

Résistance variétale du trèfle violet au nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci*

G. Caubel¹, F. Chatot¹, C. Mousset-Declas²

D*itylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev est l'un des nématodes phytoparasites les plus importants en raison de sa distribution mondiale, notamment en raison de sa dispersion avec les lots de semences, et de la capacité de ses nombreuses races à endommager sévèrement plusieurs cultures d'importance économique. **La lutte génétique est pratiquement la seule envisageable**, en particulier pour les espèces fourragères. Ainsi, la création de variétés de légumineuses fourragères résistantes à *D. dipsaci* constitue un objectif particulièrement intéressant pour intervenir contre ce parasite majeur (BINGEFORS, 1970 et ANDERSSON, 1985). La résistance est caractérisée par la capacité du végétal à entraver la multiplication du nématode après pénétration dans la plante. Ce phénomène a été corrélé avec la réponse individuelle des plantes après l'inoculation, vérifiée dans le cas du trèfle violet, mais aussi de la luzerne, et même de la féverole. Ainsi, **des méthodes d'estimation de la résistance**, fondées sur la caractérisation des symptômes extériorisés précocement après l'inoculation artificielle de plantules, ont été proposées (BINGEFORS et ERIKSSON, 1968), discu-

MOTS CLÉS

Ditylenchus dipsaci, nématode, résistance variétale, sélection, trèfle violet.

KEY-WORDS

Breeding, cultivar resistance, *Ditylenchus dipsaci*, red clover, stem eelworm.

AUTEURS

1 : I.N.R.A. Rennes, Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zoologie, Domaine de la Motte-au-Vicomte, BP 29, F-35650 Le Rheu.

2 : I.N.R.A. Dijon, Amélioration des Plantes, BV 1540, F-21034 Dijon cedex.

tées (CAUBEL, 1974 ; GRIFFIN et KRUSBERG, 1990 ; SHARMA et al., 1993) et utilisées pour la création de variétés (LECLERCQ et CAUBEL, 1991). La prise en compte de ce critère de sélection a conduit les sélectionneurs français, regroupés au sein de l'Association des Créateurs de Variétés Fourragères (A.C.V.F.), à trier les plantes résistantes dans leurs familles de trèfle violet. Cette évaluation a été réalisée à la section de nématologie du laboratoire de Zoologie de l'I.N.R.A. de Rennes (CAUBEL et al., 1985), à la suite de résultats encourageants (CAUBEL et al., 1983).

Afin d'améliorer la méthodologie et d'en étudier les limites pour une utilisation sur une grande échelle, des études ont été réalisées pour répondre aux nécessités de standardisation, de rapidité de mise en place, de facilité de lecture et de récupération des plantes à sélectionner. Cette publication vise tout d'abord à **analyser la méthode d'estimation utilisée, puis à discuter les résultats obtenus sur l'évaluation** soit de variétés commerciales de trèfle violet, soit de familles en cours de sélection pour la résistance à *D. dipsaci*.

Matériel et méthodes

Le test d'évaluation, tout à fait semblable à celui mis au point pour la luzerne (LECLERCQ et CAUBEL, 1991), permet de déterminer pour chaque famille ou cultivar le pourcentage de plantes gonflées, calculé par rapport au nombre total des plantes qui survivent. Chaque plantule est inoculée individuellement en apportant dans les cotylédons une gouttelette de 15 µl contenant 50 nématodes. L'inoculum utilisé provient de *D. dipsaci* directement extraits d'une parcelle de plein champ, en vérifiant bien que les suspensions obtenues ne contiennent pas *Aphelenchoïdes*, un autre genre de nématode phytoparasite qui provoque des symptômes graves de nanisme sur trèfle violet (CAUBEL, non publié).

