

Caractérisation des pathotypes de Hernie des Crucifères en France et mise au point d'un test pour l'évaluation de la résistance des variétés de colza.

Orgeur G.¹, Jestin C.², Delaunay A.¹, Lebourg D.¹, Bagot P.³, Corbel A.L.³, Perrot S.¹,
Manzanares- Dauleux M.J.⁴, Grimault V.¹

(1) Laboratoire de Pathologie, GEVES, 25 rue Georges Morel, CS 90024, 49071 Beaucouzé,- France.

(2) Terres Inovia, Avenue Lucien Brétignière, Campus de Grignon F-78850 Thiverval Grignon- France.

(3) Secteur d'Etude des Variétés, GEVES, Unité expérimentale de l'Anjouère, 49370 La Pouèze – France

(4) AGROCAMPUS OUEST, UMR 1349, IGEPP, 65 rue de Saint Briec, CS 84215, 35042 Rennes- France

Correspondance : geoffrey.orgeur@geves.fr; perrot.sophie@geves.fr; valerie.grimault@geves.fr

Résumé

Plasmodiophora brassicae est l'agent causal de la hernie, une des principales maladies des Brassicacées. Ce parasite tellurique provoque la formation de galles sur le système racinaire de la plante hôte. Ces galles perturbent gravement l'alimentation hydrique et minérale de la plante entraînant des pertes de rendement. Afin de développer un test d'évaluation de la résistance des variétés de colza à *P. brassicae*, une étude visant à identifier et localiser les différents pathotypes présents en France a été initiée. L'échantillonnage a eu lieu dans les principales zones de production du colza (le Centre, la Bourgogne, la Lorraine et le Poitou-Charentes) et des crucifères légumières (Bretagne). Au total, 70 échantillons ont été caractérisés. Les pathotypes P1 à P6 ont été identifiés sur tout le territoire dans des proportions variables avec une forte présence des pathotypes P1, P2 et P3. Plus de la moitié des isolats ont été identifiés comme pathotype P1. De nombreux isolats caractérisés comme pathotype P1, P2 et P3 ont été capables de contourner la résistance de la variété « Mendel » (variété résistante de référence). Suite à ces résultats, un set d'isolats appartenant aux pathotypes majoritaires et représentatifs du territoire français P1, P2 et P3 a été sélectionné pour l'évaluation de la résistance des variétés de colza à la hernie. Un protocole complet d'évaluation de la résistance a été proposé au CTPS. Ce protocole est actuellement utilisé au GEVES dans le cadre de l'inscription des variétés au catalogue officiel.

Mots-clés : *P. brassicae*, *B. napus*, étude épidémiologique, pathotypes, test de résistance.

Abstract: Clubroot disease: characterization of pathotypes and development of resistance test to evaluation winter oil seed rape varieties

Plasmodiophora brassicae causes the clubroot disease in Brassica crops. This soil-borne pathogen is responsible for the development of galls on the root system of the host plant, disturbing water and mineral nutrition, which leads to significant yield losses. In order to develop a protocol to evaluate the resistance of winter oilseed rape (WOSR) varieties to *P. brassicae*, the distribution and the characterization of the *P. brassicae* pathotypes on the French cultivated territory were studied. Field sampling was performed in the main production areas of WOSR (Centre, Bourgogne, Lorraine and Poitou-Charentes) and of cruciferous vegetables (Bretagne). A total of 70 samples was analyzed. Pathotypes P1 to P6 were identified, with P1, P2 and P3 being the most frequent ones. More than half of the isolates were identified as P1. Several isolates belonging to pathotypes P1, P2 and P3 were able to overcome the resistance « Mendel » (resistant variety for control and reference). Isolates from the most frequent pathotypes observed in France (P1, P2 and P3) were chosen in order to test WOSR

varieties for resistance to *P. brassicae*. A complete protocol to evaluate resistance has been proposed to the French variety registration committee. This protocol is now currently used by GEVES to evaluate resistance of WOSR varieties for registration.

Keywords: *P. brassicae*, *B. napus*, epidemiological survey, pathotype, resistance test.

Introduction

La hernie des Crucifères est une maladie tellurique causée par un parasite obligatoire¹, *Plasmodiophora brassicae*, dont les plantes hôtes appartiennent pour la plupart à la famille des Brassicacées. Certaines de ces espèces présentent une grande importance économique, comme le colza oléagineux d'hiver (Dixon, 2009). La maladie est caractérisée principalement par le développement de galles sur le système racinaire. Elles perturbent fortement l'alimentation hydrique et minérale de la plante (Manzanares-Dauleux *et al*, 2001).

