

TEST DE CRIBLAGE EN CONDITIONS CONTROLÉES POUR LA RÉSISTANCE À *Plasmodiophora brassicae* CHEZ LES BRASSICA

Pascal Glory, Maria Manzanares-Dauleux¹

La hernie des Crucifères, provoquée par le biotrophe obligatoire *Plasmodiophora brassicae*, est actuellement l'une des plus graves maladies des *Brassica* cultivés dans le monde, notamment *B. oleracea* (choux), *B. napus* (colza) et *B. rapa* (navette). En France, la hernie occasionne depuis longtemps de graves pertes de rendement et de qualité des produits sur les cultures légumières de choux (chou-fleur et brocoli). Sur colza, la hernie, en pleine expansion, a des conséquences économiques dramatiques dans certaines régions productrices où le colza est la seule tête de rotation. La lutte contre ce parasite tellurique s'avère difficile, les solutions de type chimique ou cultural donnent des résultats aléatoires et sont difficilement applicables en plein champ. Il est aujourd'hui admis que l'association des méthodes culturales à des résistances génétiques sera à terme le seul moyen efficace de contrôler la maladie. Actuellement, aucune variété résistante n'est disponible chez *B. oleracea*. Différents travaux de recherche et sélection sont développées avec l'objectif d'introduire et/ou d'augmenter les niveaux de résistance chez les choux et le colza. Une méthode efficace d'évaluation de la résistance en conditions contrôlées a été mise au point permettant d'apprécier à des stades précoces le comportement du matériel végétal en sélection.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal et parasitaire

Le matériel végétal évalué comprend des ressources génétiques, du matériel végétal en sélection (lignées, hybrides...), et des populations en ségrégation (F₂, F₃, BC) de *B. oleracea* et *B. napus*.

Des isolats monospores ou populations de *P. brassicae* appartenant à différents pathotypes sont utilisés pour les inoculations (Manzanares-Dauleux *et al.*, 1994 ; 2001).

1.2. Conditions du test

Le test de résistance est réalisé en chambre de culture en utilisant une photopériode de 16 heures avec des températures de 22°C le jour/19°C la nuit. Un niveau d'humidité relative de 80-90% est maintenu pendant toute la durée du test.

Les graines des différents génotypes sont semées dans un substrat de type «motte fertiss» composé de tourbe blonde-perlite-vermiculite et dont les caractéristiques sont les suivantes : matière sèche 40%, matière organique 25%, rétention en eau 75%, résistivité 4000 Ohm/cm, conductivité 0,25 mS/cm et pH 6. Ce support de culture est totalement dépourvu d'éléments fertilisants ; en conséquence, les mottes-fertiss sont trempées avant semis dans une solution nutritive diluée à 0,25% pendant 48 heures. Après semis et pendant les 3-4 premières semaines, la solution nutritive est apportée de façon régulière par sub-irrigation. Au delà, et en fonction du développement des plantes, il est possible d'arroser uniquement à l'eau claire.

¹ UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Domaine de la Motte, BP35327, 35653 Le Rheu Cedex

L'utilisation d'un substrat à pH acide et le maintien d'un degré d'humidité élevé est essentiel pour le test, car la germination des spores de repos de *P. brassicae* est optimale à des pH compris entre 5,8 et 6,5 et dans des milieux très humides. La durée du test est de 7 semaines.

1.3. Dispositif expérimental

Un dispositif en blocs complets randomisés comportant 2 blocs et 2 répétitions/ bloc est utilisé. La taille des unités expérimentales diffère en fonction de la nature du matériel végétal à tester : dans le cas d'évaluation de génotypes fixés (lignées, populations d'haploïdes doublés...) ou de descendances en ségrégation de type F₃, chaque répétition comporte 6 plantes (24 plantes au total) ; dans le cas de populations non fixées (ressources génétiques), l'unité expérimentale est de 12 plantes (48 plantes au total). Des témoins résistants (les 3 hôtes de la gamme différentielle employée à l'INRA : *B. napus* cv. Nevin, *B. napus* cv. Wilhelmsburger et *B. napus* cv Brutor) (Somé *et al*, 1994) et le témoin sensible ECD5 (*B. rapa* spp. *pekinensis* cv. Granaat) sont inclus dans toutes les expérimentations.

