

TEST DE CRIBLAGE EN CONDITIONS CONTROLÉES POUR LA RÉSISTANCE DU POIS A *Aphanomyces euteiches*

Anne Moussart¹, Bernard Tivoli²

La pourriture racinaire précoce du pois est due à un oomycète d'origine tellurique, *Aphanomyces euteiches*. Cette maladie, apparue en France au début des années 1990, est responsable de pertes de rendement très importantes, pouvant atteindre 100% en cas de forte attaque. Afin d'étudier la résistance du pois à *A. euteiches* et de faire progresser la sélection variétale, il est apparu nécessaire de disposer d'un test en conditions contrôlées, utilisable en routine.

1. MATERIEL ET METHODES

Le test est réalisé en chambre climatique (thermopériode 25°C-23°C ; photopériode 16h-8h – intensité lumineuse : $160 \pm 2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$).

1.1. Préparation du matériel végétal

Le semis est réalisé 7 jours avant l'inoculation. Pour chaque lignée testée, 20 graines non désinfectées sont semées dans de la vermiculite, à raison de 5 graines par pot (pots de 9 cm). Les graines doivent être enfoncées à une profondeur d'environ 2 cm. Chaque pot constitue une répétition, il est donc disposé dans un des 4 blocs de la chambre climatique. Les pots sont répartis dans des plateaux, chaque plateau pouvant contenir 4 pots. Les plateaux sont remplis d'eau après le semis. Une variété sensible (Baccara) et une lignée partiellement résistante (lignée PI180693) servent de témoin à chaque test (Wicker *et al.*, 2003).

1.2. Préparation de l'inoculum

Huit jours sont nécessaires à la préparation de l'inoculum. La première étape doit donc commencer la veille du semis. Les différentes étapes doivent être réalisées en conditions stériles (hotte à flux laminaire ou Bec Bunsen).

Étape 1 : repiquage du champignon

La souche d'*A. euteiches* est conservée à 10°C dans un tube contenant un milieu gélosé Corn Meal Agar. Le champignon est repiqué à partir du tube de conservation, en boîte de Pétri (2 à 3 boîtes) sur milieu gélosé Corn Meal Agar et incubé pendant 4 jours à l'obscurité dans une étuve à 25°C.

Étape 2 : Transfert en milieu de culture liquide

Cette étape permet le développement du mycélium et l'induction de la fructification (reproduction asexuée). Vingt cinq explantats sont découpés à l'emporte pièce (5 mm) en marge des colonies et transférés dans une fiole de ligne de 300ml contenant 50 ml de milieu liquide Peptone Glucose. Les fioles sont placées pendant 3 jours à l'obscurité dans une étuve à 25°C.

¹ UNIP - UMR INRA/Agrocampus Rennes 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la protection des Plantes' (BiO3P). Domaine de la motte – BP35327 – 35653 LE RHEU

² UMR INRA/Agrocampus Rennes 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la protection des Plantes' (BiO3P). Domaine de la motte – BP35327 – 35653 LE RHEU

Etape 3 : Rinçage du mycélium

Cette étape est nécessaire au développement des sporanges et à la libération des zoospores. La veille de l'inoculation, trois rinçages sont effectués. Ces rinçages espacés de 2 heures doivent être réalisés avec de l'eau de Volvic du commerce.

Lors du premier rinçage, la solution de Peptone Glucose est éliminée en renversant doucement la fiole et en prenant soin de laisser les explantats à l'intérieur. Les explantats sont rincés une première fois en ajoutant 30ml d'eau de Volvic et en agitant légèrement. Puis, cette eau de rinçage est éliminée. Trente ml d'eau de Volvic sont à nouveau ajoutés et la fiole est placée pendant 2 heures à l'obscurité dans une étuve à 25°C, sans agitation.

Lors du deuxième et du troisième rinçage, l'eau de Volvic est éliminée et 30 ml d'eau de volvic sont à nouveau ajoutés. La fiole est placée à l'obscurité dans une étuve à 25°C, sans agitation.

Etape 4 : Obtention de la suspension de spores

Les zoospores sont libérées dans les 16 heures suivant le dernier rinçage. La suspension est disponible dès le lendemain matin et doit être impérativement utilisée dans la journée.

L'eau de Volvic contenant les zoospores est transférée dans un flacon stérile, en prenant soin de laisser les explantats à l'intérieur de la fiole. Les restes de mycélium présents dans la suspension de spores sont éliminés. Quelques microlitres de suspension sont prélevés et déposés sur cellule de Malassez afin de vérifier la présence de zoospores mobiles. Certaines zoospores sont enkystées mais restent viables.