Une forte humidité du sol favorise la colonisation des racines de la plante hôte par les spores de *P. brassicae*. Au cours de leurs développements, les racines vont présenter de petits renflements qui grossissent rapidement et donner naissance à une masse hypertrophiée ou galle. Au niveau aérien, la plante infectée présente un feuillage sénescant, aboutissant à un flétrissement et rabougrissement. La hernie cause des pertes en termes de rendement (de quelques quintaux/ha jusqu'à la destruction complète de la culture) et de qualité (baisse de la teneur en huile, et présence de chlorophylle dans les graines pouvant provoquer des difficultés de raffinage de l'huile). Cette maladie est présente dans environ 20% de l'ensemble des zones de production à l'échelle du territoire où les plantes hôtes sont cultivées, et particulièrement dans les sols acides (Jung, 2004).

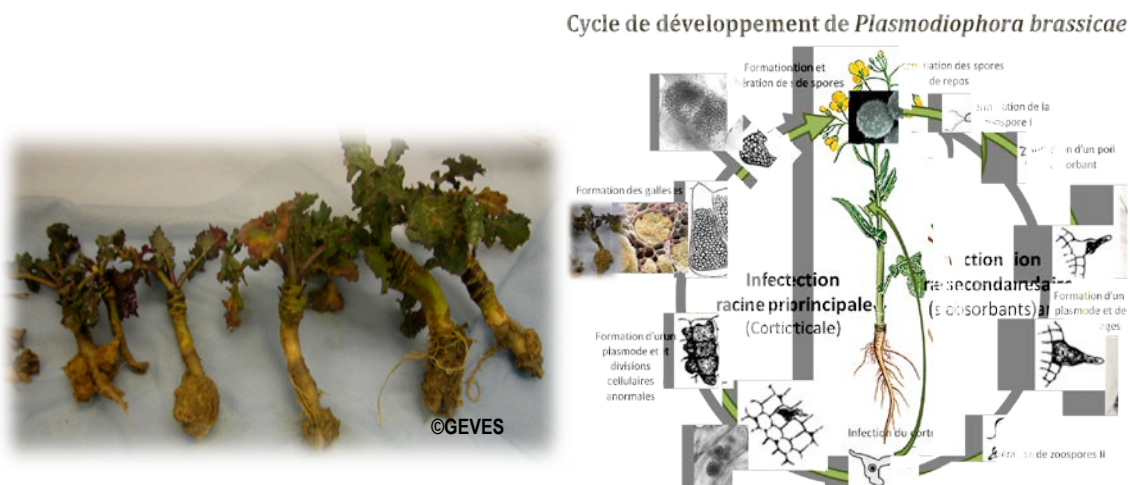


Figure 1 : Symptômes sur plants de colza contaminés et cycle de développement de *P. brassicae* (adapté de Kageyama *et al.*, 2009). Réduction de la croissance végétative et développement de galles sur racines

Parmi les principales zones de production du colza en France, le Centre, la Bourgogne, la Lorraine et le Poitou-Charentes, et la Bretagne pour les crucifères légumières, ont été durement touchées par la hernie, ces dernières années. La hernie a également été répertoriée dans certaines zones de production

¹ Parasite capable de se développer uniquement sur les tissus vivants de l'hôte. Ne pousse pas sur un milieu nutritif artificiel.

comme l'Ain et la Normandie (Orgeur et Jestin, 2014). A l'échelle européenne, la hernie affecte des surfaces de production de colza beaucoup plus importantes qu'en France, en particulier au Royaume Uni, dans le nord de l'Allemagne et dans le nord de la Pologne (Diedrichsen, 2008).

