotylédons nécessaires dépend du nombre de boîtes à inoculer (1 cotylédon bien sporulé par boîte).

1.2. Inoculation et incubation

Par plante, et pour chaque souche étudiée, deux disques de feuille de 2 cm de diamètre sont prélevés sur des plantes au stade « 3 feuilles » : un disque sur la première feuille (feuille vieille) et un disque sur la troisième feuille (feuille jeune). Plusieurs disques peuvent être prélevés sur chaque plante, permettant d'inoculer plusieurs souches. Les disques sont disposés dans des boîtes en polystyrène (185 x 125 mm, 54 disques de feuille) sur un milieu gélosé (mannitol 10 g/l, benzimidazole 30 mg/l, gélose 4g/l). Pour l'inoculation la boîte est placée à la base d'une tour à inoculer (hauteur = 100 cm ; diamètre 25 cm). A l'aide d'une pince fine, on tient au sommet de la tour un cotylédon bien recouvert d'inoculum d'oïdium et on souffle avec une pipette Pasteur pour détacher les spores. On attend 1 à 2 min pour que les conidies tombent régulièrement sur la boîte. Après avoir refermé les boîtes de polystyrène on les met à incuber dans une chambre climatisée (20 °C jour et 24 °C nuit avec 14 h de jour).

Les notations peuvent se faire une dizaine de jours après l'inoculation.

¹ INRA, Station de Génétique et d'Amélioration des Fruits et Légumes, BP 94, 84143 Montfavet Cedex

1.3. Notation

Chaque boîte inoculée doit contenir un disque de chaque hôte différentiel permettant de vérifier les espèces et/ou les races utilisées dans le test. Les témoins sensibles permettent de déterminer les dates de notations, la vitesse d'apparition des symptômes pouvant différer d'une boîte à l'autre. *E. cichoracearum* se développe généralement plus lentement que *S. fuliginea*.

L'échelle de notation comprend 6 niveaux :

- Note 0 = absence de symptômes
- Note 1 = colonies isolées couvrant moins de 10% de la surface du disque
- Note 3 = colonies isolées ne couvrant pas la totalité de la surface du disque
- Note 5 = disque couvert par une très faible sporulation
- Note 7 = disque entièrement couvert par une sporulation moyenne
- Note 9 = disque entièrement couvert par une sporulation intense

	<i>S. fuliginea</i>						<i>E. cichoracearum</i>	
	Race 0	Race 1	Race 2	Race 3	Race 4	Race 5	Race 0	Race 1
IRAN H	S	S	S	S	S	S	S	S
Védrantais	R	S	S	S	S	S	R	S
PMR 45	R	R	S	S	S	S	R	S
WMR 29	R	R	R	R	S	S	R	S
EDISTO 47	R	R	R	S	R	S	R	S
MR-1, PI 124112,	R	R	R	R	R	R	R	R
PMR 5	R	R	R	S	R	R	R	R
Nantais oblong	R	S	S	S	S	S	R	R

Tableau 1 : Expression de la Résistance au sein d'une gamme de variétés témoins (hôtes différentiels), **R**=résistant, **S**=sensible

1.4. Interprétation des résultats

Le nombre de plantes, donc de disques, testés pour chaque lot dépend du matériel étudié (hybrides commerciaux, lignées recombinantes, etc...). Les lots avec des notes de disques entre 0 et 3 sont considérés « résistants », avec des notes entre 3 et 5 « intermédiaires », avec des notes supérieures à 5 « sensibles ». Enfin les lots avec des disques ayant des notes de catégories différentes sont déclarés « en disjonction ».

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Dans l'exemple de la photo 1 on peut voir le résultat d'une inoculation de disques issus des mêmes plantes avec *S. fuliginea* race 1 (boîte du bas) et race 2 (boîte du haut).

Trois cas de figures sont représentés :

- une plante résistante à la race 1 (disque A1) et sensible à la race 2 (disque A2),
- une plante résistante à la race 1 et à la race 2 (disques B),
- une plante sensible à la race 1 et à la race 2 (disques C),

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce test est utilisé en routine dans le laboratoire notamment dans le cadre des vérifications des déclarations des obtenteurs auprès du GEVES. Il a servi et sert encore aujourd'hui pour la recherche de résistances parmi nos ressources génétiques. Il est employé également, sur des

populations de lignées recombinantes, pour des études du déterminisme génétique de la résistance aux différentes races d'oïdium.

