

Tests en laboratoire d'évaluation de la résistance partielle des clones de Peuplier vis-à-vis des rouilles à *Melampsora larici-populina*

¹ Jean Gauvin, Daniel Lacan, Patrick Poursat, Michel Verger

Résumé : Les rouilles à *Melampsora larici-populina* sont des ennemis majeurs du Peuplier. Mieux comprendre les mécanismes génétiques de la relation hôte – pathogène et mettre sur le marché des nouveaux clones minimisant l'impact du champignon est un enjeu essentiel pour la populiculture. La sélection de variétés à résistance complète s'est avérée vaine du fait du fort potentiel d'adaptation de l'agent pathogène. Dans l'objectif d'explorer des formes de résistance potentiellement plus durables, des tests en laboratoire d'évaluation de la résistance partielle ont été mis au point par les améliorateurs forestiers de l'Inra d'Orléans. Des protocoles d'inoculation sur disques foliaires excisés permettent d'accéder à trois composantes épidémiologiques clés : la latence infectieuse, le nombre d'urédosores et leur taille.

Ce travail, couplé à des expérimentations en pépinière, des travaux de cartographie génétique et de détection de QTL, permettra d'identifier l'emplacement puis la nature des gènes qui contribuent aux résistances partielles présentes chez le Peuplier.

Mots clés : Peuplier, clones, rouille, résistance partielle, *Melampsora larici-populina*

Introduction

Les Peupliers, de la famille des Salicacées, appartiennent au genre *Populus* qui se divise en six sections botaniques. Bien que ne représentant en France que 230 000 ha (1,3% de la surface boisée), sa forte productivité en fait une espèce d'intérêt majeur pour la filière bois. La bonne aptitude au bouturage généralement observée chez les Peupliers a amené l'homme très tôt à utiliser des « cultivars » (clones). Hélas, cette culture est attaquée par de nombreux ennemis et la faible variabilité génétique du matériel planté (plantations monoclonales, peu de cultivars commercialisés parfois même apparentés) accentue l'importance du phénomène.

Parmi ces ennemis, les rouilles foliaires, maladies qui induisent des défeuillaisons précoces, provoquent de grosses pertes de rendement (jusqu'à 30% sur la croissance) et souvent des mortalités. La rouille à *Melampsora larici-populina* (Mlp) est la plus fréquente et la plus dommageable en France. Elle doit son nom à un cycle hétéroïque combinant une phase de recombinaison (reproduction sexuée) en avril-mai sur Mélèze et une longue période de multiplication végétative sur Peuplier, entre mai et octobre, par production d'urédosores donnant des urédosores à la face inférieure des feuilles.

Durant plusieurs décennies, les améliorateurs ont sélectionné des clones de Peuplier dont la résistance totale fut à chaque fois rapidement contournée par le champignon. Ils s'orientent maintenant vers la sélection de clones sensibles à Mlp mais ne subissant pas de pertes de croissance économiquement dommageables et n'exerçant pas non plus une forte pression de sélection sur l'agent pathogène : autrement dit des clones tolérants porteurs de résistances partielles. Cet article décrit le protocole mis au point pour les étudier.

¹ INRA UAGPF, amélioration, génétique et physiologie forestières, Avenue de la Pomme de Pin, Ardon
BP 20619 - 45166 Olivet cedex ☎02 38 41 48 41 jean.gauvin@orleans.inra.fr

1. Description du matériel et de la méthode

1.1 Gestion des isolats de Mlp

Ces isolats sont constitués d'urédo-spores et se présentent sous la forme d'une poudre orange. Ils sont conditionnés dans des tubes Eppendorf rangés dans des boîtes à couvercle dont le fond, rempli de chlorure de magnésium, permet de conserver un taux d'humidité de 30%. Afin d'éviter les pollutions, tous les tubes, à l'intérieur d'une boîte, contiennent le même isolat. Les boîtes sont conservées au réfrigérateur à +5° C.