Très peu de méthodes de lutte efficaces contre la hernie existent. L'utilisation de variétés résistantes couplée aux pratiques culturales (chaulage, rotation...) constitue le moyen le plus efficace pour combattre la maladie. Aujourd'hui, la majorité des cultivars de colza est sensible à la hernie. Quelques variétés ont été commercialisées et présentées comme ayant un bon comportement face à la hernie (Mendel, Tosca,...) (Jung, 2004). Ces dernières années, la variété « Mendel » a été principalement utilisée comme moyen de lutte. Elle s'est montrée efficace dans la plupart des zones infestées par la hernie. Cependant, en raison du caractère oligogénique de la résistance et de l'utilisation répétitive de cette variété dans les zones infestées, un risque de contournement est à craindre. C'est ce qui a été remarqué, effectivement, dans plusieurs pays européens (Some *et al*, 1996). Les établissements de recherche et les sociétés semencières travaillent depuis plusieurs années, à l'échelle de l'Europe pour créer et proposer de nouvelles variétés résistantes issues de différents géniteurs sources. Jusqu'à présent aucune procédure officielle de caractérisation variétale de la résistance à la hernie n'a été enregistrée. Pour caractériser de nouvelles variétés qui pourraient être résistantes à la hernie, il s'est avéré nécessaire d'élaborer un test standardisé d'évaluation variétale. Pour répondre à cet objectif, un partenariat a été initié entre acteurs publics et privés : GEVES, Terres Inovia (Cetiom), INRA, UCATA et des semenciers (NPZ, Limagrain, RAGT, Syngenta). Dans un premiers temps, le risque « hernie » et les pathotypes présents sur le territoire français ont été caractérisés. Le choix de populations pathogènes représentatives des zones de productions, et de variétés de référence, ont permis dans un second temps d'élaborer et de proposer à la section CTPS un test d'évaluation du colza face à *P. brassicae* en conditions contrôlées.

Matériel et Méthodes

Evaluation du risque hernie sur le territoire et Caractérisation des pathotypes

Un questionnaire en ligne a été mis en place en 2011 par Terres Inovia (Cetiom) (www.terresinovia.fr/hernie) afin de répertorier les principales zones de production de colza infestées par la hernie. Cette enquête a ainsi facilité la géo-localisation des parcelles touchées par la hernie et la communication avec les coopératives et les agriculteurs pour la réalisation des prélèvements. Deux types d'échantillonnage ont été réalisés : prélèvement de galles sur des plantes de colza infectées et prélèvements de sol dans les parcelles. Le plan d'échantillonnage représentait différentes situations pédo-climatiques et contextes culturels tout en ciblant les zones de production de colza : le Centre, la Lorraine, le Grand Ouest, la Bourgogne/Franche Comté, le Poitou-Charentes, l'Île de France, et le Sud-ouest. L'ensemble des populations a été multiplié sur un témoin sensible (chou chinois) par ré-inoculation ou par piégeage directement sur sol.

En parallèle, au GEVES, un test a été mis au point, selon le protocole rapporté en Annexe 1, pour caractériser les pathotypes de *P. brassicae*. Une gamme d'hôtes différentiels décrite par Somé *et al.* (1996) a été utilisée dans cette étude, pour caractériser jusqu'à 8 pathotypes différents (P1 à P8). Elle est composée d'un génotype sensible *Brassica napus* cv Granaat (chou chinois en tant que témoin sensible : ECD 5) et de 3 génotypes (*Brassica napus* cv Nevin (ECD 6), cv Wilhelmsburger (ECD 10) et cv Brutor), portant différentes résistances aux populations de *P. brassicae* (Tableau I) La variété « Mendel » a également été intégrée à cette gamme d'hôtes en tant que témoin résistant.

Validation et Proposition du protocole d'évaluation variétale

A partir d'expérimentations préliminaires, un premier protocole a été proposé aux membres du projet, puis testé au sein de deux laboratoires (GEVES et CETIOM) afin de vérifier la répétabilité et la reproductibilité du protocole. L'évaluation du protocole a été portée sur un panel de variétés de colza

(résistantes et sensibles) en y incluant le set d'hôtes différentiels et la variété « Mendel ». Les isolats de *P. brassicae* ont été choisis sur différents critères : représentativité des zones de production française, agressivité sur témoin sensible supérieur à 60% et faible dispersion d'agressivité sur la gamme d'hôtes différentiels, dispersion géographique, populations contournant ou non la variété « Mendel ».

Après comparaison des résultats, associée à des expérimentations complémentaires menées par le GEVES pour conforter les résultats (expérimentations dont les résultats ne sont pas montrés ici), un protocole final a pu être proposé à la section CTPS.

Tableau I : Détermination du pathotype des isolats de *P. brassicae* sur la gamme d'hôtes différentiels.