L'interprétation de ce type de test étant quelque peu délicate il est préférable que ce soit toujours la même personne qui réalise la lecture. Lorsqu'on a beaucoup de disques avec une sporulation faible il est possible de faire la lecture à la loupe binoculaire (plus long). Dans les cas les plus difficiles il est possible de coupler cette technique avec une inoculation sur plante entière. Cependant cette technique est beaucoup plus lourde à mettre en place et ne permet pas de tester de gros effectifs

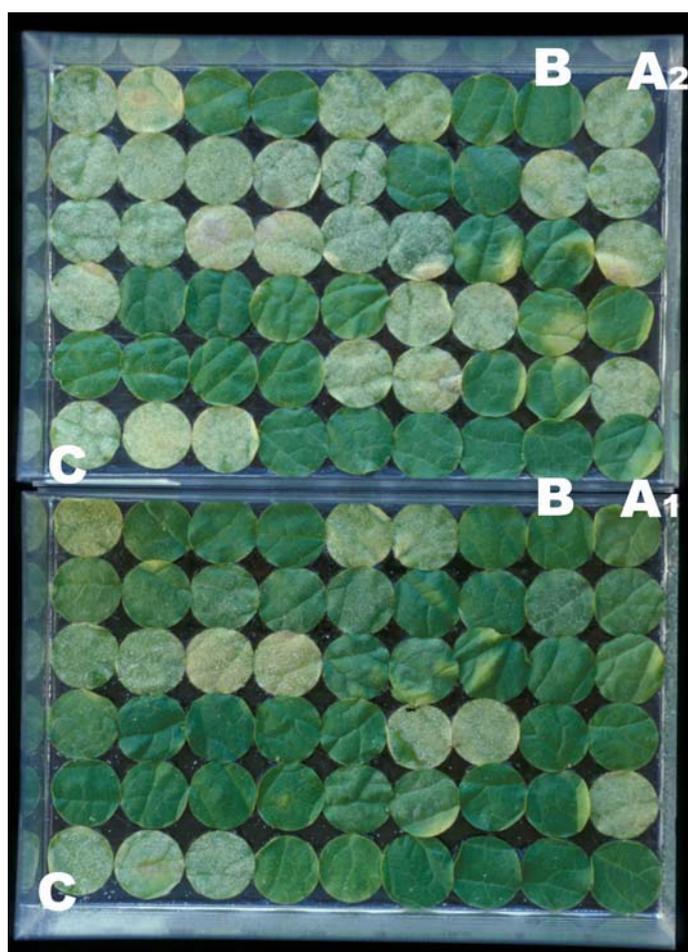


Photo 1 : exemple de boîtes de disques de feuilles inocuées

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bardin M. (1996) Diversité phénotypique et génétique des oïdiums des cucurbitacées, *Sphaerotheca fuliginea* et *Erysiphe cichoracearum*. Thèse Université Claude Bernard – Lyon 1, 160p.
- Bertrand F. (1991) Les oïdiums des cucurbitacées. Maintien en culture pure, étude de leur variabilité et de la sensibilité chez le melon. Thèse Université Paris Sud– Orsay, 259p.

QUANTIFICATION PAR PCR EN TEMPS REEL DU DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS *ALTERNARIA BRASSICICOLA* ET *BOTRYTIS CINEREA* SUR *Arabidopsis thaliana*.

Claire Gachon¹, Patrick Saindrenan¹

Dans les pathosystèmes *Arabidopsis/Alternaria* et *Arabidopsis/Botrytis*, la plupart des tests de résistance actuellement utilisés reposent sur la mesure du diamètre des lésions. Lourds à mettre oeuvre, ces tests souffrent d'une variabilité importante, susceptible de masquer des variations significatives de niveaux de résistance des plantes ou d'agressivité de l'agent pathogène. Le suivi *in planta* du développement des champignons par PCR en temps réel constitue une alternative sensible, robuste, et simple à mettre en oeuvre par rapport aux tests actuels.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Matériel végétal et inoculation

L'inoculation est réalisée sur des plantes âgées de 6 à 7 semaines, cultivées en jours courts (8 h), à 20° C, et sous une humidité relative de 75%. La souche d'*Alternaria brassicicola* MUCL20297 provient de W.F. Brokaert (Université de Louvain, Belgique). La souche de *Botrytis cinerea* est un don de Thierry Barchietto (société Biotransfer). Les inoculations sont réalisées en déposant 3 gouttes de 3 µL sur chaque feuille. Les plantes inoculées avec *Botrytis* sont également blessées avec une aiguille de seringue. Après inoculation, les plantes sont maintenues sous humidité saturante.

