

## ÉVALUATION DE LA RESISTANCE DU BLE AU PIÉTIN-VERSE.

Anne Lécuyer<sup>1</sup>, Maxime Trotter<sup>1</sup>

Le piétin-verse est, comme son nom l'indique, une maladie qui se développe à la base des tiges du blé pouvant entraîner la verse. Les contaminations d'automne ont lieu sur les gaines des jeunes plantes : le champignon traverse successivement les gaines en provoquant des lésions sur celles-ci. À la montaison, la tige est attaquée lorsque le champignon a traversé toutes les gaines qui l'entourent. La nécrose peut s'étendre à toute la section de la tige. Des attaques directement sur la tige peuvent également avoir lieu au printemps.

Les champignons responsables du piétin-verse des céréales sont séparés en deux groupes, considérés aujourd'hui comme deux espèces (Tableau 1) : *Tapesia yallundae* et *Tapesia acuformis*. Cette maladie touche surtout les cultures des régions à climat océanique et peut provoquer des pertes de rendement de 10 à 15 quintaux/hectare en cas de verse parasitaire. Différents facteurs favorisent la maladie qu'ils soient agronomiques (semis précoces, système de rotation : paille sur paille...) ou climatiques (automne/hiver doux et humide). Cette maladie devient de plus en plus inquiétante car depuis les années 80 on a vu apparaître des souches résistantes à certains fongicides. C'est pourquoi nos travaux s'orientent vers la création de lignées résistantes.

Pour cela, nous effectuons deux types de test : l'un stade jeune plante en condition semi contrôlée et un autre au stade adulte au champ. Au stade jeune plante nous cherchons à la résistance à la pénétration des gaines et à détecter les plantes ayant le gène *Pch1* (gène impliqué dans la résistance), en comptant le nombre de gaines attaquées de chaque plante. Cette observation nous permet d'avoir une bonne estimation de la résistance à la pénétration des gaines. Tandis qu'au stade adulte nous voulons estimer la résistance globale en notant le pourcentage de section nécrosée par tige.

forme sexuée (parfaite)	<i>Tapesia yallundae</i>	<i>Tapesia acuformis</i>
Forme asexuée (imparfaite)	<i>Ramulispora (Pseudocercospora) herpotrichoides</i>	<i>Ramulispora (Pseudocercospora) acuformis</i>
anciennes dénominations	souche rapide ou « blé » (type N ou W)	souche lente ou « seigle » (type L ou R)
Colonies	Colonies à marges uniformes	Colonies à marge, irrégulières
Mycélium	gris ou gris olive	gris ou gris marron
Conidies	Conidies courbes ou droites (52 µm)	Conidies toujours droites (65 µm)

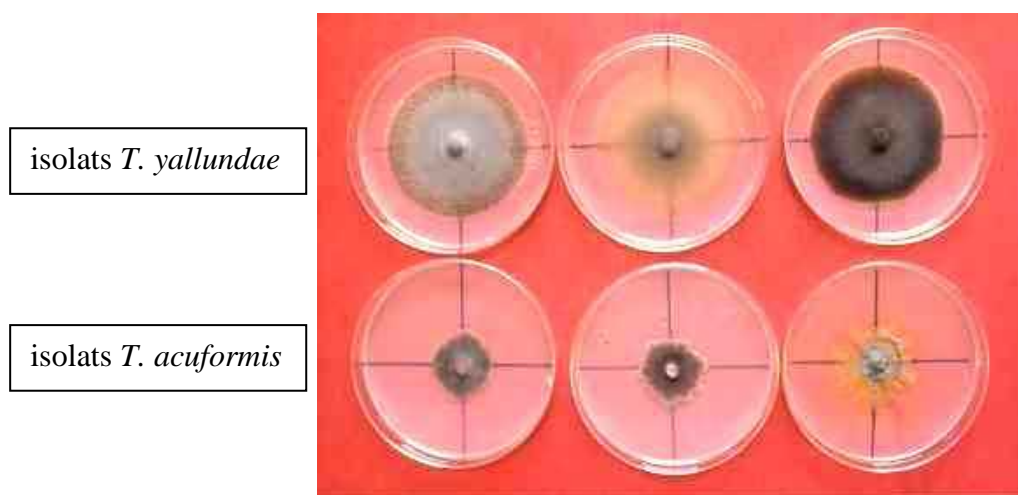
**Tableau 1.** Classification et caractères des deux champignons agents du piétin-verse attaquant le blé.

Pouvoir pathogène : Le type N est en général plus agressif que type L sur jeunes plantes de blé et sur plantes adultes ; il atteint plus rapidement la tige que le type L. À maturité, l'intensité des attaques est presque identique pour les deux types.