Pour multiplier un isolat, on en prélève 1 à 2 mg que l'on met en suspension dans 10 à 15 ml d'eau osmosée gélosée (0,5 g/L d'agar). Afin d'assurer une bonne homogénéité, on agite le mélange durant 2 minutes. Au préalable, des feuilles du clone 'Robusta', qui a la particularité d'être sensible à toutes les souches de Mlp connues, ont été récoltées. Ces feuilles, placées sur pellicule d'eau (face inférieure en haut) dans une boîte de Pétri, sont alors inoculées par pulvérisation de la suspension d'urédo-spores. La faculté germinative de l'isolat est contrôlée en le pulvérisant sur 2 boîtes de Pétri contenant une pellicule de gélose solide (à 20 g/L d'agar). On compte 24 et 48 h après pulvérisation, au microscope, le pourcentage d'urédo-spores qui ont germé.

Les feuilles de 'Robusta' sont mises en chambre de culture (température de 17 °C et photopériode de 16 heures de jour). Après 10 à 12 jours, les urédo-spores sont récoltées en tapotant les feuilles sur du papier aluminium. L'isolat est pesé, stocké et on en teste la faculté germinative (même méthode que précédemment).

La gestion du stock se fait sur ordinateur grâce à une base de données sous Access.

1.2 Elevage du matériel végétal

Des boutures de 20 à 25 cm, issues de parcs à pieds mères, sont récoltées en hiver, stockées en chambre froide à 4°C puis mises en pot et élevées en serre climatisée. Il est important de surveiller ces plants de manière à éviter tout stress (thermique, hydrique, phytosanitaire) qui induise des variations de comportement vis-à-vis de l'attaque de rouille.

Durant cette étape, il est primordial d'éviter toute pénétration de rouille dans la serre : sas, entrée contrôlée, combinaison pour les agents intervenant dans la serre, traitements fongicides de contact en cas d'attaque...

1.3 Récolte du matériel végétal et mise en place du dispositif

Le matin de l'installation d'un test, on prélève une à deux feuilles, entre la 5ème et la 10ème feuille en partant du sommet du plant de Peuplier ; et on y découpe à l'emporte pièce des disques de 3 cm de diamètre. Parallèlement, on dispose des boîtes à puits (6 puits par boîte) sur une table. Le dispositif comporte 5 blocs complets. Pour des raisons de place en chambre de culture, les blocs ne peuvent dépasser 90 boîtes. On remplit à moitié les puits d'eau distillée. Puis, clone par clone, les disques sont distribués dans les puits aux emplacements affectés aléatoirement par une procédure informatique. Ils sont disposés face inférieure vers le haut. Dans chaque bloc, outre les clones en testage, on trouve les parents de la population en test (2 à 3 disques), 8 clones porteurs de résistances complètes qui permettent de discriminer (= clones discriminants) les différents pathotypes de rouille (3 disques chacun).

1.4 Inoculation

Le lendemain de l'installation, on remplace les disques qui ont coulé ou qui se sont recroquevillés. La pulvérisation de l'inoculum s'effectue à l'aide d'un pulvérisateur à main à réserve d'air comprimé en 2 fois 5 passages. Pour une surface d'1 m² à inoculer, on pulvérise sur les boîtes à puits 25 ml de solution (isolat + eau gélosée). La quantité d'isolat nécessaire (de 1 à 3.5 mg/m²) est décidée en fonction de la faculté germinative de l'isolat et de son pourcentage d'humidité. La solution est maintenue au froid pendant l'homogénéisation par agitateur magnétique pour ralentir l'évolution des urédospores dont la durée de vie dans l'eau est limité (+/- 30 minutes) à température ambiante.

Entre les boîtes à puits sont intercalées des boîtes de Pétri contenant de la gélose solide (de 4 à 8 suivant la taille du bloc) qui permettent de vérifier, par comptage au microscope, sur une surface équivalente à un disque de 3 cm, l'homogénéité et l'intensité de l'inoculation.

Les boîtes contenant les disques foliaires sont ensuite refermées et mises dans la chambre de culture (cf. conditions décrites § 1.1).

1.5 Les observations

Du 6^{ème} au 13^{ème} jour, la latence (temps entre l'inoculation et l'apparition du 1^{er} sore sporulant) est observée deux fois par jour. Un disque où le 1^{er} sore sporulant apparaît le matin du 8^{ème} jour sera noté 8 et 8,5 s'il apparaît le soir. La température de la chambre de culture (17°C) permet d'accentuer les différences entre clone pour la latence par rapport à ce qui se passe en milieu naturel.

