

TESTS BIOLOGIQUES POUR LA DETERMINATION DU CARACTERE RESISTANT OU SENSIBLE DE PLANTES AUX NEMATODES A GALLES DES RACINES

Fazari A. , Pijarowski L. , Djian-Caporalino C. ¹

Les nématodes phytoparasites du genre Meloidogyne, endoparasites sédentaires appelés nématodes à galles des racines, parasitent plus de 2000 espèces végétales et constituent un grave problème phytosanitaire mondialement répandu. L'interdiction programmée de la plupart des nématicides fait de la résistance des plantes une des meilleures stratégies de phytoprotection, économique et non polluante, pour les années à venir. Les programmes de sélection classique nécessitent le développement de techniques de détection fiables et efficaces. Deux tests biologiques de résistance sont ainsi utilisés en routine. Ils sont utilisables pour toutes espèces de plantes.

1. MATERIEL ET METHODES

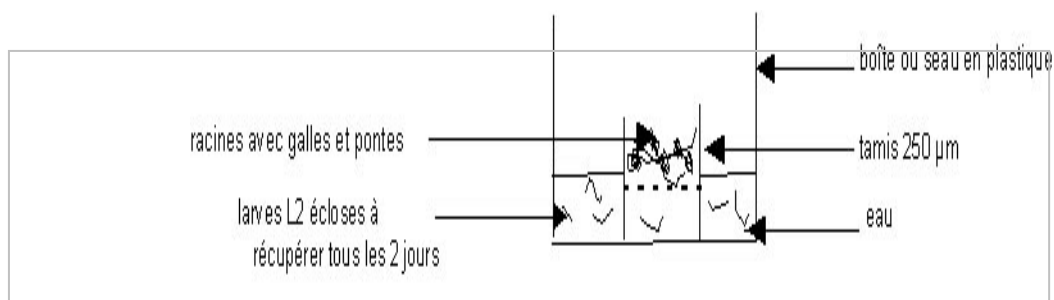
1.1. Inoculation des plantes pour déterminer leur caractère sensible ou résistant aux nématodes à galles des racines

1.1.a. Préparation du matériel végétal

- Facultatif : Mise à germination des graines de plantes à tester (trempage 24h dans de l'eau stérile à température ambiante)
- Semis des graines dans des pots contenant $\frac{3}{4}$ de sol sableux, $\frac{1}{4}$ de terreau en surface. Maintien en phytotron à 23-25°C. Fertilisation le dernier mois avant analyse, arrêt 1 semaine avant inoculation. Irrigation modérée tous les jours sauf 1 jour avant et 1 jour après infestation
- Inoculation au stade 4 à 6 feuilles vraies (environ 1 à 2 mois après semis selon la plante).

1.1.b. Préparation de l'inoculum

- A partir de plants infestés (présence de galles racinaires et pontes visibles au niveau des galles), rinçage délicat des racines par trempage successifs dans l'eau (pour éliminer la terre.
- Découpage des racines en morceaux sur un tamis de mailles 250 μm selon schéma ci-après et maintien des seaux sous brumisation constante pendant 10 jours à température ambiante pour faire éclore les larves (dans ce cas utiliser un seau ou une boîte percée d'un trou au dessus du tamis) ou changer l'eau des seaux tous les jours:



- Récupération des larves L2 (de 2nd stade, seul stade libre et infestant) écloses tous les jours ou tous les 2 jours en les concentrant sur un tamis de 10 μm pour en avoir environ 100 dans 50 μl pour les tests biologiques. Conserver la solution de nématodes à 4°C et l'utiliser pour les

¹ INRA, UMR IPMSV 1064, 400 Route des Chappes, 06903 Sophia Antipolis

tests biologiques dans les 3 jours qui suivent (sinon les larves épuisent leurs réserves et sont inutilisables).

1.1.c. Inoculation et incubation

- Grattage délicat du sol autour des plantules à inoculer. Infestation des plants à tester avec une suspension de 500 à 3000 larves L2 de nématodes dans 2 ml d'eau maximum. Prévoir au moins 10 répétitions pour chaque lignée de plante. Recouvrir avec un peu de sol pour éviter tout dessèchement. Ne pas arroser pendant 24 heures.

- Par la suite, arrosage délicat et régulier.

- Prévoir un témoin d'infestation : tomate sensible par exemple.

1.1.d. Système de notation : Après 6 semaines à 23-25°C, détermination de l'indice de galles selon le protocole 1.2.: indique le taux de développement des galles (donc du site nourricier), ou coloration des pontes à l'éosine selon le protocole 1.3. et comptage : indique le taux de pénétration et le taux de fécondité des femelles (test de résistance le plus fiable).

1.2. Détermination de l'indice de galles provoquées par *Meloidogyne* spp.

1.2a. Préparation du matériel végétal

- Après 6 semaines à 23-25°C, dépotage des plants à analyser

- Lavage soigneux des racines à l'eau courante.