<sup>1</sup> UMR INRA – Agrocampus Rennes APBV, BP35327, 35653 Le Rheu, France

## 1. ISOLEMENT DE CULTURES DE *Tapesia spp.*

Pour obtenir des cultures pures de *Tapesia yallundae* et *Tapesia acuformis*, c'est à dire indemnes d'autres champignons et de bactéries, on part de nécroses de piétin-verse sur tige de blé au stade adulte. Les échantillons sont d'abord nettoyés en milieu stérile (hotte stérile ou près d'une flamme d'un bec Bunsen sans courant d'air). On prélève 1 cm de gaine ou tige portant une nécrose typique qu'on lave dans de l'eau de Javel à 1 % pendant 30 secondes à une minute, puis on rince trois fois à l'eau stérile. Ensuite, on sèche les fragments sur du papier filtre stérile pour éviter les contaminations par des bactéries. On découpe la zone nécrosée en tous petits morceaux (environ 10 d'un millimètre ou moins) qu'on dépose dans une boîte de Pétri de 90 mm sur du milieu P.D.A. + pénicilline G et streptomycine. Pour assurer la purification de l'isolat on repique un fragment du front de croissance sur un milieu P.D.A. Plusieurs repiquages en boîtes de Pétri sont parfois nécessaires pour assurer la purification de l'isolat. La vitesse de croissance sur milieu artificiel permet de distinguer deux types d'isolats en fonction de leur vitesse de croissance, ceux à croissance normale et ceux à croissance lente (Figure 1)



**Figure 1** : Cultures de *Tapesia yallundae* et *T. acuformis* après 2 semaines à environ 20 °C

Il faut récupérer de nombreux isolats afin de retenir environ 10 isolats de *T. acuformis* ex-souches lentes (L) et 5 isolats de *T. yallundae* ex-souches rapides (N). Ceux-ci seront choisis en fonction de leur vitesse de croissance sur milieu artificiel (PDA). Après 8-10 jours, on peut caractériser les isolats comme appartenant à l'une ou l'autre espèce.

À partir des tests d'agressivité et de virulence sur les hôtes différentiels (Tableau 2) et de la vitesse de croissance en milieu artificiel, on choisit un isolat de *T. yallundae* se développant bien sur milieu artificiel et agressif sur les variétés Moisson et Cappelle, et peu agressif sur les autres hôtes. Les isolats *T. acuformis* doivent quant à eux se développer convenablement sur milieu artificiel et être agressifs sur le seigle. De plus, on choisira de préférence deux isolats ayant une agressivité (ou virulence) différente vis-à-vis de la variété de triticales Ampiac (Ampiac étant résistant à une des deux souches et sensible à l'autre).

L'isolat *T. yallundae* servira à la production d'inoculum sur grains d'avoine pour les tests de résistance au stade adulte au champ et les tests au stade jeune plante au tunnel.

espèce	Hôtes différentiels		isolats	
	variété		<i>T. yallundae</i>	<i>T. acuformis</i>
Blé tendre	VPM		R (peu virulent)	R
	Moisson		S (virulent)	S
	Cappelle		S (stade jeune plante)	S (stade jeune plante)
	Courtot (Roazon 7DR)		R	R
Seigle	Petkus		R	S
	Petkus spring		R	S
Triticale	Ampiac		R	R (sauf depuis 2000 pour certains isolats)
	Trimaran		S	R ?

**Tableau 2 :** Hôtes différentiels utilisés pour caractériser les isolats de *Tapesia yallundae* et *T. acuformis*

Les isolats *T. yallundae* sont virulents sur les variétés de blé sensibles telles que Moisson, pas ou peu virulents sur le seigle ainsi que sur des blés résistants comme VPM. Les isolats *T. acuformis* sont virulents sur seigle, sur les variétés de blé tendre sensibles (Moisson). En général la souche choisie est de l'espèce *T. yallundae* car de plus en plus présente par rapport à *T. acuformis* (Tableau 2).

L'isolat pour effectuer les tests étant choisi, on peut le multiplier

## 2. PRODUCTION D'INOCULUM DE PIÉTIN-VERSE

Le but est de pouvoir contaminer les plantes pour évaluer la résistance au piétin-verse de génotypes au stade jeune plante et au stade adulte. La multiplication de l'inoculum de piétin-verse se fait sur grains d'avoine blanche ce qui permet de mieux détecter les contaminations.