Pathotypes	Hôtes différentiels <i>B. napus</i>			Témoin sensible
	cv. Nevin (ECD6)	cv. Wilhelmsburger (ECD10)	cv. Brutor	Chou Chinois (ECD5)
P1	+	+	+	+
P2	+	-	+	+
P3	-	-	+	+
P4	-	-	-	+
P5	-	+	+	+
P6	+	-	-	+
P7	-	+	-	+
P8	+	+	-	+

+ réaction hôte sensible ; - réaction hôte résistant

Résultats et Discussion

Evaluation du risque hernie sur le territoire

Caractérisation des pathotypes

L'enquête en ligne a permis de référencer les différentes zones de production de colza infestées par la hernie (Centre, Bourgogne, Lorraine, Poitou-Charentes, Normandie...). La communication ciblée sur le colza explique probablement le peu de retour dans des régions comme la Bretagne où cette culture est peu présente avec néanmoins une forte problématique « hernie ». Les différents prélèvements ont été réceptionnés soit sous forme de galles (33 prélèvements dont 20 issues de variétés connues de colza), soit sous forme de sol contaminé pour piégeage (37 prélèvements). Un total de 70 échantillons provenant de différentes régions (Tableau II) a été analysé pour déterminer les pathotypes en présence. Six pathotypes (P1 à P6) sur les 8 décrits ont été mis en évidence, et ce en proportion variable (Tableau II, Figure 2 et 3).

Le détail des caractérisations réalisées par région est présenté dans le Tableau II. Sur l'ensemble des régions, les pathotypes P1, P2 et P3 ont été observés dans 91% des cas. Ces trois pathotypes sont très présents dans les régions pour lesquelles il y a beaucoup d'échantillons (Centre, Lorraine et Grand Ouest). Pour les régions pour lesquelles il y a moins d'échantillons, les pathotypes P1 et P2 sont également les plus fréquents (Poitou-Charentes, Bourgogne et Ile de France). Le pathotype P1 est majoritaire sur le territoire (Figure 3), avec 53% des isolats identifiés (P1 + P1*), et plus particulièrement dans la région Centre, la région Lorraine et sur le Grand Ouest (Normandie, Pays de la Loire et Bretagne). La plupart des isolats identifiés P1 ont infecté la variété résistante de référence, « Mendel » (voir 1-b Tableau III). La présence d'isolats appartenant à ce pathotype P1 est problématique pour les agriculteurs du fait de sa capacité à contourner les gènes de résistance disponibles actuellement ainsi que par sa présence en proportion majoritaire au sein de la population échantillonnée sur le territoire dans le cadre de cette étude.

Figure 2 : Répartition des pathotypes de *Plasmodiophora brassicae* sur le territoire français.

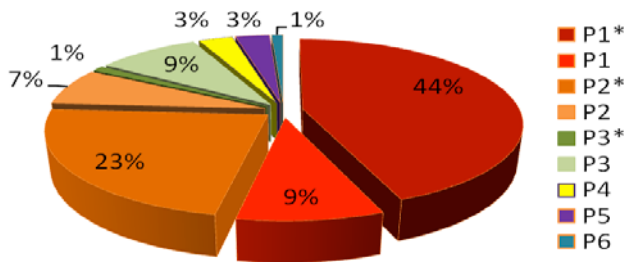
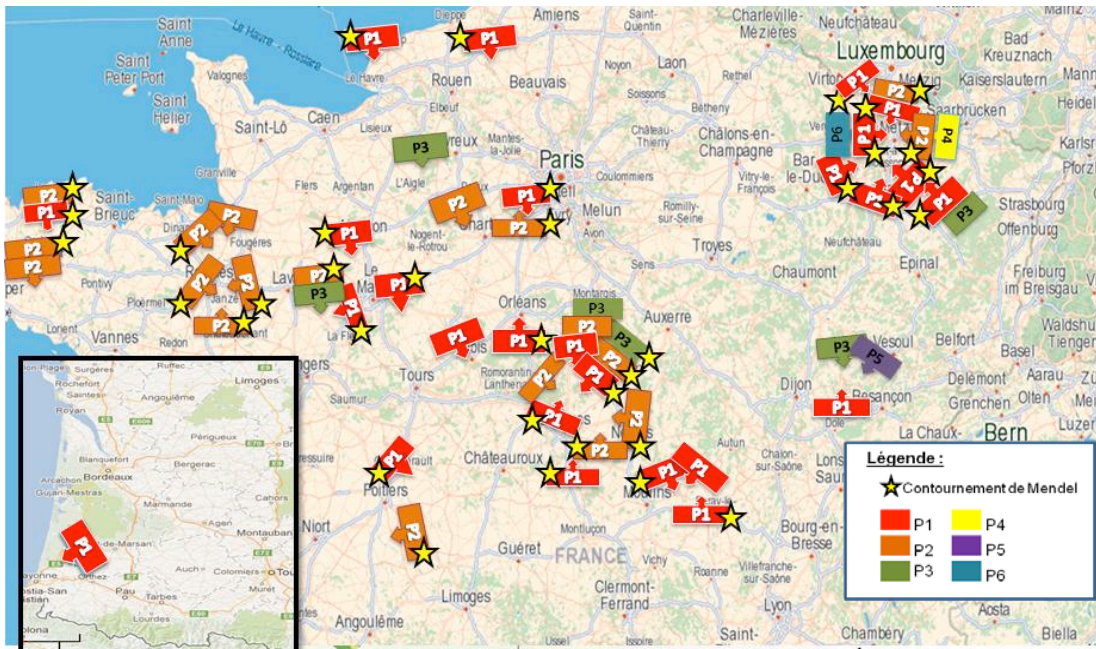