1.4. Méthode d'inoculation

1.4.a. Préparation de l'inoculum

P. brassicae, étant un parasite obligatoire, ne peut être conservé que sur de matériel vivant. Les isolats sont donc multipliés sur le témoin sensible universel *B. rapa* spp. *pekinensis*. Les galles formées sur le système racinaire contenant les spores de repos du parasite sont récoltées 7 semaines après inoculation et conservées à -20°C.

Au moment du test, les galles sont décongelées à température ambiante et ensuite broyées dans un petit volume d'eau distillée. La solution obtenue est filtrée d'abord à l'aide d'un tissu poreux puis sur trois tamis de maillage décroissant (500µ-250µ-100µ). L'estimation du nombre de spores de repos dans la solution mère est réalisée sur une solution diluée au 1/100^{ème} à l'aide d'une cellule de Malassez. La concentration finale de l'inoculum est ensuite ajustée à 10⁷ spores de repos/ml.

1.4.b. Méthode d'inoculation

Six jours après le semis, les mottes-fertiss sont ressuyées pendant 48 heures. Les plantes de 8 jours sont alors inoculées en déposant plante à plante 1 ml de la solution de spores de repos à 10⁷ spores/ml au niveau du collet. Le ressuyage évite ainsi une dilution de l'inoculum dans une motte imbibée d'eau. Pendant les 48 heures suivant l'inoculation, on ne réalise pas d'arrosage.

1.5. Lecture des symptômes

Sept semaines après inoculation, les plantes sont déterrées, les racines lavées à l'eau courante et notées individuellement selon une échelle de 0 à 3. Une attention particulière doit être donnée à conserver la totalité du système racinaire.

En fonction de l'intensité des symptômes observés sur les racines, les plantes sont réparties en cinq classes :

- **classe 0** : aucun symptôme,
- **classe 1** : une ou quelques petites galles sur le système racinaire secondaire,
- **classe 2** : le système racinaire primaire est légèrement atteint, de nombreuses galles sur le système racinaire secondaire,
- **Classe 2+** : le système principal est très atteint mais l'extrémité de la racine principale possède encore une forme normale et/ou un nouveau système racinaire s'est formé au dessus de la galle,
- **Classe 3** : tout le système racinaire correspond à une galle.

1.6. Analyse des résultats

Dans les cas d'évaluation de populations en ségrégation de type F₂ ou BC₁, chaque plante est affectée à une classe. Pour des lignées ou des populations F₃, un indice pathologique (IP) est calculé en affectant un coefficient (0, 25, 50, 75, 100) au nombre de plantes de chaque classe, divisé par le nombre total de plantes notées :

$$IP = \frac{(\text{nb pl cl1} \times 25) + (\text{nb pl cl 2} \times 50) + (\text{nb pl cl 2+} \times 75) + (\text{nb pl cl 3} \times 100)}{\text{Nb pl total}}$$

La valeur de l'IP varie ainsi de 0 (plantes totalement résistantes) à 100 (plantes totalement sensibles). Ces données sont analysées statistiquement à l'aide du logiciel SAS (analyses de variance, tests de corrélation, comparaisons de moyennes...).