Les symptômes d'attaque de *D. dipsaci* observés sur trèfle violet 21 à 25 jours après l'inoculation artificielle des plantules repiquées en rouleaux de papier buvard (20 plantules par rouleau) peuvent être classés en trois catégories :

– **le gonflement** (G), caractérisé par un aspect boursoufflé de l'hypocotyle, de l'épicotyle, des pétioles et une décoloration des tissus ; parfois le gonflement est très fort et une catégorie particulière a été créée (TG) ;

– **l'arrêt du développement** (A) correspondant à l'inhibition de la croissance terminale de l'apex : la plantule reste bloquée au stade cotylédonnaire ou unifolié ;

– **l'aspect sain** (S) quand la plantule a repris sa croissance ; elle a alors développé une ou deux feuilles trifoliées mais reste de taille inférieure à un témoin non inoculé et présente des traces de pénétration des nématodes.

Le gonflement est signe de sensibilité alors que l'arrêt du développement, temporaire, indique une résistance.

L'étude de l'homogénéité des réponses de cultivars et de familles de trèfle est entreprise sur un total de 167 familles de trèfle. Les effectifs des échantillons sont de plusieurs centaines de plantes pour chaque famille et 200 pour chaque témoin Kuhn et Quin. Chaque rouleau de 20 plantules est considéré comme une répétition. La comparaison des tests entre eux est effectuée sur les paires de témoins Kuhn (variété sensible, également dénommée Rotonde) et Quin (variété résistante). En présence des témoins, quelques variétés résistantes ou inscrites au Catalogue français sont également évaluées. Les lots de ces semences proviennent des stations G.E.V.E.S. et de l'I.N.R.A. de Dijon.

L'étude de résistance porte aussi sur du matériel en voie de sélection correspondant aux familles de trèfle fournies par l'A.C.V.F. Pendant l'étude, un cycle de sélection a pu être réalisé dans les Etablissements de sélection et deux ou trois à l'I.N.R.A. de Dijon. Les plantules saines issues du test étaient cultivées puis intercroisées pour produire le cycle suivant.

Résultats

1. Une bonne homogénéité des réponses des cultivars de trèfle

En considérant l'ensemble des tests réalisés, on constate une homogénéité dans les cultivars et familles de trèfle violet testées, puisque les différences observées entre rouleaux ne sont pas significatives et que chaque famille a réagi de façon homogène à l'inoculation. Malgré l'existence d'une variabilité non négligeable d'une expérimentation à l'autre, la comparaison des pourcentages de plantules gonflées sur les rouleaux témoins des essais réalisés met en évidence l'homogénéité globale des notations effectuées sur Kuhn et Quin (figure 1). La répétabilité des tests est bonne

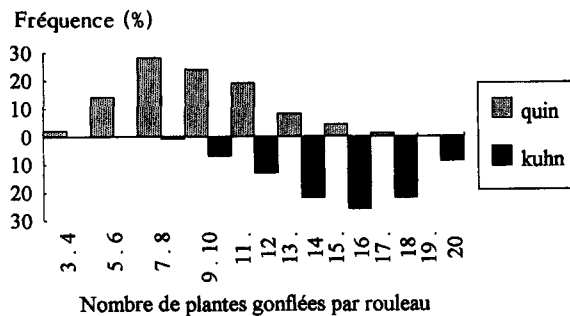


FIGURE 1 : Comparaison de la proportion de plantes gonflées sur l'ensemble des différents tests successifs.

FIGURE 1 : Comparison of the proportions of swollen plants in all successive tests.

Variété	Ploïdie *	Pourcentages de plantules par classe			Pays obtenteur
		G	A	S	
Lossam	4n	90	5	5	F
Doben	4n	88	8	4	GB
Témara	4n	83	6	11	CH
Kuhn (Rotonde)	2n	79	11	10	NL
Perenta	4n	79	9	11	DDR
Britta	2n	77	10	13	S
WWR 62	2n	77	13	10	GB
Barfiola	4n	73	11	16	NL
Resistenta	2n	71	11	18	S
Tétri	4n	70	9	21	F
Diper	2n	70	-	-	F
Tédi	4n	68	4	28	F
Reko	2n	60	18	22	S
Flamand	2n	53	46	1	F
Sabtoron	2n	51	17	32	GB
Maris-Leda	2n	50	25	25	GB
Quin	2n	45	23	32	GB

* 2n = diploïde, 4n = tétraploïde

TABLEAU 1 : Evaluation du niveau de résistance de quelques variétés ; pourcentages de plantes gonflées (G), saines (S) et en arrêt de développement (A).