Figure 3 : Fréquence des pathotypes sur le territoire. (P* : Pathotype en capacité de contourner la résistance de la variété « Mendel »).

Tableau II : Fréquence des pathotypes dans les bassins de productions du colza. (P* : Pathotype en capacité de contourner la résistance de la variété « Mendel »).

	Nb d'échantillons	Lorraine	Centre	Bourgogne	Grand-Ouest	Poitou Charente	Aquitaine
P1*	31	59%	50%	22%	41%		
P2*	16	18%	28%		41%		
Total P1*/P2*	47	77%	78%	22%	82%		
P1	6		11%	33%		50%	100%
P2	5				9%	50%	
P3	6	6%	6%	22%	9%		
Total P1*/P2*/P1/P2/P3	17	6%	17%	55%	18%	100%	100%
Total P1*/P2*/P1/P2/P3	64	83%	95%	77%	100%	100%	100%
P4	2	12%					
P5	2			22%			
P3*	1		6%				
P6	1	6%					
Total P4/P5/P6/P3*	6	18%	6%	22%			

Le pathotype 2 est aussi fortement présent sur l'ensemble du territoire. Identifié en grande partie dans la région Bretagne, mais également sur le Centre et le Poitou-Charentes, une majorité des isolats de ce pathotype s'est également montrée capable de contourner la résistance de la variété « Mendel » (Tableau II, III). D'autres pathotypes ont été identifiés de manière ponctuelle comme le P4 et P6 en Lorraine et le P5 en Bourgogne (Tableau II).

Les résultats obtenus montrent finalement une grande hétérogénéité intra- (non montrée ici) et inter-parcellaire (mélange de populations/pathotypes de *P. brassicae* dans une même parcelle et entre parcelles voisines) qui est plus importante que l'hétérogénéité inter-régionale. En conséquence, il apparaît clairement que le choix variétal devra être raisonné à l'échelle de la parcelle.

Comportement des pathotypes sur la variété résistante de référence, « Mendel ».

Parmi les pathotypes identifiés, certains isolats ont été capables de contourner la résistance « Mendel » (Tableau III).

Tableau III : Comportement des différents pathotypes sur la variété « Mendel ».

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
Nb d'isolats capables de contourner la résistance de « Mendel » (noté P*)	31	16	1	0	0	0	0	0
Nb d'isolats incapables de contourner la résistance de « Mendel » (noté P)	6	5	6	2	2	1	0	0
Total	37	21	7	2	2	1	0	0
Résistance de « Mendel » contournée	84%	76%	14%	0%	0%	0%	0%	0%
Résistance de « Mendel » non contournée	16%	24%	86%	100%	100%	100%	0%	0%

Concernant les pathotypes P1, 84% des échantillons analysés ont contourné la résistance de « Mendel » (31 sur 37). Les échantillons identifiés P2 ont, dans 76% des cas, contourné la résistance de « Mendel » (16 sur 21) tandis que 14 % des pathotypes P3 (1 sur 6) ont contourné la résistance de cette variété. Aucun contournement n'a été observé pour les pathotypes P4, P5 et P6. Cependant, le nombre d'échantillons analysés est largement inférieur pour ces 3 derniers pathotypes.

L'existence d'une relation entre la présence d'un pathotype et la variété présente au moment de l'échantillonnage a été recherchée pour tenter d'expliquer la présence des pathotypes contournant la résistance de « Mendel » (Tableau IV).