Au matin du 13^{ème} jour, on compte sur chaque disque le nombre de sores. Ce comptage est assorti de commentaires informatifs sur l'état sanitaire du disque. Les disques qui à première vue ne présentent pas d'attaque de rouille sont examinés plus attentivement pour ne pas conclure abusivement à la présence d'une résistance totale.

Au 14^{ème} jour intervient la notation de taille des sores. On constitue pour chaque bloc une échelle de 1 (petit) à 5 (taille maximum) avec un disque représentatif pour chaque taille. Le notateur attribue à chaque disque foliaire porteur d'urédosores une note correspondant à cette échelle. Quand tous les disques sont notés, on photographie à l'aide d'un appareil numérique posé sur banc, les disques qui ont servi à construire les échelles, plus deux autres disques par bloc et par classe de taille. On procède de même pour les disques des parents et des clones discriminants. Ces photos sont analysées avec un logiciel d'analyse d'image ImageJ®. Puis on calcule une surface moyenne de sore (en mm²) pour toutes les échelles de notation. On peut ainsi passer d'une variable qualitative (note) à une variable quantitative exprimée sur une échelle linéaire.

2. Résultats

Un résultat important obtenu dans notre laboratoire est une connaissance fine des relations entre les différents paramètres mesurés. Ainsi on constate (**figure 1(1) et 1(2)**) que, pour des génotypes présentant des valeurs de latence faible (zone A), à une valeur donnée de latence correspondent des valeurs de nombre et de taille d'urédosores très diverses. En d'autres termes, une grande variabilité génétique peut s'exprimer pour ces caractères.

En revanche, on voit que des valeurs de latence élevées (zone B) empêchent l'expression des différences entre génotypes pour les deux autres caractères : nombre et taille des urédosores sont faibles pour tous les génotypes. Pour la taille des urédosores, lorsqu'ils apparaissent tard, on peut penser qu'ils n'ont pas le temps d'exprimer tout leur potentiel de développement. Pour le nombre d'urédosores, on peut faire l'hypothèse qu'il existe des gènes qui conduisent à

la fois à une latence élevée et à un faible nombre d'urédosores. Les génotypes porteurs de ces gènes ont un niveau de résistance partielle proche de la résistance totale.

Par ailleurs, aux pressions d'inoculum utilisées, l'indépendance entre le nombre et la taille des urédosores est complète (figure 1(3)).

Tous ces résultats justifient que l'on continue à mesurer ces trois caractères et laisse espérer que l'on puisse un jour les combiner favorablement dans un même génotype.

