

## EVALUATION DU COMPORTEMENT DE GENOTYPES DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DE LA FORME SEXUEE DE *phytophthora infestans*, AGENT DU MILDIOU

Roselyne Corbière, Isabelle Glais<sup>1</sup>

*Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre, est un Oomycète hétérothallique, avec deux types de compatibilité sexuelle, A1 et A2. La présence simultanée de souches de type opposé, sur une même plante, peut conduire à la formation d'oospores, organes de la reproduction sexuée, qui constituent une forme de conservation à long terme de l'inoculum. La résistance des génotypes de pomme de terre est généralement évaluée vis-à-vis de la forme asexuée de *P. infestans*, mais la gestion des résistances doit aussi prendre en compte le comportement des génotypes vis-à-vis de la forme sexuée de *P. infestans*.

Le comportement des génotypes est estimé, en conditions contrôlées, sur folioles détachées, inoculées avec un couple d'isolats A1/A2. La quantité d'oospores produites est le critère retenu pour déterminer la résistance ou la sensibilité des génotypes à la forme sexuée de *P. infestans*.



Oospore, diamètre d'environ 35 µm, observée au microscope (x 1000)

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Préparation du matériel végétal et de l'inoculum

La culture en serre des génotypes de pomme de terre, ainsi que la préparation des folioles et celle des suspensions de sporanges de *P. infestans* sont présentées dans l'article « Inoculation en conditions contrôlées de folioles détachées de pomme de terre, pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *P. infestans* » (Glais et Corbière, 2005).

Inclure dans le test un génotype sensible, comme Bintje, qui sert de témoin positif.

#### Isolements de *P. infestans*, à partir de nécrose foliaire ou de tige malade

Les isollements sont réalisés sur tubercules de pomme de terre d'une variété sensible, par exemple Bintje.

- couper des tubercules, préalablement lavés et désinfectés (ou pelés), en tranches épaisses, puis les recouvrir de papier filtre pour absorber l'humidité.
- placer ces rondelles dans des boîtes plastiques hermétiques, sur un tampon éponge humidifié.
- prélever de petits fragments de tissu malade, à la lisière de la nécrose, avec un scalpel stérile.
- déposer 2 fragments sur chaque rondelle, un à chaque extrémité (face sporulante de la nécrose au contact du tubercule).
- bien fermer les boîtes et mettre à incuber à 15°C, pendant environ 5 jours.
- dès qu'un amas de mycélium s'est formé, le prélever stérilement, en évitant de toucher le tubercule et le déposer sur milieu solide petit pois contenant des antibiotiques (ampicilline 200 mg/L, rifamycine 30 mg/L ; benlate 10 mg/L, piramycine 0,4 mL/L).
- mettre à incuber à 15°-18°C.
- lorsque les colonies ont un peu poussé, les repiquer à nouveau sur milieu.

<sup>1</sup> Centre INRA de Rennes - UMR BiO3P – BP 35327 – F 35653 LE RHEU Cedex – [corbiere@rennes.inra.fr](mailto:corbiere@rennes.inra.fr) – [iglais@rennes.inra.fr](mailto:iglais@rennes.inra.fr)

## 1.2. Choix des isolats A1 et A2 pour constituer les couples

- inoculer des folioles des génotypes à tester avec des isolats A1 et A2 individuellement, pour choisir ceux qui causent des lésions sur la majorité des génotypes.
- tester la fertilité de couples A1/A2, en confrontant les isolats sur milieu de culture. Sélectionner de préférence les couples produisant un nombre important d'oospores.

## 1.3. Inoculation des folioles et incubation

- préparer deux suspensions de sporanges (à  $5.10^4$  spores/mL), l'une d'un isolat A1 et l'autre d'un isolat A2.
- mélanger en proportion égale les deux suspensions dans un tube à hémolyse.
- déposer, au centre de chaque foliole (préalablement disposée, face inférieure vers le haut, dans une boîte de Pétri avec de l'eau gélosée), une goutte de 20  $\mu$ L de la suspension d'inoculum (mélange de sporanges A1 et A2).
- faire cinq répétitions : inoculer cinq folioles par génotype analysé et par couple d'isolats.
- ranger les boîtes de Pétri dans des grandes boîtes fermées, en plastique transparent.
- mettre les folioles à incuber, en enceinte climatisée 21 jours, à 15°C (photopériode de 16 h).

### Détermination du type de compatibilité sexuelle des isolats

Le test est réalisé sur milieu petits pois, en boîte de Pétri, par confrontation de l'isolat à tester avec une souche de référence A1 et une A2.

- déposer dans trois boîtes, 2 explants à 1,5 cm de distance : isolat à tester + A1, isolat + A2 et isolat avec lui-même
- mettre à incuber à 15°C, pendant 12 à 15 jours.
- observer la présence des oospores, à la ligne de confrontation, sous loupe binoculaire (X 40), en retournant les boîtes de Pétri.
- l'isolat testé est A1 si des oospores sont observées lors de la confrontation avec A2, mais pas avec A1 ; l'isolat est A2, dans le cas contraire. Si des oospores sont observées dans les deux cas, il s'agit d'un mélange d'isolats ou d'un isolat autofertile.