Tableau IV: Type de variétés à l'origine des prélèvements.

	Issue de variété dite sensible		Issue de variété dite résistante		Issue de variété non déterminée		Total d'échantillons
	Pourcentage	Nb d'échantillons	Pourcentage	Nb d'échantillons	Pourcentage	Nb d'échantillons	
P1*	45%	14	32%	10	23%	7	31
P1	50%	3	33%	2	17%	1	6
P2*	63%	10	6%	1	31%	5	16
P2	80%	4	0%	0	20%	1	5
P3*	100%	1	0%	0	0%	0	1
P3	50%	3	17%	1	33%	2	6
P4	0%	0	0%	0	100%	2	2
P5	0%	0	0%	0	100%	2	2
P6	0%	0	0%	0	100%	1	1

Sur la base des variétés connues au moment de l'échantillonnage, la moitié des pathotypes P1, contournant la résistance de la variété « Mendel » (P1+) provenaient de variétés sensibles (45% soit 14 échantillons sur 31). Les pathotypes P1- étaient issus à 50 % de variétés dites sensibles (3 échantillons sur 6) et à 33 % de variétés dites résistantes (2 échantillons sur 6). Cette observation a été confirmée pour les pathotypes P2+, où 63% étaient issus de variétés sensibles (10 échantillons sur 16) tandis que 6 % étaient issus de variétés dites résistantes (1 échantillon sur 16). En l'absence d'informations sur l'historique de la parcelle, il n'a pas été possible de conclure à un lien entre la sélection d'un pathotype et la présence d'une variété spécifique de colza. Dans l'hypothèse de poursuivre des travaux sur la durabilité de la résistance, il serait intéressant de connaître l'ensemble des pratiques culturales et itinéraires techniques d'un ensemble de parcelles, avec et sans pathotype contournant « Mendel », afin d'identifier les facteurs susceptibles d'agir sur la durabilité des gènes de résistance.

Validation et Proposition du protocole

Le ring test organisé entre le GEVES et Terre Inovia (CETIOM) a permis de confirmer l'identité des populations de certains pathotypes stables (P1, P2 et P3). En revanche, certains isolats correspondant à des pathotypes moins stables n'ont pas été confirmés (P2*, P3*, P6). Au vu de ces résultats, les pathotypes problématiques ont été multipliés successivement dans le but de limiter la dispersion liée à l'agressivité de ces isolats. L'identité de ces échantillons a pu être confirmée à travers ces expérimentations complémentaires.

Les résultats ont aussi mis en exergue la difficulté d'interpréter le comportement d'une variété. Celui-ci est basé sur un indice de pathogénicité (IP) dont le seuil est fixé à 25%. Selon les situations, plusieurs génotypes ont présenté un IP très proche de 25%. Dans ce cas, une erreur d'interprétation est envisageable. Pour limiter les biais, il a été décidé d'augmenter le nombre de plantes testées, passant de 16 (lors de la caractérisation et du panel) à 30 plantes par variété et par pathotype. De plus, l'échelle de notation a été condensée en passant de 6 classes (de 0 à 5) à 5 classes (0 à 4) sans modifier le seuil de notation dans l'objectif d'une meilleure discrimination entre les variétés sensibles et résistantes.

A partir de ces résultats, un protocole d'évaluation variétale du colza face à *P. brassicae* a été proposé et validé à la section CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection des plantes cultivées) (Annexe 1). L'étude du comportement de ces variétés sera réalisée par le GEVES sur un panel de pathotypes obligatoires : P1*, P1, P2*, P3. Cette carte d'identité permettra d'évaluer le comportement des variétés testées sur les différents pathotypes, majoritairement présents sur le territoire et d'évaluer le niveau de résistance face à des pathotypes capables de contourner le mécanisme de résistance des variétés résistantes de référence de type « Mendel ». Afin de valider l'identité des pathotypes et le comportement des variétés testées, la gamme d'hôtes différentiels (ECD6, ECD10, Brutor) ainsi que les témoins sensibles (ED5 et Pamela) et résistants (Mendel et Sy Alister) de références seront associés à chacun des tests. L'interprétation du comportement des variétés sera réalisée sur deux ans, à raison d'un test par année. En cas de doutes sur l'interprétation des résultats, une troisième année de test pourra être proposée.

