

TEST DE CRIBLAGE DU POIS PROTEAGINEUX AU STADE JUVENILE POUR LA RESISTANCE AU PATHOGENE FONGIQUE *Mycosphaerella pinodes*

Caroline Onfroy¹, Bernard Tivoli²

L'antracnose, due à *M. pinodes* et à *Phoma medicaginis* var *pinodella*, est la maladie foliaire la plus grave sur pois protéagineux en France. Relativement bien maîtrisée en semis de printemps par des traitements fongicides, elle est particulièrement préoccupante sur pois d'hiver car son apparition et son développement sont loin d'être jugulés. La recherche de résistance variétale constitue l'une des orientations actuellement privilégiées.

Une méthodologie visant à cribler le matériel végétal en chambre climatique sur des jeunes plantes et/ou sur organes foliaires excisés maintenus en survie, a été mise au point.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Préparation du matériel végétal

Les tests sont mis au point sur une gamme d'hôtes différentielle composée de six génotypes : deux génotypes de la collection de Roger Cousin (INRA Versailles) considérés comme modérément résistants (DP et FP), deux autres venant du John Innes Center (JI 252 et JI 296 respectivement résistant et sensible) et les variétés Solara et Melrose.

Quatre graines sont semées dans des pots de 9 cm de diamètre dans un substrat stérilisé (1/1/1 sol/sable/terreau) et trois répétitions sont réalisées par génotype testé. Les pots sont placés dans des plateaux en chambre climatique sous une intensité lumineuse de $160 \pm 2 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, une photopériode de 14h et une thermopériode 12°C/8°C, jusqu'à ce que les plantes atteignent 3-4 feuilles ou 5-6 feuilles respectivement pour l'inoculation des jeunes plantes et pour les tests sur organes maintenus en survie.

1.2. Préparation de l'inoculum

Les cultures sont repiquées à partir de tubes de milieu gélosé à base d'extrait de malt. Les colonies se développent à 20°C, sur milieu V8 (30g d'agar, 199 ml de V8, 801 ml d'eau, autoclavage à 105°C pendant 30 minutes) sous lumière blanche sous 12h de photopériode. Afin de libérer les pycniospores de leur mucus, la suspension de spores est préparée en grattant la surface d'une colonie âgée de 10 jours recouverte d'eau distillée stérile, avec un agitateur coudé. La solution ainsi obtenue est filtrée au travers de la gaze stérile. La concentration de spores est déterminée à l'hématimètre.

1.3. L'inoculation et l'incubation

1.3.a. Les tests sur jeunes plantes

Les génotypes à cribler sont disposés selon un dispositif en bloc entièrement randomisé. La concentration de spores est ajustée à 10^5 spores/ml. Deux gouttes de mouillant (Tween 20) sont ajoutées à un litre de suspension de spores. La suspension de spores est appliquée à l'aide d'un pulvérisateur à main à raison de 2ml de suspension par pot de quatre plantes et chaque plateau est recouvert d'un couvercle de mini serre pour maintenir une atmosphère humide

¹ UNIP INRA UMR BiO3P, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

² INRA UMR BiO3P, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex

autour des feuilles. Les plantes sont incubées jusqu'à la fin du criblage, sous 14h de photopériode et une thermopériode de 15°C/18°C.

Comme les plantes continuent de croître après l'inoculation, la maladie est appréciée seulement sur les parties inoculées de chaque plante, par l'évaluation de l'intensité de maladie sur les quatre premiers étages foliaires. La gravité de la maladie est appréciée visuellement en utilisant l'échelle de notation de 0 à 5 (Tivoli *et al.*, 1996) : 0 = absence de lésions, 1 = quelques ponctuations, 2 = de nombreuses ponctuations, 3 = 10-15% de la surface atteinte (premières nécroses), 4 = 50% de la feuille déshydratée et nécrosée, 5 = 75-100% de la feuille déshydratée et nécrosée. Ces notations sont réalisées 10 et 20 jours après l'inoculation. Les valeurs moyennes de maladie par plante sont calculées et analysées par une analyse de variance.

1.3.b. Les tests sur folioles ou stipules excisés maintenus en survie

Les tests sur des stipules ou folioles détachés maintenus en survie sur un film d'eau et inoculés en leur centre par une goutte de suspension de spores, permettent de mettre en évidence les composantes de la résistance partielle.