1.2. Extraction d'ADN

L'ADN est extrait selon la technique d'Edward *et al.* (1991), avec quelques modifications. Chaque échantillon contient 4 feuilles congelées et broyées dans l'azote liquide. 1,6 mL de tampon d'extraction (0,2 M Tris-HCl pH 7,5, 0,25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) y est ensuite ajouté. Les échantillons sont incubés une heure à température ambiante, puis centrifugés 10 min à 13.000 g. 300 µL de surnageant sont prélevés et mélangés en proportion égale avec de l'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13.000 g pendant 10 min. Le culot (souvent de couleur brunâtre) est lavé deux fois avec de l'éthanol 70% (v/v), puis repris dans 500 µL d'eau.

1.3. PCR en temps réel

Chaque réaction de PCR est composée de 10 µL de chaque échantillon d'ADN, de 12,5 µL de SybrTMGreen Mastermix (Eurogentech, Serain, Belgique), et des amorces adéquates à la concentration finale de 300 nM. Le volume final est fixé à 25 µL. Les réactions sont réalisées en duplicates, et les échantillons sont quantifiés à partir d'une gamme étalon tracée à partir de dilutions sériées d'ADN génomique de chaque espèce étudiée. Le programme de PCR est le suivant : 2 min à 50 °C, 10 min à 95 °C, et 40 cycles de 15 s à 95 °C et 1 min à 60 °C. La réaction de PCR est suivie par l'acquisition d'une courbe de dissociation entre 60 et 95 °C

¹ Institut de Biotechnologie des Plantes, UMR 8618, Université Paris XI-CNRS, Bâtiment 630, 91405 ORSAY Cedex, France. Tel : 33 (0)1 69 15 33 64. Fax : 33 (0)1 69 15 34 24. mél : saindrenan@ibp.u-psud.fr

destinée à vérifier la spécificité de l'amplification. La séquence des amorces utilisées ainsi que leur cible est précisée dans le Tableau 1.

Séquence cible	N° d'accession	Nom de l'amorce	Séquence (de 5' en 3')
α -Shaggy Kinase <i>Arabidopsis</i>	<u>At5g26751</u>	iASK1	CTTATCGGATTTCTCTATGTTTGGC
		iASK2	GAGCTCCTGTTTATTTAACTGTACATACC
cutinase A <i>A. brassicicola</i>	<u>ABU03393</u>	CG9	GCATGTCCGCTCACCAATATC
		CG10	GCCTGGGATCTTGGAATGC
cutinase A <i>B. cinerea</i>	<u>Z69264</u>	CG11	AGCCTTATGTCCCTTCCCTTG
		CG12	GAAGAGAAATGGAAAATGGTGAG

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées dans ce travail.

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Principe de la quantification

La méthode présentée ici a été décrite en détail par Gachon *et al* (2004). Elle repose sur la quantification relative dans chaque échantillon de l'ADN de plante et de l'ADN fongique par la réalisation de deux réactions de PCR en temps réel, l'une dirigée contre un gène de plante (une α -Shaggy kinase-like, iASK), l'autre contre un gène fongique (la cutinase A, cutA). Le rapport des deux (cutA/iASK) est influencé à la fois par le développement du champignon et par la dégradation éventuelle de l'ADN de plante liée à la progression des symptômes. Ce rapport n'est donc pas une mesure de la biomasse fongique présente sur la plante, mais un indicateur intégrant à la fois le développement de l'agent pathogène et la réponse de la plante hôte. Il est donc très adapté à l'évaluation de la résistance de plantes contre un agent pathogène ou à la mesure de l'agressivité de différentes souches de champignon.