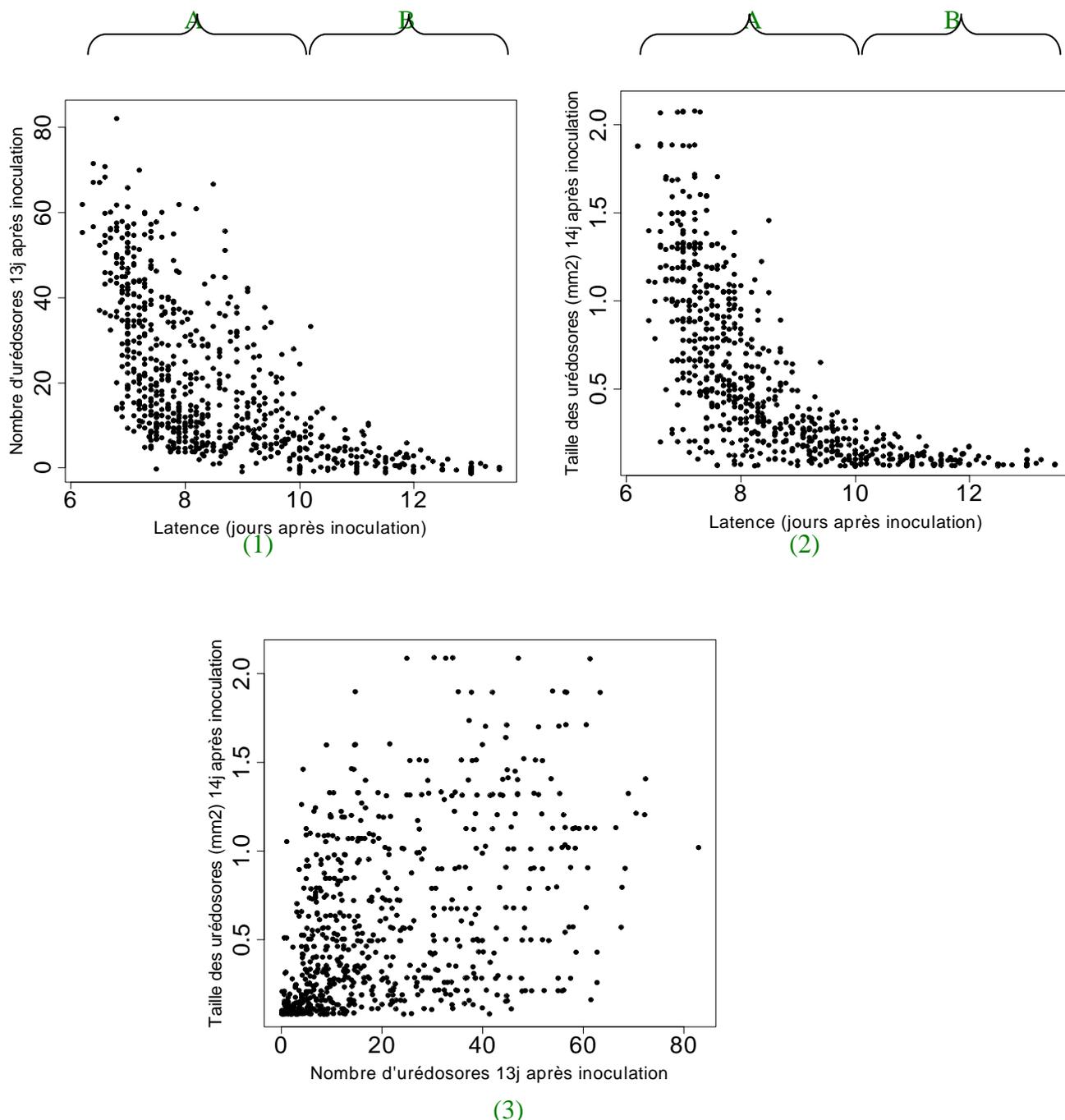


Figure 1 : Exemple caractéristique des relations fréquemment observées entre les différentes composantes de la résistance partielle mesurées en laboratoire.

Chaque point représente un génotype de Peuplier.

Zone A = génotypes à latence courte (<10j), zone B = génotypes à latence longue (10j<X<14j).

Conclusion et perspectives

Nous envisageons d'améliorer notre protocole d'étude de la résistance partielle à Mlp. On se focalisera plus particulièrement sur les points suivants :

- L'élevage en serre : il sera nécessaire d'améliorer le contrôle climatique et d'augmenter l'étanchéité des serres pour éviter les contaminations par la rouille naturelle.
- L'inoculation : on cherchera à mieux calibrer la concentration des suspensions d'inoculation. On pourrait réaliser des mesures de densité optique, ce qui serait compatibles avec la durée de survie des spores dans l'eau à condition de disposer d'une courbe étalon. La dispersion spatiale de l'inoculum devra aussi être améliorée. Les premiers essais de tour à inoculation n'ont malheureusement pas donné satisfaction.
- Les observations : il serait nécessaire d'automatiser la mesure de la taille des urédosores grâce à un système automatique d'analyse d'image.

L'amélioration technique de ces étapes nous permettra de constituer une plateforme expérimentale performante pour le phénotypage à haut débit du Peuplier vis-à-vis de la rouille foliaire et d'aboutir plus rapidement à la sélection de nouveaux cultivars performants.

Bibliographie

- Dowkiw A (2003) Analyse génétique de la résistance et de la tolérance de peupliers hybrides *Populus deltoides* X *Populus trichocarpa* à la rouille foliaire à *Melemopsis larici-populina*. Thèse de doctorat de l'université d'Orléans, 179p
- Lefèvre F, Faivre-Rampant P, Goué M.C, Laurens F, Pilate G, Pinon J, Valadon A, Villar M (1995) Composantes de la résistance aux rouilles chez les peupliers : utilisation en sélection. Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France 81:111-121
- Paillassa E (2006) Quelles pertes de croissance pour 7 cultivars de peuplier face aux attaques de la rouille E4 du mélèze. Forêt-Entreprise 168:60-63
- Pinon J, Frey P, Villar M (2001) La populiculture à la recherche de la résistance durable aux maladies, La Forêt Privée 258:25-32