- Mettre une mesure de 1 kg d'avoine dans une fiole de Erlenmeyer de 5 l, y ajouter 1 l d'eau
- Boucher avec le coton cardé, fermer avec du papier sulfurisé et le fixer avec un élastique.
- Autoclaver les fioles deux fois à 24 heures d'intervalle, pendant 1 h à 120°C (1 bar).
- Bien agiter les fioles entre les deux stérilisations, en prenant garde de ne pas faire toucher les grains en contact avec le coton cardé pour éviter le risque de contamination.
- Laisser refroidir les fioles et les ensemercer avec une culture pure de *Tapesia*. Pour cela, travailler près d'un bec Bunsen ou sous une hotte à flux laminaire. Prélever avec un scalpel nettoyé à l'alcool et flambé à la flamme, un fragment du front de croissance ; ouvrir la fiole ; introduire l'explant ; refermer immédiatement la fiole avec son bouchon de coton cardé et du papier sulfurisé maintenu par un élastique.
- Agiter pour fragmenter et disséminer le mycélium dans la fiole et pour éviter que les grains ne prennent en masse, une fois par semaine environ. Les grains seront complètement contaminés au bout d'un mois et demi à deux mois.
- Sortir les grains de la fiole et les faire sécher à l'étuve à 30-35 °C pendant 24 à 48 heures.
- Conserver l'inoculum en sac papier en chambre froide en atmosphère bien sèche. La durée de conservation est de un an environ.

Deux types de test sont réalisés à partir de l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés pour évaluer la résistance des génotypes au stade jeune plante, en conditions semi contrôlées (tunnel maraîcher), et évaluer la résistance de génotypes au stade adulte, au champ.

### 3. TEST DE RESISTANCE AU PIETIN-VERSE AU STADE JEUNE PLANTE

L'objectif est de mesurer la résistance à la pénétration des gaines, et de détecter la présence du gène *Pch1*.

#### 3.1. Mise en place le matériel végétal

Le semis est réalisé en tunnel maraîcher. Il s'effectue en lignes de 0,5 m (30 grains) espacées de 0,2 m, au début novembre. Prévoir 10 lignes de bordures. Echelonner le semis en fonction des possibilités de notation, afin de toutes les réaliser au bon stade. Désherber l'essai en post semis pré levée (Néburon à 10 g/l).

#### 3.2. Inoculation les jeunes plantes

Répandre l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés séchés sur le sol, au stade 2 ou 3 feuilles, environ 10 g / m<sup>2</sup>.

Pour une bonne contamination, l'hygrométrie doit être élevée. Pour cela, bien arroser les plantes la veille de la contamination et laisser le tunnel fermé. Puis arroser régulièrement.

#### 3.3. Noter les symptômes

La date de notation dépend de la température hivernale. Il faut la choisir en fonction du développement de la maladie sur des témoins : moins de deux gaines foliaires attaquées sur des variétés possédant le gène *Pch1* (VPM, Roazon, Renan, Ralf, ...) et trois à quatre gaines attaquées sur des variétés sensibles (Moisson, Soissons, ...).

- Arracher les plantes en prenant soin de ne pas abîmer les gaines, les laver et écarter les gaines foliaires jusqu'à la dernière gaine attaquée sur laquelle le stroma du champignon est bien visible.

- Dénombrer les gaines attaquées de chaque plante.

- On peut aussi noter l'aspect du stroma qui permet de repérer facilement les plantes possédant le gène *Pch1* (Figure 2).



Présence du gène *Pch1* :  
stroma peu développé de  
couleur brune



Absence du gène *Pch1* :  
stroma très développé de  
couleur gris foncé à noir

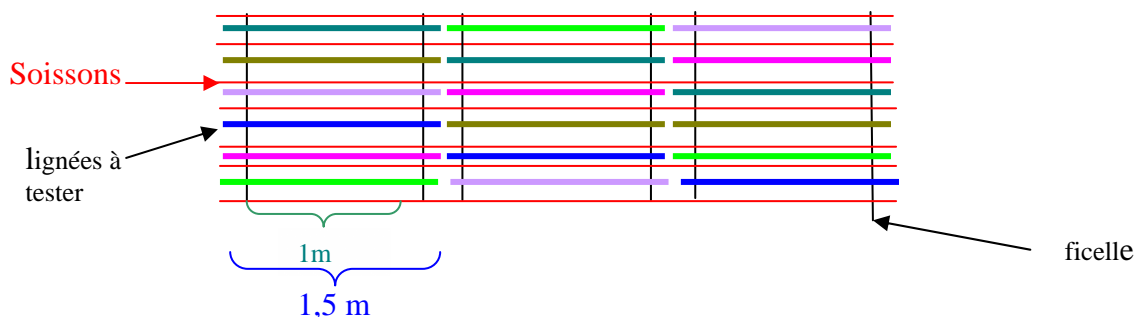
**Figure 2 :** Nécrose des gaines foliaires en fonction de la présence ou de l'absence du gène *Pch1* de résistance au piétin-verse

#### 4. TEST DE RESISTANCE AU PIÉTIN-VERSE AU STADE ADULTE

L'objectif est d'estimer la résistance de la tige à la colonisation par le champignon en estimant le pourcentage de nécroses des sections de tiges. Cette note représente la somme des effets de la résistance à la pénétration des gaines et à la colonisation des tiges. Ce type d'essai ne peut être réalisé que dans des régions à hiver doux et humide.