2.2. Spécificité, sensibilité et robustesse du test

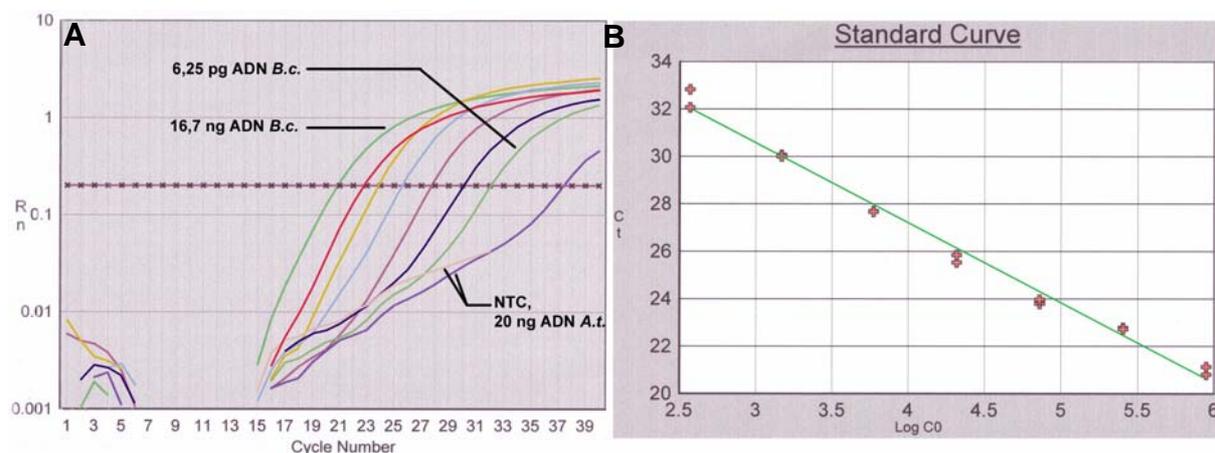


Figure 1 : A. Courbes d'amplification obtenues avec le couple d'amorces CG11/CG12 sur des dilutions sériées d'ADN génomique de *Botrytis cinerea*. Un témoin sans ADN (NTC) et un témoin contenant 20 ng d'ADN d'*Arabidopsis* sont également présentés. B. Courbe étalon déduite des courbes d'amplification présentées en A. L'unité en abscisse est proportionnelle à la quantité d'ADN génomique déposée.

Pour chaque couple d'amorces, la gamme dynamique de la quantification a été évaluée par le tracé d'une courbe étalon sur des dilutions sériées d'ADN génomique de l'espèce correspondante (Fig. 1). Pour *Alternaria* et *Botrytis*, la quantification est linéaire dans la plage 6,25 pg à 16,7 ng d'ADN. Pour *Arabidopsis*, dont l'ADN est toujours très abondant dans les

échantillons, la linéarité a été vérifiée sur une plage plus restreinte (de 1,4 à 100 ng). Pour chaque couple d'amorces, l'absence d'amplification aspécifique sur l'ADN de l'autre partenaire de l'interaction a été vérifiée. La réalisation de triplicats sur des échantillons biologiquement équivalents permet de montrer que la variabilité des résultats est faible.

2.3. Suivi du développement des champignons sur des feuilles d'*Arabidopsis* infectées

L'abondance relative des gènes *ASK* et *cutA* a été suivie chez *Arabidopsis* après inoculation par *Alternaria* et *Botrytis*. Concernant *Alternaria*, aucune variation significative du rapport *cutA/iASK* n'a pu être détectée sur une cinétique s'étendant sur une semaine, ce qui correspond au fait qu'*Arabidopsis* est résistante à ce champignon. En revanche, la germination et le développement de *Botrytis* sont très rapides (Figure 2), et sont associées à la formation de lésions qui s'étendent à la surface de feuille. A la fin de la cinétique (48 à 72 h a.i.), l'ADN de *Botrytis* devient même prédominant dans l'échantillon.

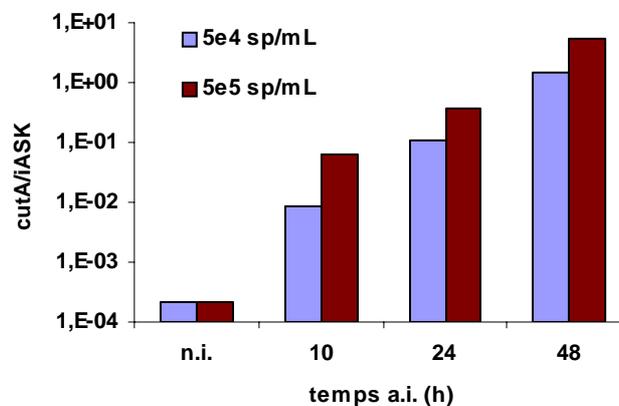


Figure 2 : Evolution du rapport *cutA/iASK* dans des feuilles d'*Arabidopsis* infectées par *Botrytis cinerea*. Deux inoculums ont été utilisés (5.10^4 et 5.10^5 spores/mL). n.i. : échantillon non inoculé. a.i.: après inoculation

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce test a été mis au point afin de d'évaluer la résistance de mutants d'*Arabidopsis* aux deux champignons *B. cinerea* et *A. brassicicola*. Sa robustesse en fait un bon outil pour discriminer des niveaux de résistance relativement proches, alors que les test basés sur la mesure de lésions sont surtout probants pour mettre en évidence des phénotypes drastiques. Sa rapidité et sa simplicité permettent de l'utiliser à moyenne échelle pour cribler en parallèle plusieurs lignées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- K. Edwards, C. Johnstone, et C. Thompson. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl. Ac. Res. (1991) **19**:1349.
- C. Gachon et P. Saindrenan. Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. Plant Physiol. Biochem. (2004) 42:367.

