

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

Méthode d'identification génétique chez les parents utilisés en croisement.

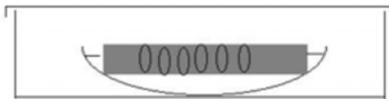
Didier Fouville et Claudia Rouaux¹

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

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel

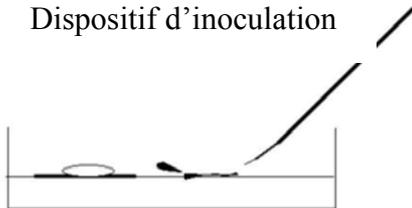
Dispositif de mise en éclosion



Pour l'éclosion des larves (J2)

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

Dispositif d'inoculation



Pour l'inoculation des larves

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

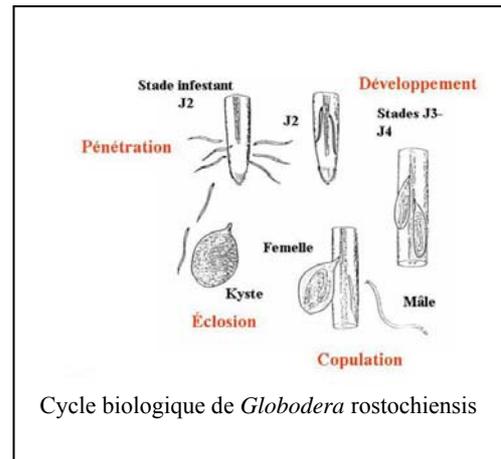
1.1.c. Pour la mise en place du test en général

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

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

1.2. Test en boîte de Pétri

Pour ce test, on utilise le pathotype Ro1 de *Globodera rostochiensis* population Ecosse. Les larves sont obtenues par immersion de kystes dans des exsudats de racines de pomme de terre. Cent graines environ issues d'un croisement à tester sont désinfectées dans une solution alcoolique de chlorure de mercure à 0,2 % puis rincées trois fois à l'eau du robinet stérile. Elles sont mises à germer individuellement en boîte de Pétri sans ergot sur de l'eau gélosée (Agar 15 g/L) à température ambiante. Ce support de culture est coulé à 55 °C dans les boîtes au moins 5 jours avant la mise en place de l'essai pour laisser sécher les condensations d'eau dont la présence serait préjudiciable à la pénétration des larves dans les racines. Après germination des graines, on dépose trois larves sur la racine quand celle-ci atteint un cm de longueur. Cette racine doit absolument adhérer au milieu gélosé. L'ensemble est conservé 24 heures à température ambiante pour optimiser le taux de pénétration des nématodes. Les boîtes sont ensuite transférées dans une enceinte climatisée (18°C et 16 heures de lumière) favorisant une condensation productrice d'eau dans les boîtes qui optimisent ainsi la croissance des racines.



1.3. Système de notation et interprétation des résultats

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



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

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

f_o = fréquences observées
 f_e = fréquences théoriques

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

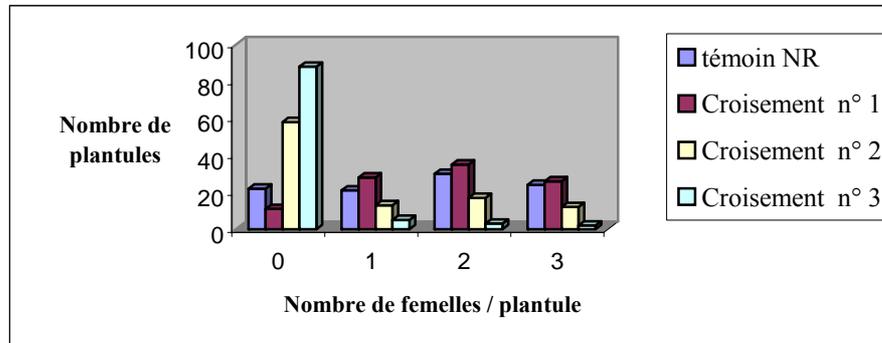
L'histogramme ci-dessous représente le dénombrement des femelles de *Globodera rostochiensis* observées sur plantules après l'inoculation de 3 larves de Ro1 par racine pour 3 croisements et un témoin NR.

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

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

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

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



Avec les résultats du comptage des femelles de RO1 représenté dans l'histogramme ci-dessus, le test statistique 2¹ d'Arbonnier nous démontre qu'il n'y a pas de différence significative entre le croisement n°1 et le **Témoin NR** pour un degré de liberté (d.d.l) de 3 au seuil de 95% en consultant le tableau des fréquences cumulées du χ^2 . Il n'y a donc aucune présence de gène de résistance dans ce génotype testé.

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

2.1. Test du χ^2 sur les deux croisements présentant des différences significatives après le test statistique 2¹ d'Arbonnier

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

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

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

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

3. CONCLUSION

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arbonnier P, (1966). L'analyse de l'information. Aperçu théorique et application à la loi multinomiale. *Annales de sciences forestières* 23 : 950-1009.
 Mugniéry D, (1985) Test de résistance de descendance de pomme de terre à *Globodera rostochiensis* Woll. *Potato Research* 29 : 131-140.

ANNEXE

Gamètes produits chez des génotypes tétraploïdes.

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

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

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

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

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

*	1 Rr	1 rr
1 rr	1 Rrrr	1 rrrr

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

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

La descendance d'un croisement entre un génotype non résistant et un génotype **Triplex** donne 10

*	1 RR	1 Rr
1 rr	1 RRrr	1 Rrrr