TABLE 1 : Evaluation of the level of resistance of certain cultivars : percentages of swollen plants (G), of healthy plants (S), and of plants with their development stopped (A).

puisque pour 70% des rouleaux, sur un effectif total de 289, on dénombre pour chaque rouleau de 20 plantes, 7 à 12 plantes gonflées chez Quin et 13 à 18 chez Kuhn.

2. Un nombre limité de familles et de cultivars résistants

Concernant les niveaux de résistance génétique, parmi les variétés signalées comme résistantes, peuvent être classées dans la catégorie «assez résistantes», c'est-à-dire avec 45 à 60 % de plantes gonflées, les variétés Maris-Leda, Sabtoron et Reko (tableau 1). Sur les 169 familles testées, seulement 20% ont un pourcentage de plantes gonflées inférieur de 10% au moins à celui de la variété sensible Kuhn, alors que 52% apparaissent plus sensibles (tableau 2). Ceci pourrait s'expliquer par la structure génétique de ces familles qui sont plus ou moins homozygotes et donc subissent un effet de consanguinité. Cependant, quelques rares familles ont un pourcentage faible de plantes gonflées, voire voisin de Quin, et correspondent aux familles ayant subi 1 ou 2 cycles de sélection ; dans ce cas, la proportion de plantes saines est élevée. Le pourcentage de plantes non gonflées peut atteindre 50% (tableau 3). Le dénombrement des nématodes rencontrés dans les plantes 10 semaines après leur inoculation (tableau 4) montre que les plantules des variétés

Kuhn et Deben présentent un fort pourcentage de plantes très gonflées et multiplient abondamment le nématode, contrairement à la variété résistante Quin.

Un gain de résistance est obtenu à chaque cycle de sélection quel que soit le matériel de départ utilisé (tableau 5). Ainsi, le pourcentage de plantes non gonflées s'accroît de manière relative de façon assez semblable à ce qui est observé sur luzerne par LECLERCQ et CAUBEL (1991) et sur trèfle violet par ANDERSSON (1985). On note également qu'après 1 à 2 cycles de sélection, la résistance semble atteindre un maximum, mais ceci demande à être confirmé.

Pourcentage de plantes gonflées par rapport à Kuhn	Nombre de familles (% total)
71 - 80	5
81 - 90	15
91 - 100	28
101 - 110	27
111 - 120	17
121 - 130	7
131 -140	1

TABLEAU 2 : Classement de 169 familles de trèfle selon le pourcentage de plantes gonflées, rapporté à la variété témoin sensible de référence Kuhn.

TABLE 2 : *Ranking of 169 red clover lines according to the proportion of swollen plants (reference : susceptible cultivar Kuhn).*

% plantes gonflées	Quin		Kuhn		Familles	
	n	%	n	%	n	%
30 - 39	5	14				
40 - 49	15	43			5	3
50 - 59	14	40			20	12
60 - 69	1	3	12	34	38	23
70 - 79			11	31	56	33
80 - 89			11	31	46	27
89 -100			1	4	4	2

TABLEAU 3 : Comparaison du pourcentage de plantes gonflées (G) entre Quin, Kuhn et différentes familles de trèfle. L'effectif (n) de rouleaux de 20 plantes varie selon le matériel végétal.

TABLE 3 : *Comparison of the percentages of swollen plants (G) between Quin, Kuhn, and several lines of clover. The number (n) of samples of 20 plants varies with the plants.*

Cultivar	Symptômes à 3 semaines (% des plantes)				Nombre de nématodes par plante à 10 semaines		
	TG	G	A	S	1 - 100	101 - 1000	> 1000
Kuhn	90	3	3	4	8	39	53
Deben	84	4	8	4	13	27	60
Quin	27	25	11	37	79	16	5

TABLEAU 4 : Relation entre les symptômes et la multiplication de *D. dipsaci* dans les plantes (315 plantes par variété, inoculum de 50 nématodes par plante) : pourcentages de plantes exprimant les différents symptômes décrits dans le texte.

