

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

Catherine Porte¹

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

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

1. MATERIEL ET METHODE

1.1. Substrat de culture

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

1.2. Matériel végétal

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

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

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

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

1.3. Préparation de l'inoculum

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

1.4. Inoculation

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

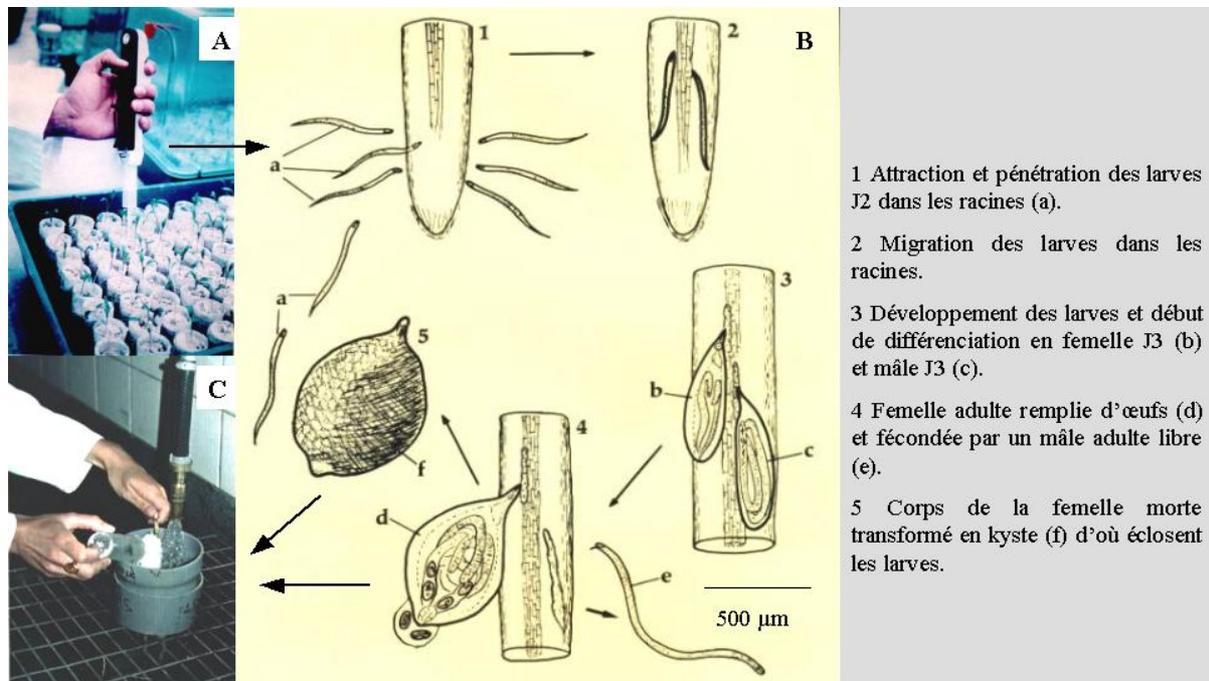


Figure 1 : Inoculation de plantules de betterave avec des larves d'*H. schachtii* (A), cycle biologique des nématodes à kyste (B), extraction des femelles néoformées (C).

1.5. Extraction et comptage

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

2. INTERPRETATION DES RESULTATS

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

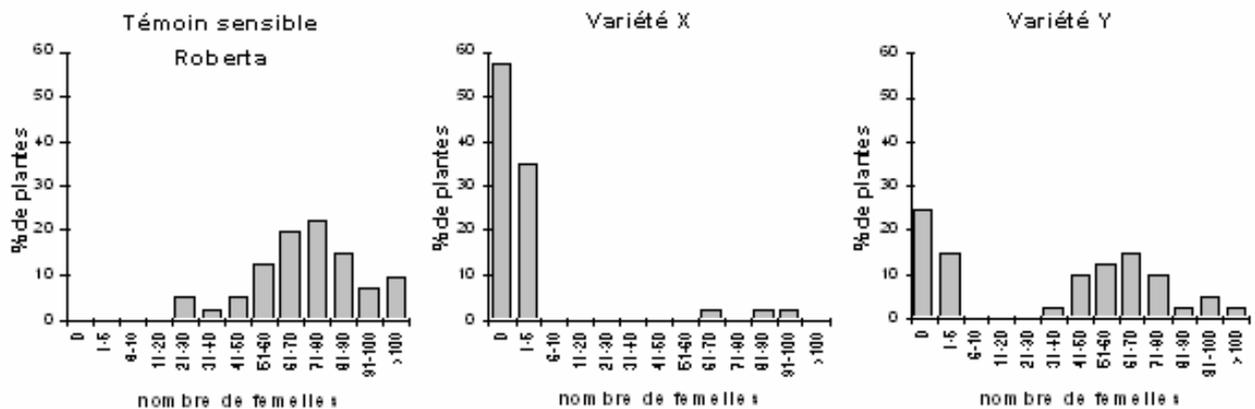


Figure 2 : Distribution du pourcentage de plantes en fonction du nombre de nématodes femelles formés.

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

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

3. CONCLUSION

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

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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