

TEST BIOLOGIQUE POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE
RESISTANT OU SENSIBLE DE LA FEVEROLE AUX NEMATODES
DES TIGES ET DES BULBES, *Ditylenchus dipsaci*.

*Magali Esquibet*¹

Le nématode des tiges et des bulbes, *Ditylenchus dipsaci*, connu sur de nombreuses cultures, parasite exclusivement les organes aériens. Sur *Vicia faba*, l'importance des dégâts varie selon les conditions climatiques mais aussi selon le mode de contamination des cultures, par le sol ou par la graine. La création de variétés de protéagineux ou de légumineuses fourragères résistantes à *D. dipsaci* constitue un objectif particulièrement intéressant pour intervenir contre ce bioagresseur. Toutefois, aucune variété de fève ou de féverole résistante n'est encore commercialisée bien que des lignées ou accessions ne multipliant pas le nématode aient été identifiés.

Le test biologique d'évaluation de la résistance de *Vicia faba* au nématode des tiges, décrit dans cet article, a été mis au point et publié par Caubel G. et Leclercq D. (1989). Cette méthode d'inoculation artificielle en conditions contrôlées est simple, reproductible et permet une sélection rapide de génotypes résistants.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1 Préparation du matériel végétal

Les graines de fèves ou féveroles sont mises à germer à 25 °C sur de la vermiculite (Vermex M®, Efisol, France) humide. Trente répétitions sont nécessaires pour correctement tester une accession. Après 4 jours, les plantules sont repiquées dans un mélange terreux à raison d'une plante par pot (7x7x7cm) et de 30 pots par terrine de culture (maxiserre BHR, Bouillard Frères SA, Saint Germain du plain, France). Les plantes d'une même accession peuvent être placées dans une seule terrine ou distribuées au hasard. Par contre, pour éviter tout mélange entre les populations du bioagresseur, une seule population de nématode est utilisée par terrine.

Deux variétés, la féverole "Diana" ou la fève "Aguadulce" sont utilisées comme témoins de sensibilité. La lignée de féverole "INRA 29H" est utilisée comme témoin de résistance.

1.2 Préparation du matériel animal

Les nématodes étant conservés dans des tissus secs de plantes, l'inoculum est essentiellement constitué de larves préadultes, stade caractérisé par son aptitude à la quiescence.

Les tronçons de tiges infestées (1 cm) sont déposés sur un tamis de 20µm lui-même placé dans un récipient (grande boîte de Petri ou assiette) contenant de l'eau du robinet. Les nématodes en se réhydratant deviennent actifs et traversent les mailles du tamis. On récupère ainsi les larves, sans débris végétaux, au fond du récipient. L'eau doit être renouvelée au moins 3 fois par jour.

Les larves sont ensuite concentrées, par décantation, de façon à obtenir une concentration d'environ 200 larves pour 20µl d'eau. Le nombre de nématodes est évalué en comptant, à l'aide d'une loupe, les larves présentes dans un échantillon de 20 à 100 µl. L'inoculum est

¹ Centre INRA de Rennes – UMR BiO3P –BP 35327 35653 LE RHEU Cedex - esquibet@rennes.inra.fr

préparé en mélangeant la suspension obtenue à une solution de méthylcellulose, 2%. On obtient ainsi une solution de méthylcellulose à 1% contenant 100 nématodes pour 20µl. Au moins trois comptages sont nécessaires pour vérifier au préalable la concentration de l'inoculum qui sera utilisé.

1.3 Inoculation des plantules

Une semaine après repiquage, les plantes sont placées dans des enceintes climatisées (15°C et une photopériode de 16 heures). L'inoculation artificielle des plantules est effectuée en déposant à l'aisselle du premier stipule une gouttelette de 20 µl d'inoculum. La solution de méthylcellulose permet une bonne adhésion de la gouttelette sur la plante et maintient les nématodes en suspension ce qui prolonge le temps de pénétration dans la plante. Une humidité saturante est maintenue pendant 3 jours en fermant les maxiserres.