Conclusion

Cette étude a permis de mettre en avant la présence de 5 pathotypes (P1 à P6) sur le territoire français, en particulier les pathotypes P1, P2 et P3. Plusieurs isolats ont montré leur capacité à contourner la résistance de la variété « Mendel », confirmant les suspicions évoquées depuis plusieurs années en France (Orgeur *et al.*, 2015).

Afin de valoriser le progrès génétique obtenu pour la résistance à la hernie, un protocole d'évaluation de la résistance variétale a été proposé à la section CTPS. A partir de l'automne 2014, chaque obtenteur pourra, à sa demande, réaliser via le GEVES une évaluation de leur variété de colza vis-à-vis d'un set

minimum de pathotypes considérés comme représentatifs du territoire français (P1*, P1, P2*, P3) ou d'une gamme élargie de pathotypes. L'interprétation du comportement des variétés sera réalisée à l'issue de deux années d'expérimentations en conditions contrôlées, à raison d'un test par an ; un troisième test sera susceptible d'être effectué pour conforter le résultat. Cette carte d'identité du colza vis-à-vis de la hernie fournira des éléments de choix variétal pour l'agriculteur en fonction des pathotypes présents sur le territoire, y compris face à ceux contournant la variété résistante de référence « Mendel ».

Remerciements

Le GEVES tient à remercier l'ensemble des partenaires qui ont permis la réalisation des prélèvements sur l'ensemble du territoire : Terre Inovia (CETIOM), UCATA, le Secteur d'Etude des Variétés (GEVES), Semences de France, SYNGENTA, LIMAGRAIN, NPZ, RAGT, Chambres d'Agriculture dont celles du 22, 29, 53 et 35, AgMELIO et TRISKALIA. Merci également à l'INRA de Rennes pour la fourniture des semences de HD (ECD6, ECD10 et brutor) et du témoin sensible (ECD5) ainsi qu'au SEV (GEVES) pour la fourniture des semences du témoin résistant « Mendel » permettant la réalisation de ce projet. Pour finir l'ensemble des partenaires de ce projet CASDAR (GEVES, Terre Inovia (CETIOM), INRA, UCATA, NPZ, RAGT, Syngenta, Limagrain) remercie le ministère en charge de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité, et de l'aménagement du territoire (avec la contribution financière du compte d'affectation spéciale « Développement agricole et rural ») pour sa contribution financière permettant la bonne réalisation de ce projet.

Références bibliographiques

- Diedrichsen E., 2008. Clubroot in *Brassica napus*- A European Perspective. Canola Industry Meeting, Saskatoon, December 2008.
- Dixon G.R., 2009. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot disease. *J Plant Growth Regul* 28, 194-202.
- Jung L., 2004. Hernie des crucifères : les moyens de lutte s'étoffent. Edition CETIOM Conceilis régions ouest et est, Juin 2004.
- Kageyama K., Asano T., 2009. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Plant Growth Regulation* 28, 203-211 DOI: 10.1007/s00344-009-9101-z
- 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 Pathol* 50, 165-173.
- Orgeur G., Jestin C., 2014. Hernie du colza, se protéger d'une menace croissante, *Perspectives agricoles* 415, 24-26.
- Orgeur G., Jestin C., Manzanares M., Grimault V., 2015. Hernie sur colza : la résistance variétale peut enfin être évaluée. *Phytoma* 684, 14-17.
- Some 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 Pathol* 45, 432-439.

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)

Annexe 1 : Protocole de test de résistance des crucifères à *Plasmodiophora brassicae***Conservation de la souche de *Plasmodiophora brassicae***

Une multiplication des pathotypes a été réalisée sur la variété, pe-tsaï (Chou chinois-ECD5).

Les galles, développés sur cette variété pe-tsaï, ont été conservées au congélateur à -20°C.

Protocole**Stade de développement des plantes**

7 jours avant l'inoculation, les semences sont mises en condition de germination dans des plaques de 24 godets à raison d'une semence par godet. Une semence tous les 6 godets peut être ajoutée pour pallier un éventuel manque lors de la germination. Les semences sont placées dans un substrat (sable + terreau), et placées en module climatique à 23 °C, 80 % d'hygrométrie, 12 h de photopériode. Les godets sont placés dans des plateaux.

Témoin sensible caractérisation	Chou chinois (ECD5)
HD 1	ECD6
HD 2	ECD10
HD 3	cv. Brutor
Témoin Résistant	Mendel
Témoin Résistant commerciale	Sy Alister
Témoins sensible commerciale	Pamela

Préparation de l'inoculum

Le jour de l'inoculation, les galles préalablement multipliées sur la variété pe-tsaï, sont sorties du congélateur, 30 minutes avant le début de la manipulation.

