

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

*Sylvie Valette<sup>1</sup> et Roger Rivoal<sup>1</sup>*

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

## **1. MATERIEL ET METHODES**

### **1.1. Préparation du matériel végétal**

#### 1.1.a. préparation des semences

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

#### 1.1.b. préparation du substrat de culture

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

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

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

### **1.2. Préparation de l'inoculum**

#### 1.2.a. obtention des larves

On utilise des larves infestantes au deuxième stade de leur développement (L2), écloses de kystes issus d'élevage ou de tests préalables et conservés à sec à 3°C en tubes (cf. figure 3).

Pour lever leur diapause, deux types de traitement thermique sont nécessaires. Pour les kystes de l'écotype septentrional, on les place dans le tamis d'un éclosoir immergé dans de l'eau du robinet (Figure 1) à 7°C. L'éclosion commence environ 4 mois après le début de ce traitement. Pour l'écotype méridional, les kystes restent deux mois à sec à 20°C puis sont traités comme précédemment. Toujours maintenir le niveau d'eau dans les éclosoirs.

---

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

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



**Figure 1 : schéma d'un éclosoir**

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

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

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

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

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

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

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

### 1.3. Inoculation et conditions de culture

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

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

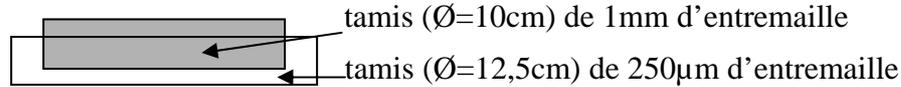
Ensuite les maxi serres sont placées dans une chambre climatisée à 16°C pour l'écotype septentrional, à 18°C pour l'écotype méridional, avec 16h de photopériode. Elles sont maintenues fermées pendant 15 jours pour éviter un dessèchement du substrat. L'arrosage s'effectue une à deux fois par semaine en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

### 1.4. Lecture du test

#### 1.4.a. extraction des femelles et des kystes

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

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

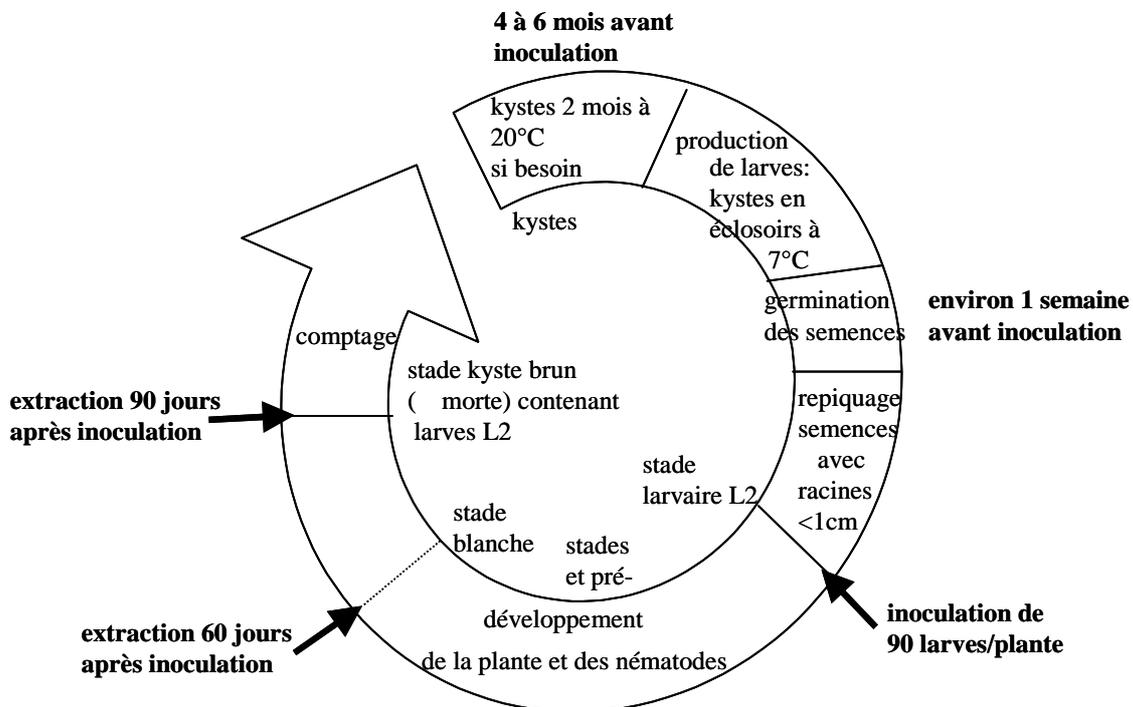


**Figure 2 :** *dispositif utilisé pour la récupération des nématodes*

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

#### 1.4.b. comptage

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

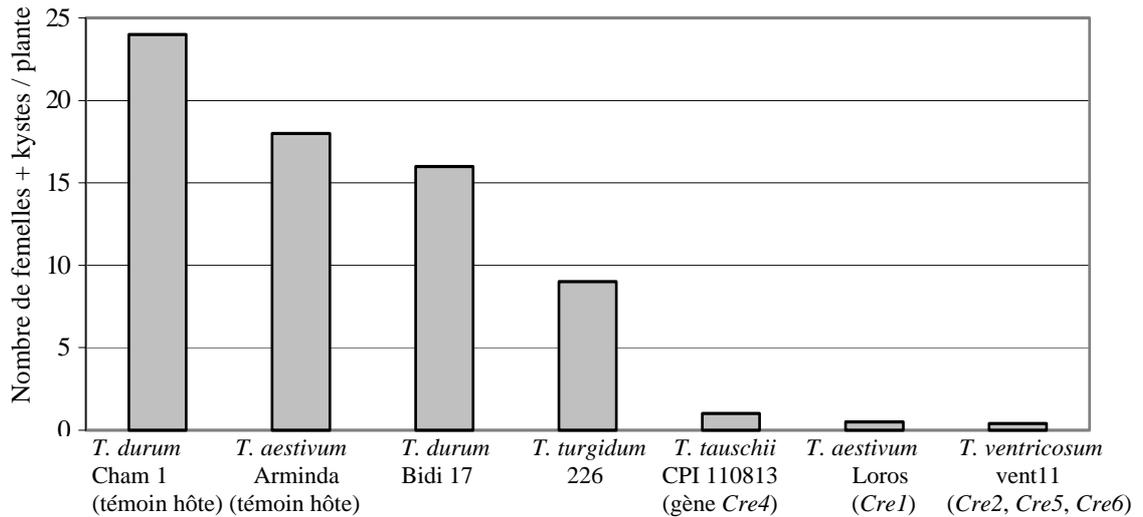


**Figure 3 :** *schéma organisationnel et cycle de développement simplifié du nématode*

### 1.5. Interprétation : niveaux de résistance

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

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION



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

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

## 3. CONCLUSION

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

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

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

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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