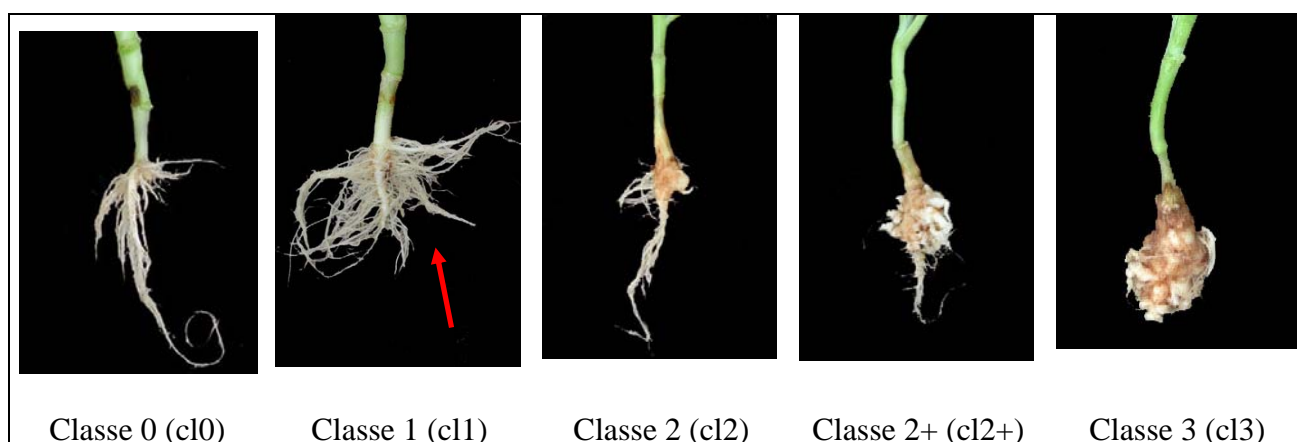


Figure 1: Classification des symptômes de la hernie en cinq classes de résistance.
(Pour la classe 1, la flèche indique une petite galle présente sur le système racinaire secondaire.)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Validation du test

Les valeurs d'IP attendues pour le témoin sensible ECD5 se situent entre 90% et 100%. Des valeurs d'IP inférieures à 60% traduisent des erreurs d'inoculation (concentration de la solution de spores) ou des problèmes de conduite des plantes (faible humidité, basses températures) et le test doit en conséquence être recommencé.

Les valeurs IP des hôtes de la gamme différentielle permettent de valider la caractérisation du pathotype de l'isolat utilisé.

2.2. Résultats

La gamme de variation de l'IP peut varier de 0 à 100%. Une interprétation qualitative des données IP est aussi réalisée en classant les géotypes possédant des valeurs IP compris entre 0-25% comme résistants (classes 0 et 1), et pour de valeurs de 26-100% (classes 2, 2+ et 3) comme sensibles.

3. CONCLUSION

Ce test d'évaluation en conditions contrôlées de la résistance des *Brassica* à *P. brassicae* est largement utilisé par l'INRA, et commence à être utilisé par les sélectionneurs privés en France. Ce test est employé en routine pour l'évaluation de ressources génétiques (Manzanares-Dauleux *et al*, 2000b), la caractérisation des différents pathotypes de *P. brassicae* en utilisant une gamme d'hôtes différentielle (Manzanares-Dauleux *et al*, 2001), les études génétiques de la résistance à la hernie chez les choux et le colza (Manzanares-Dauleux *et al*, 2000a ; Rocherieux *et al*, 2004) et l'appréciation du comportement de résistance de matériel en sélection (lignées, hybrides, populations...). De plus, il existe une très bonne corrélation entre les résultats obtenus avec ce test et ceux obtenus avec le test de résistance au champ. Il contribue ainsi à faire progresser les programmes de recherche et de sélection visant à identifier de nouvelles sources de résistance et à caractériser les facteurs génétiques impliqués dans le contrôle de la résistance ainsi qu'à sélectionner des géniteurs de type agronomique présentant des niveaux améliorés de résistance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rocherieux J., Glory P., Giboulot A., Boury S., Barbeyron G., Thomas G., Manzanares-Dauleux M.J. 2004. Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108:1555-1563.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F. & Thomas G. 2001. Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Pathology* 50: 165-173.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F. & Thomas G. 2000a. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101: 885-891.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F. & Thomas G. 2000b. Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113: 211-218.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G. & Rouxel F. 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45: 432-439.
- Manzanares M.J., Laurens F., Baron F. & Thomas G. 1994. Production of single spore isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Cruciferae Newsletter* 16: 132-133.