Les stipules (ou folioles) du 3^{ème} ou 4^{ème} étage sur des plantes de 6 étages sont prélevés à partir des plantes précédemment préparées, en conservant environ 5mm de l'entre-noeud (ou du pétiole) sur lequel ils sont attachés. Ils sont déposés sur un film d'eau préalablement disposé au fond d'une boîte de Pétri (l'entre-noeud ou le pétiole étant immergé). Les résultats de criblage les plus discriminants sont obtenus en déposant au centre de chaque stipule, 10 microlitres d'une suspension de pycniospore à 10⁵ spores par ml, de la souche agressive *Mp* 91.31.12 âgée de 10 jours. Après avoir soigneusement fermé chacune de boîtes à l'aide d'une bande de parafilm, afin d'éviter toute évaporation de la goutte, les boîtes sont placées à 20°C, dans une chambre climatique sous 14h de photopériode, et sous une intensité lumineuse de 160±2μEm⁻²s⁻¹. Les boîtes sont placées selon un dispositif entièrement randomisé.

La gravité de la maladie est appréciée quotidiennement en utilisant deux échelles de notation successives. La première échelle de 0 à 3 vise à estimer la densité de ponctuations, représentatives de l'apparition de la maladie au niveau de la goutte : 0 = absence de lésions ; 1 = quelques lésions ; 2 = de nombreuses lésions ; 3 = des ponctuations recouvrant 100% de la surface de la goutte. La seconde échelle consiste à mesurer (en mm) la nécrose en avant de la bordure de la goutte, montrant ainsi la progression du champignon dans les tissus.

Les résultats sont analysés par l'étude de la variance (ANOVA)

2. RESULTATS ET INTERPRETATION

2.1. Tests de criblage sur jeunes plantes

Souche	Géotypes de pois					
	JI 296	Solara	JI 252	Melrose	DP	FP
<i>M. pinodes</i> ¹	3.9a	3.0b	3.0b	2.7c	2.6c	2.3d
<i>P. medicaginis</i> ¹	2.6a	1.0c	1.4b	1.1c	1.0c	0.8c

¹ Les moyennes suivies par la même lettre sur la ligne ne sont pas significativement différentes (P = 0,05) selon le test de Newman Keuls

Tableau 1 - Moyenne de l'intensité de maladie (échelle de 0-5) sur les feuilles de 6 géotypes de pois, 10 jours après l'inoculation par des souches de *M. pinodes* (moyenne de 10 souches) et *P. medicaginis* var. *pinodella* (moyenne de 6 souches), d'après Onfroy *et al.* (1999).

Les premiers symptômes apparaissent sur les plantes après 36 et 48 heures d'incubation. Les résultats (Tableau 1) montrent toujours le même ordre de classement des génotypes que ce soit vis à vis de *M. pinodes* ou de *P. medicaginis* var *pinodella*. Les lignées DP, FP et JI 252 présentent un niveau élevé de résistance partielle; la variété Solara est modérément sensible et la lignée JI 296 est particulièrement sensible.

2.2. Tests de criblage sur stipules maintenus en survie (Figure 1)

A 2 jours après inoculation, tous les génotypes sont dans la phase d'apparition des ponctuations, les premières ponctuations apparaissant 30 à 40 heures après l'inoculation. Un léger retard est observé chez les génotypes moins sensibles

A 3 jours d'incubation à 20°C, deux phases du cycle sont observées simultanément : entrée dans la phase d'extension des lésions pour les génotypes plus sensibles (JI296 et Solara) à partir de la coalescence des ponctuations, tandis que les moins sensibles sont encore dans leur phase d'installation.

A partir de 5 jours après inoculation, tous les génotypes sont dans une phase active d'extension des lésions. La différence de sensibilité des génotypes observée pendant la phase d'installation est toujours nettement visible. Le prolongement des notations et donc la durée du test, sont limités par la trop petite taille des stipules de certains génotypes (en particulier JI252, Melrose et ensuite FP).

Les fructifications sous forme de pycnides apparaissent pendant la phase d'extension des lésions, environ 6 jours après l'inoculation sur les génotypes plus sensibles, et un à deux jours plus tard sur les moins sensibles.



Figure 1 : Effet de trois doses de spores de *M. pinodes* (D1=500, D2=1000, D3=2000 spores par goutte) sur la réaction des génotypes JI 296 et DP, observée après 10 jours d'incubation.

3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces deux tests de criblage sont largement utilisés par les sélectionneurs du pois et par les généticiens : pour détecter ou caractériser des sources de résistance, cribler des lignées recombinantes, analyser la génétique de la résistance. Ils ont également été adaptés pour l'étude du comportement de la plante modèle *Medicago truncatula* vis à vis de ces parasites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Onfroy C., Tivoli B., Corbière R., Bouznad Z. (1999). Cultural, pathogenic and molecular variability of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma medicaginis* var *pinodella* isolates from dry pea in France. *Plant pathol.*, 48 : 218-229.
- Tivoli B, Béasse C, Lemarchand E and Masson E (1996) Effect of Ascochyta blight (*Mycosphaerella pinodes*) on yield components of single pea plant under field conditions. *Annals of Applied Biology* 129: 207-216