Afin de déterminer la concentration de la suspension de spores, il est nécessaire de provoquer l'enkystement afin de les immobiliser. Pour cela, 2 à 3 ml de suspension sont déposés dans un tube et agités au Vortex pendant environ 30 secondes. La concentration est déterminée en utilisant la cellule de Malassez. Une fiole de 30ml contient 1.10^5 à 5.10^5 spores/ml.

La concentration de la suspension de spores à préparer est 200 spores/ml. Cent ml de suspension sont nécessaires pour une lignée (5 ml par plante). Les dilutions sont réalisées dans une fiole de ligne avec de l'eau permutée stérile. Si le volume de suspension à préparer est important, il est préférable de préparer une fiole par bloc.

1.3. Inoculation et incubation

La suspension de spores à inoculer est mise en agitation très douce sur un agitateur magnétique afin de maintenir la suspension homogène pendant toute la durée de l'inoculation. L'inoculation est réalisée à l'aide d'une pipette en déposant 25ml de suspension de spores par pot, soit 5ml par plante. Si le nombre de plantes par pot est inférieur à 5, il est nécessaire d'ajuster le volume de suspension inoculé (exemple : 15ml pour 3 plantes). Il est important de répartir régulièrement la suspension à la surface du substrat.

Les plateaux doivent être remplis d'eau pendant les 3 jours suivant l'inoculation afin de maintenir la capacité en pot. Les plantes inoculées sont incubées pendant 7 jours.

1.4. Système de notation

Sept jours après inoculation, les plantes sont dépotées avec soin. Il n'est pas nécessaire de laver les racines. Chaque plante est notée selon une échelle de 0 à 5 (Wicker et al., 2001).

0 = absence de symptôme ; 1 = traces translucides à beiges sur les radicules ; 2 = zones beiges à brunâtres, molles, couvrant le quart du système racinaire ; la racine est touchée ; 3 = zones beiges à brunâtres, molles, couvrant au moins la moitié du système racinaire ; l'épicotyle peut tourner au beige mais reste ferme ; 4 = le système racinaire est au trois quart clair et mou. L'épicotyle est mou et paraît étranglé ; 5 = la plante est morte.

Pour chaque lignée, un indice de nécrose est calculé de la façon suivante :

$$IN \text{ moy} = \sum_{I=1}^4 (IN \text{ pot}_i) / 4$$

IN moy : Indice de Nécrose moyen

IN pot_i : Indice de Nécrose de la répétition (pot)_i

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats obtenus pour les 6 génotypes de la gamme différentielle (Wicker et al., 2003) sont représentés sur la figure 1. Les niveaux de résistance partielle actuellement disponibles sont faibles mais le test permet une bonne discrimination des génotypes entre eux. Les résultats du test sont corrélés avec les résultats obtenus lors de criblages au champ. La figure 2 représente la relation entre l'Indice de Nécrose du test et l'Indice Aérien (impact de la maladie sur les parties aériennes) mesuré au champ.

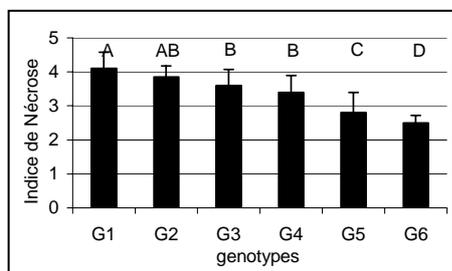


Figure 1 : résultats du test pour les six génotypes de la gamme différentielle

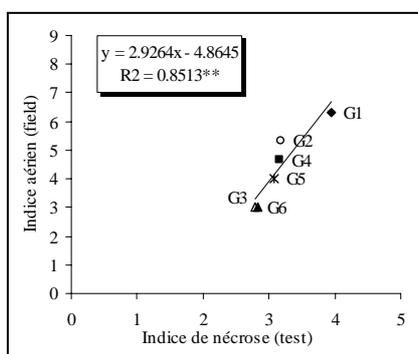


Figure 2 : corrélation obtenue en 2000 entre les résultats du test et les résultats du criblage au champ



Figure 3 : symptôme d'*A. euteiches* sur pois

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce test en conditions contrôlées présente l'avantage d'être simple, rapide et reproductible. Il est actuellement utilisé par les pathologistes (appréciation du pouvoir pathogène, recherche de composantes), généticiens (sources de résistance, analyses génétiques) et sélectionneurs (sources de résistance, création variétale). Récemment, ce test a été adapté pour l'étude de la résistance de la plante modèle *Medicago truncatula* à *A. euteiches*. De nombreuses autres adaptations sont possibles (tests de spécificité d'hôtes, ...).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wicker E, Hullé M and Rouxel F (2001) Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France. *Plant Pathology* 50: 433-442
- Wicker E, Moussart A, Duparque M, Rouxel F (2003) Further contributions to the development of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum*) to investigate the virulence of *Aphanomyces euteiches*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 47-60