Les génotypes à tester sont semés sur N répétitions randomisées. Une date de semis précoce (15-20 octobre) est importante pour permettre de contaminer avant la période froide, le développement du piétin-verse dépendant directement de la somme de températures hivernales reçue. Le semis doit être dense : 90 grains environ sur une ligne de 1,50 m. Ceci permet de maintenir une hygrométrie élevée, favorable au développement du champignon, dans les parcelles. Chaque parcelle est ensuite délimitée à 1 m avec de la ficelle.

Une lignée très sensible au piétin-verse comme « Soissons » est semée entre chaque ligne à tester afin d'assurer une bonne contamination de l'essai et de minimiser les effets de voisinage (Figure 3).



**Figure 3 :** Schéma de l'implantation au champ d'un test de résistance au piétin-verse.

La contamination des plantes se fait en répandant l'inoculum sous forme de grains d'avoine contaminés séchés sur le sol au stade 2 - 3 feuilles en novembre, environ 10 g / m<sup>2</sup>.

##### 4.1. Notation des symptômes

La période de notation se situe entre la fin du gonflement et la fin du stade laiteux (une centaine de degrés-jour après la floraison). Il faut la fixer en fonction du développement de la maladie sur des témoins : noter dès que la différence entre les témoins résistants (VPM, Roazon, Renan, Ralf, ...) et les témoins sensibles (Moisson, Soissons) est significative. Il est utile de réaliser la notation en fonction de la précocité des variétés à tester et d'utiliser des témoins de précocités voisines. Si l'on attend trop longtemps pour noter, des saprophytes apparaissent et rendent difficile l'estimation de la part des nécroses due au piétin-verse. De plus, le champignon continue à se développer et la différence entre lignées résistantes et lignées sensibles devient moins visible.

- Arracher les plantes d'une même parcelle en ayant soin de ne pas abîmer le collet. L'expérience montre qu'un échantillon de 50 tiges prises au hasard donne une bonne représentation de la parcelle (ligne de 1 m).
- Couper les plantes à hauteur de 25 cm à l'aide d'une paire de ciseaux
- Nettoyer les tiges en enlevant les feuilles. Il ne doit plus rester que la tige à noter
- Couper au niveau de la plus grosse nécrose de piétin-verse

- Estimer à l'œil nu le pourcentage de section nécrosée par la maladie et répartir les tiges dans les classes d'attaque définies par le protocole. L'estimation du pourcentage de nécrose des sections de tiges peut varier avec l'observateur. Si le même notateur ne peut pas noter la totalité d'un essai, chaque notateur doit noter une répétition entière pour contrôler la variabilité due au notateur dans l'effet répétition (Figure 4).

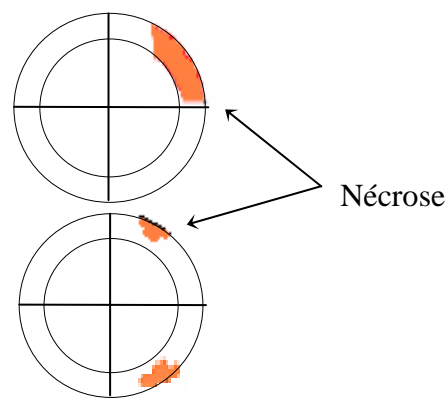
On peut :

- soit définir deux classes en fonction du niveau d'attaque des témoins sensibles et résistants.
- soit définir des classes à priori par exemple 6 classes : [sain], [1-<25], [25-<50], [50-<75], [75-<100], [100].

On calcule ensuite le pourcentage moyen de section attaquée à partir de la répartition des tiges en classes de chaque parcelle.



Symptômes au stade adulte



Exemple de tiges à mettre dans la classe [1-<25 %]

**Figure 4 :** *Symptômes de piétin-verse sur tige de blé et illustration de nécrose de section de tige.*

Il est important de faire en sorte que la notation d'un essai ne dure pas plus d'une semaine car l'attaque de piétin-verse peut évoluer rapidement après floraison et les génotypes notés à plus de cinq jours d'intervalle ne sont plus comparables entre eux. Si ce n'est pas possible, on peut arracher l'ensemble de l'essai et conserver les bases de tiges, soit dans une chambre froide à une température d'environ 5 °C et à l'obscurité pendant un maximum de 4 jours, soit pendant plusieurs mois dans un congélateur à -20°C.