## 1.4. Révélation des oospores (technique adaptée de Cohen *et al.*, 1997)

- plonger les folioles dans un bain d'éthanol bouillant pendant 5 min, afin de les rendre translucides, puis les rincer dans un bain d'eau.
- découper chaque foliole, avec un scalpel, dans le sens de la longueur après l'avoir déposée sur une surface plane et dure, par exemple une lame de microscope (attention à ne pas déchirer la foliole qui est devenue très fragile).
- déposer avec précaution chaque demi-foliole sur une lame de microscope et la recouvrir immédiatement d'environ 1 mL d'une solution de glycérol à 50 % dans de l'eau stérile.
- monter la foliole entre lame et lamelle (L = 65 mm ; l = 24 mm), sans plisser la foliole.
- écraser légèrement la foliole, en appuyant de façon homogène sur la lamelle, avec une gomme par exemple.

## 1.5. Système de notation

- dénombrer les oospores sous le microscope, au grossissement total d'environ 100, dans deux champs, situés autour du point d'inoculation. L'observation est réalisée sur cinq demi-folioles par génotype et par couple d'isolats (seule une demi-foliole est observée, pour chacune des folioles inoculée).
- si le nombre d'oospores, autour du point d'inoculation, est très faible à nul, vérifier la présence ou l'absence d'oospores sur l'ensemble de la foliole.

## 1.6. Elimination des déchets

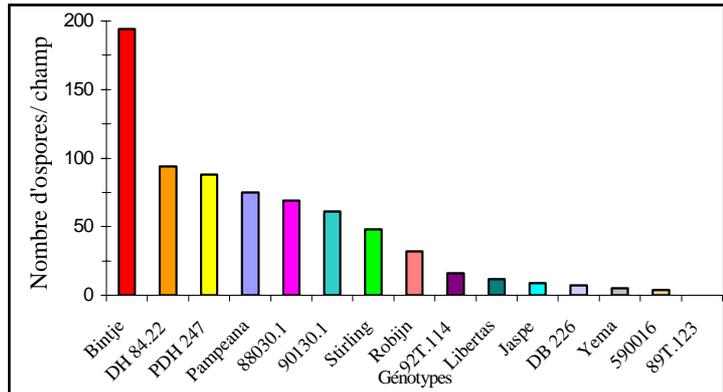
- incinérer obligatoirement les isolats de type sexuel A2, les isolats étrangers, les boîtes de confrontation et les folioles inoculées (les isolats A2 étant très rares en France).
- éliminer les isolats français A1, ainsi que l'alcool, selon les normes de l'Unité.

**2. RESULTATS ET INTERPRETATION**

Avec cette technique, les oospores sont bien visualisées dans les tissus, comme le montre la photographie ci-dessous. La production d'oospores est très variable selon les génotypes : elle est importante chez Bintje, faible à nulle dans certains autres, ce qui permet de déterminer leur comportement vis-à-vis de la forme sexuée.

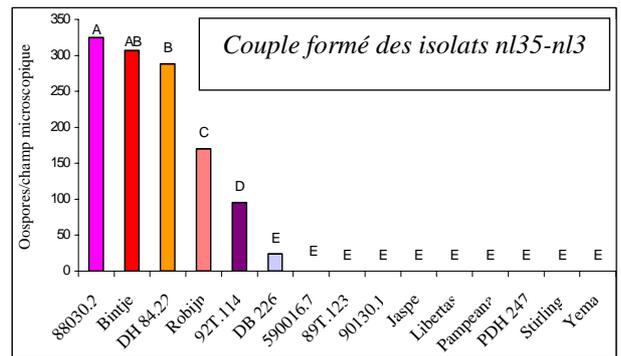
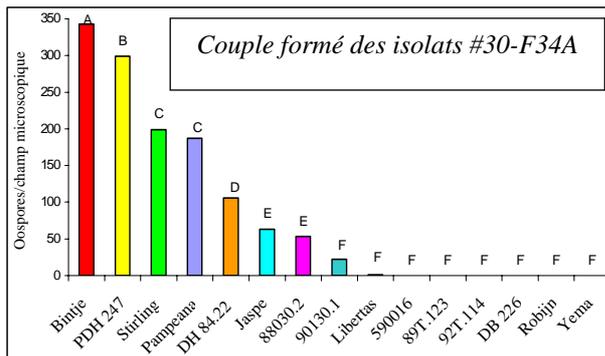


*Oospores observées au microscope (x100) dans les tissus foliaires décolorés.*



*Nombre moyen d'oospores, par champ microscopique et par génotype testé avec sept couples d'isolats A1/A2.*

Cependant, il est important de tester les génotypes avec plusieurs couples, car leur classement varie selon le couple choisi, comme l'illustrent les deux graphiques ci-dessous.



### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De grandes différences dans le comportement des génotypes vis-à-vis de la forme sexuée de *P. infestans* sont observées. Certains, partiellement résistants au champ, se révèlent sensibles à la forme sexuée ; d'autres montrent un bon niveau de résistance aux deux formes de reproduction. Comme la réponse des génotypes est spécifique du couple considéré, on pourrait envisager de réaliser ce test avec plusieurs couples en mélange. La prise en compte de la forme sexuée de *P. infestans* dans des programmes de sélection est indispensable, car les oospores peuvent jouer un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie (conservation de l'inoculum dans le sol) ; elles favorisent l'apparition de nouvelles populations de l'agent pathogène, due au brassage génétique, induisant ainsi des risques d'érosion des résistances.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cohen Y, Farkash S, Reshit Z, Baider A (1997) Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology* 87 :191-196.
- Glais I, Corbière R (2005) Inoculation en conditions contrôlées de folioles détachées de pomme de terre, pour déterminer l'agressivité et la virulence d'isolats de *P. infestans*. Cahier des Techniques de l'INRA.