Une fois décongelées, les galles sont pesées (15 grammes pour inoculer 80 plantes) et broyées dans de l'eau (75mL pour 15 grammes de galles) à l'aide d'un broyeur à couteaux. La suspension est passée en filtration (filtre 200µm) pour éliminer les débris racinaires et conserver uniquement la suspension de spores.

La concentration de la suspension mère est calculée à l'aide d'un hématimètre et ajustée à la concentration souhaitée (2×10^7 spores par mL). Le volume final doit correspondre au volume nécessaire pour inoculer la totalité des plantes à tester.

Inoculation

Déposer au pied de chaque plante 4 mL d'inoculum (concentration de 2×10^7 spores par mL).

Température

Le test est réalisé en module climatique à 23 °C, 80 % d'hygrométrie, 12 h de photopériode.

Durée du test

30 jours après l'inoculation.

Récupération des galles

Les plantes sont déterrées une à une et les racines sont lavées afin d'observer la présence ou l'absence de galles et réaliser les notations.

Nombre de plantes testées

30 plantes par variété.

Notation

Une fois nettoyé, le système racinaire est observé afin de donner une note à chaque plante.

L'échelle de notation est la suivante :

- 0- Absence de symptôme
- 1- Présence de galles sur le chevelu racinaire
- 2- Présence de galles sur le chevelu racinaire et pivot principal légèrement atteint
- 3- Pivot principal entièrement atteint par la hernie, mais présence du chevelu racinaire
- 4- Pivot principal entièrement atteint par la hernie et chevelu racinaire absent

Les notes attribuées à chaque plante permettent de calculer un indice de maladie pour la variété testée. L'indice de maladie se calcule de la façon suivante :

$$\text{Indice de maladie (\%)} = \frac{(N0 \times 0) + (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)}{\text{Nombre total de plantes} \times 4} \times 100$$

N= nombre de plantes par note

La résistance de la variété est estimée en fonction de l'indice de maladie :

IM < 25%, la variété est considérée comme résistante.

IM > 25%, la variété est considérée comme sensible.

Règles de décision du test *Plasmodiophora brassicae*

- L'identité de chaque pathotype sera confirmée à l'aide des règles de décision (voir schéma).
- Interprétation des variétés basée sur le calcul de l'indice de maladie.
- Test statistique réalisé sur les données brutes plante à plante, les répétitions ne sont pas prises en compte. L'étude de la variété est réalisée sur la totalité des 30 plantes.

Etude des variétés sur 2 ans, 3 tests

- Dans le cas d'une variété classée dans 2 classes différentes suite aux 2 années de test, proposition de la classe la moins résistante (ex : si une variété est classée résistante puis sensible, alors la variété proposée en sensible). Si l'obteneur le demande, possibilité d'un troisième test l'année 2, à ses frais, et proposition de la classe confirmée par le troisième test.
- Tests réalisés sur 2 ans au mois de mars.
- En cas d'un grand nombre de variétés en étude, prévision de 2 tests par an en mars et en juillet. Passage des deuxième année plutôt en mars et des première année plutôt en juillet pour garder la possibilité de repasser une deuxième année en juillet, en cas de demande de l'obteneur.

Echelle de notation et règle de décision des pathotypes du test *Plasmodiophora brassicae* sur crucifères



Indice de maladie (%) =
$$\frac{(N0 \times 0) + (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)}{\text{Nombre total de plantes} \times 4} \times 100$$

Interprétation
 N = Nombre de plante par note
 IM < 25 %, la variété est considérée comme résistante
 IM > 25 %, la variété est considérée comme sensible

Pathotypes	Hôtes différentiels <i>B. napus</i>			Témoin résistant	Témoin sensible	
	ECD6	ECD10	cv. Brutor	Mendel	Chou chinois (ECD5)	Pamela
P1 +	+	+	+	+	+	+
P1 -	+	+	+	-	+	+
P2+	+	-	+	+	+	+
P2-	+	-	+	-	+	+
P3+	-	-	+	+	+	+
P3-	-	-	+	-	+	+
P4 -	-	-	-	-	+	+
P5 -	-	+	+	-	+	+
P6 -	+	-	-	-	+	+
P7 -	-	+	-	-	+	+
P8 -	+	+	-	-	+	+

+ réaction hôte sensible ; - réaction hôte résistant