

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 GENOTYPES

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).

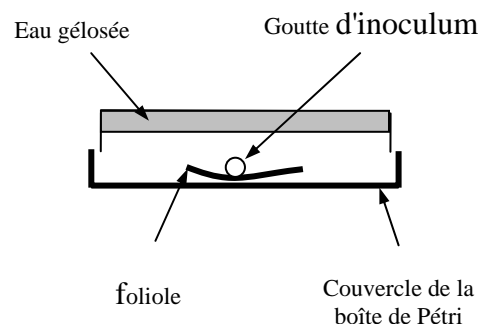
1.4. Préparation de l'inoculum (suspensions de sporanges)

L'inoculum est préparé à partir de colonies jeunes et bien sporulées, cultivées en boîte de Pétri sur milieu petit pois² (~ 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).



² **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).

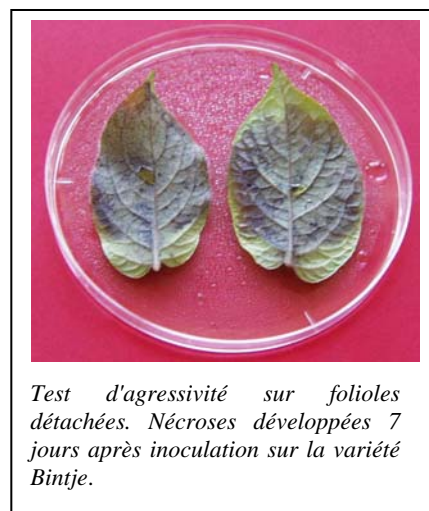
Les flacons sont agités doucement pendant 20 à 30 secondes. La concentration de spores doit être déterminée assez rapidement après le prélèvement (surtout pour un comptage au compteur, car les spores germent). Sinon, les suspensions, sans les folioles, peuvent être conservées au congélateur, de préférence 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

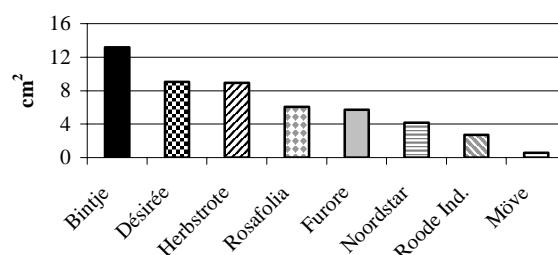
Les graphiques ci-contre montrent les résultats obtenus pour deux des composantes de résistance. D'une part, la taille des symptômes causés par une souche de *P. infestans* varie en fonction des variétés testées. La variété sensible Bintje présente les lésions les plus importantes, tandis que la variété 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).

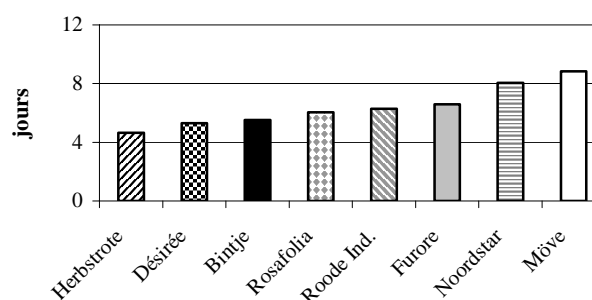
Le niveau de résistance partielle des variétés doit être testé avec différentes souches de *P. infestans*. Pour apprécier l'agressivité d'un isolat ou le comportement d'une variété, il est souvent important d'analyser plusieurs composantes de la résistance, car elles ne sont pas nécessairement liées 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*