- Observation du chevelu racinaire et détermination de l'indice de galles, de 0 à 10

1.2.b. Système de notation (selon Netscher et Sikora, 1990)

0	système racinaire complet et sain ; pas d'infestation	1	très peu de galles de petite taille
2	petites galles plus facilement détectables	3	nombreuses petites galles ; chevelu racinaire encore complet
4	nombreuses petites galles ; quelques grosses galles ; système racinaire fonctionnant encore	5	25% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
6	50% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus	7	75% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
8	quasiment plus de racelles ; chapelets de grosses galles sur les racines principales ; la plante ne peut plus se nourrir	9	système racinaire réduit et rempli de grosses galles empêchant la plante de se nourrir
10	plante et racines mortes		

1.2.c. Interprétation des résultats (photo ci-dessous)

- Indice 0 : plante totalement résistante

- Indice 1 : plante partiellement résistante

- Indices 2 à 5 : plantes sensibles

- Indices 6 à 10 : plantes très sensibles

Exemple : Indices : 0

3



7



1.3. Technique de coloration des masses d'œufs de *Meloidogyne* spp.

1.3.a. Préparation du matériel végétal

- Après 6 semaines à 23-25°C, dépotage des plants à analyser
- Lavage soigneux des racines par trempage à l'eau courante.
- Préparation d'une solution d'éosine à 9 g pour 2 litre d'eau courante (conservation à température ambiante)
- Immersion des racines dans la solution d'éosine pendant 20 minutes
- Rinçage des racines à l'eau courante pendant 5 à 10 minutes.
- Comptage des masses d'œufs qui apparaissent comme des têtes d'épingle rouge.

Remarques : les racines colorées peuvent se conserver dans des sacs plastiques au congélateur à -20°C ou au réfrigérateur à 4°C en les humidifiant légèrement (Sopalin humide).

1.3.b. Interprétation des résultats

- De 0 à 5 masses d'œufs : plante résistante.
- De 5 à 10 masses d'œufs : plantes partiellement résistante.
- De 10 à 50 masses d'œufs : plante sensible.
- Plus de 50 masses d'œufs : plante très sensible

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Exemple: **Spectre de résistance de diverses lignées de piment (*Capsicum annuum* L.) aux nématodes à galles** (Djian-Caporalino *et al*, 1999).

Lignée de piment	<i>M. ARENARIA</i>	<i>M. ARENARIA</i>	<i>M. JAVANICA</i>	<i>M. HAPLA</i>	<i>M. HAPLA</i>	<i>M. HAPLA</i>	<i>M. INCOGNITA</i>	<i>M. INCOGNITA</i>		
	<i>ARENARIA</i> Marmande 22°C	<i>ARENARIA</i> St. Benoit 22°C	<i>JAVANICA</i> Avignon. 22°C	England 22°C	Canada 22°C	La Mole 22°C	Morelos 22°C	Calissane Fr.	22°C	32°C**
DLL	66.4 cde	87.2 c	258.4 a	nt*	nt*	nt*	160.5 b	111.9 bc	159.6 b	44.7 de
YW	0 f	0 f	0 f	0 f	15.7 ef	7.2 f	80.4 cd	76.8 cd	51.6 de	43.3 de
SC81	0 f	0 f	0 f	nt*	nt*	nt*	63.3 de	52.9 de	50.0 de	0 f
H3	0 f	0 f	0 f	0 f	17.8 ef	7.9 f	66.0 de	49.0 de	2.2 f	0 f
PM687	0 f	0 f	0 f	0 f	28.2 e	0 f	0 f	0 f	0 f	0 f
PM217	0 f	0 f	0 f	0 f	75.9 de	0 f g	0.2 f	0.1 f	0 f	0 f
CM334	0 f	0 f	0 f	0 f	138.2 b	98.0 bc	0.1 f	0 f	0 f	0 f
YNR	0 f	0 f	0 f	nt*	nt*	nt*	0 f	0 f	0 f	0 f
Tomates témoins										
Pierre	35.1 ef	142.6 b	58.2 de	123.2 b	130.7 ab	57.0 cde	68.9 cde	189.6 b	205.0 b	46.7 de
Saint										
Piersol (<i>Mi</i>)	0.2 f	0 f	6.2 f	138.8 bcd	237.0 ab	169.5 b	1.2 f	0.5 f	88.2 bc	morts

Les nombres suivis de la même lettre ne sont pas statistiquement différents ($P \leq 0.05$)

* non testé, ** plants maintenus à 32°C et traités à 42°C 5-6h par jour

Tableau 1 : Nombre moyen de masses d'œufs sur des lignées de piments pour 8 populations de nematodes à galles (10 répétitions)

Le cultivar DLL est hautement sensible à toutes les espèces de *Meloidogyne* testées ; les lignées YW, SC81, H3 sont sensibles à quelques espèces et résistantes à d'autres ; les lignées PM687, PM217, CM334 YNR sont résistantes à toutes les espèces sauf quelques populations de *M. hapla*.

3. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces tests utilisés en routine au laboratoire de l'INRA de Sophia Antipolis pour plusieurs espèces de plantes ont pour objectif la recherche de sources de résistance aux nématodes à galles et l'établissement des spectres de résistance vis-à-vis des espèces les plus répandues. L'évaluation de la stabilité de la résistance à haute température et l'effet de la pression d'inoculum sont également étudiés. Ces tests permettent de choisir des lignées particulièrement résistantes pour étudier le déterminisme génétique des gènes de résistance aux nématodes et réaliser leur marquage moléculaire. Des gènes ainsi sélectionnés sont en cours d'introgession dans des variétés cultivées par des sélectionneurs de semences qui utilisent les tests décrits pour sélectionner les plants résistants après chaque back-cross.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Djian-Caporalino C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubeze, A. Palloix, A. Dalmaso, P. Abad 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) *Theor Appl Genet* 99 (3/4) : 496-502
- Netscher, C. and Sikora, R. A. 1990. Nematode parasites of vegetables. *In* Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. *Edited by* M. Luc, R. A. Sikora and J. Bridge. CAB International, Wellingford, U.K. pp.237-284.