1.4 Multiplication du nématode et développement des symptômes

La multiplication du nématode est estimée après un délai d'environ 2 mois qui correspond à la phase d'accroissement des populations à 15°C et à l'apparition des symptômes d'attaque sur le bourgeon axillaire inoculé. Ces symptômes diffèrent selon la sensibilité de la plante testée et la race de nématode utilisée (Figure 1) :

- Pour des plantes sensibles mises en présence d'une race géante de *D. dipsaci*, on observe un gonflement du bourgeon et de la tige. Les tissus parenchymateux sont boursoufflés, ils se décolorent puis brunissent. La tige gonfle et se déforme, les entre-nœuds restent courts. Les pétioles et folioles présentent un aspect gaufré.
- Pour des plantes sensibles mises en présence d'une race normale de *D. dipsaci*, on observe une nécrose de la tige. La tige se colore en un brun-rougeâtre puis noircit avec le temps.
- Pour des plantes résistantes, on observe des nécroses localisées à proximité du point d'inoculation. En présence d'une race géante, la longueur de la nécrose est variable mais reste souvent limitée à un seul mérithalle. Aucun gonflement des tissus n'est observé.



Figure 1: Gonflement sur plante sensible, Diana (S) et nécrose localisée sur plante résistante, INRA 29H (R). Les plantes sont inoculées par une race géante de *D. dipsaci*.

1.5 Système de notation

En fin d'expérimentation et avant l'extraction des nématodes, chaque plante est notée selon les critères suivant : gonflée, nécrosée sans gonflement ou saine. On obtient ainsi pour chaque accession testée, un pourcentage de plantes gonflées, nécrosées et saines qui donne par référence aux témoins sensibles et résistant utilisés une bonne indication sur la résistance au nématode présente dans les accessions testées.

1.6 Evaluation du taux de multiplication du nématode

La résistance se définit comme l'opposition de la plante à la multiplication du nématode.

Le nombre de nématodes est compté dans chaque plante après notation des symptômes. Toutes les zones où un symptôme est observé, sont coupées et dilacérées rapidement (20s) dans un mixeur. Si la plante est sensible, le broyat peut être dilué et les nématodes sont dénombrés dans une partie aliquote (5ml). En présence d'une plante résistante, les nématodes sont dénombrés dans la totalité de la suspension. Le broyat est préalablement filtré sur un tamis à large maille (600 μ m environ), le filtrat est ensuite concentré sur un tamis de 5 μ m (20ml environ).

Tous les stades larvaires et les adultes sont comptés. Les œufs ne sont pas dénombrés pour des raisons pratiques. Pour limiter l'éclosion après l'extraction des nématodes, le broyat est conservé au frais (6°C). Le taux de multiplication du nématode par plante (TX) est ensuite évalué en divisant le nombre de nématodes présents dans la plante au moment de l'extraction par le nombre d'individus déposés sur la plante. Les taux de multiplication sont ensuite soumis à une analyse de variance en utilisant le logiciel SAS (SAS Institute, 1988). Les taux moyens obtenus par accession sont classés selon le test de Newman-Keuls (au seuil de 5%).

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les larves pénètrent dans les tissus quelques heures après l'inoculation et deviennent adultes après 3 jours. La pénétration des larves et leur installation dans la plante ne diffèrent pas entre une plante sensible et une plante résistante. Par contre, les effectifs rencontrés après deux mois de culture sont très variables et atteignent parfois plusieurs centaines de milliers d'individus sur une plante sensible inoculée avec une race géante (Figure 2).

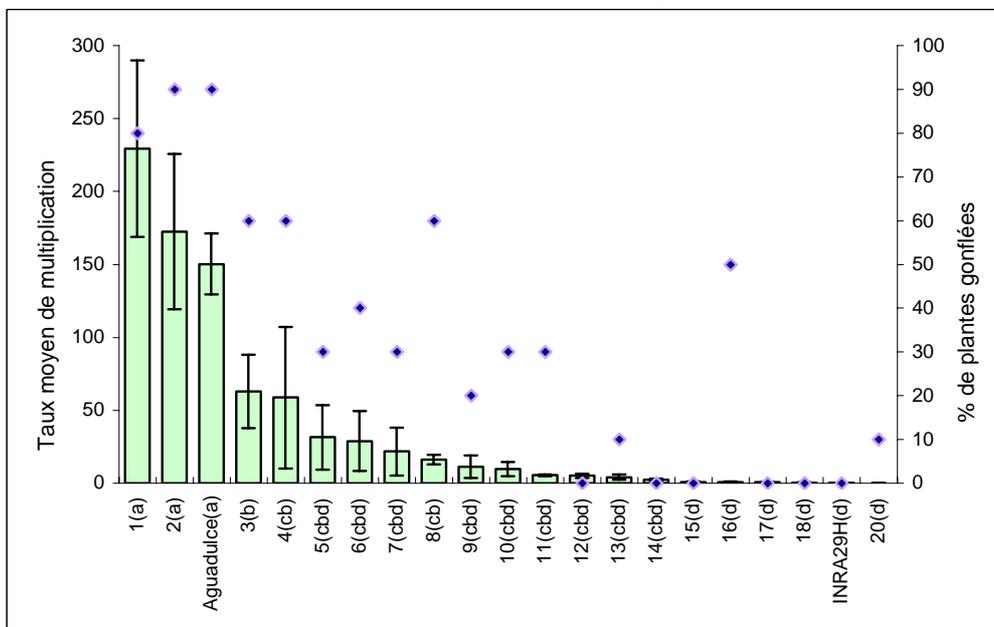


Figure 2 : Pourcentage de plantes gonflées et taux moyen de multiplication du nématode par accession. Les plantes ont été inoculées par une race géante. Les symptômes extériorisés et les effectifs du nématode sont évalués 2 mois après l'inoculation des plantules. Le classement des accessions pour le taux moyen de multiplication est indiqué entre parenthèses (test de Newman-Keuls au seuil de 5%).

Dans les conditions expérimentales décrites, il existe une relation entre le type de symptôme et l'importance des effectifs du nématode, excepté pour l'accession 16 qui présente un fort pourcentage de plantes gonflées donc sensibles bien que le nématode ne se soit pas multiplié. Dans l'essai présenté ci-dessus, la notation des symptômes pouvait donc suffire pour une présélection des accessions résistantes. Toutefois, pour une étude plus poussée, l'évaluation du taux de multiplication du nématode par plante a été nécessaire.

Ce taux est très variable entre les 30 plantes qui ont été testées pour une même accession ce qui perturbe l'analyse de variance et donne des différences non significatives entre les taux moyens de multiplication. Néanmoins, malgré cet inconvénient les accessions peuvent être classées en 3 grandes catégories :

- Sensibles : les accessions 1 et 2 qui sont aussi sensibles que le témoin Aguadulce
- Intermédiaires : les accessions 3 à 14 qui présentent des taux de multiplication >1 mais moindre que le témoin sensible.
- Résistantes : les accessions 14, 15, 16, 17, 18 et 20 qui sont aussi résistantes que le témoin résistant INRA 29H.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La méthode d'inoculation artificielle de plantules conduit à une bonne pénétration du nématode dans les tissus de la fève ou féverole et peu de plantes non résistantes échappent à l'infection. Réalisés avec un nombre important de plantes chacune analysée individuellement, les essais montrent que la multiplication du nématode dépend surtout du facteur variétal. Mais les taux de multiplication variant au sein d'une variété, il est impératif de considérer les résultats plante à plante sur un nombre suffisant de répétitions.

Cette méthode en conditions contrôlées est simple, reproductible et permet un bon développement des symptômes d'attaque du nématode. Le tri des plantes résistantes par élimination des plantes présentant un gonflement est aisé et conduit à un taux d'erreur acceptable car même si quelques accessions résistantes peuvent être éliminées par ce critère, aucune accession sensible ne peut être gardée. Ces réactions sont tout à fait semblables à celles observées dans les conditions de plein champ sur la tige primaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Caubel G. et Leclercq D. (1989). Estimation de la résistance à la race géante de *Ditylenchus dipsaci* par les symptômes chez la féverole (*Vicia faba* L.). *Nematologica* 35 : 216-224.
- SAS Institute Inc (eds) (1988). SAS/STAT user's guide, release 6.03 edition, SAS Institute, North Carolina, Cary USA.