TABLE 4 : Relationship between the symptoms and the multiplication of *D. dipsaci* in the plants (315 plants per cultivar, 50 eelworms inoculated per plant) : percentages of plants exhibiting the various symptoms described in the text.

Etablissement	Famille	N0	N1	N2	N3
Tourneur	A	64	113		
	B	69	209		
	C	97	140		
	D	142	205		
INRA Dijon	Diper	73	189	277	228
	Flamand	142	199	158	
	Tédi	96	150		

TABLEAU 5 : Gains de résistance au cours des cycles de sélection exprimés en pourcentages de plantes non gonflées, par rapport au témoin Kuhn.

TABLE 5 : Improvement of resistance in successive cycles of selection, expressed as percentages of unswollen plants in comparison to the control Kuhn.

Discussion

La relation entre le nombre de nématodes dans les plantules et le type de symptômes qu'elles extériorisent confirme les résultats antérieurs obtenus sur trèfle violet (CAUBEL et al., 1983). Cette relation, signalée entre autres par BINGEFORS (1970), est également observée dans le cas de la luzerne (LECLERCQ et CAUBEL, 1991). Puisque les plantes présentant des gonflements sont multiplicatrices de *D. dipsaci* et celles présentant un arrêt de développement ou un aspect sain ne le sont pas, la sélection passe par l'élimination des plantes gonflées. Le symptôme le plus pertinent pour comparer les cultivars entre eux est donc le **gonflement, seul symptôme de multiplication du nématode**. La mortalité, essentiellement liée aux conditions expérimentales, ne doit pas être considérée comme un signe de sensibilité. Pour faire une

estimation précise du niveau de résistance d'une population de trèfle violet, il faut, à une température de 15 à 17°C, attendre 25 jours après l'inoculation. En sélection variétale, le respect de ce délai avant notation est fondamental car la proportion de plantules en arrêt de développement évoluant en plantules gonflées n'est pas négligeable pour les populations sensibles. Des symptômes tardifs, rares si les conditions expérimentales sont bonnes mais néanmoins inévitables dans un test précoce, peuvent apparaître les semaines suivantes. Il existe toujours, même pour un cultivar résistant, un pourcentage non négligeable de plantes assurant la multiplication des nématodes ; ce pourcentage est plus faible dans le cas de la luzerne.

Les rares cas d'hétérogénéité des populations testées ont pour cause un nombre insuffisant de rouleaux ou un résultat aberrant sur un rouleau. La variabilité plus forte observée chez Quin par rapport à Kuhn s'explique par la difficulté à noter les cultivars résistants qui présentent un nombre non négligeable de symptômes intermédiaires (CAUBEL, 1974), dont le classement en A ou G n'est pas toujours évident.

Concernant la **répétabilité des tests**, l'analyse met en évidence pour un même matériel végétal des différences d'un test à l'autre. Ces différences, dues à une extériorisation plus ou moins forte des symptômes, auraient pour origine certaines variations difficilement contrôlables de l'activité des nématodes, des conditions de culture, ou même de l'appréciation du notateur. La répétabilité d'un test à l'autre n'est donc pas vérifiée dans l'ensemble des cas. Mais le nombre important de données expérimentales permet d'établir une valeur de référence exprimée en pourcentage de plantes gonflées : $74,3 \pm 1,1\%$ pour Kuhn et $46,5 \pm 1,8\%$ pour Quin, soit 14,8 et 9,3 plantes en moyenne par rouleau. Il est possible de déterminer la validité d'un test de résistance en comparant les résultats des rouleaux témoins aux valeurs moyennes de Kuhn et Quin.

Les familles testées dans des expérimentations différentes mais dont les témoins ne diffèrent pas de ces valeurs de référence, sont comparables entre elles. L'estimation de la résistance de 16 variétés confirme les résultats signalés par ailleurs ; elle confirme aussi **Quin** dans sa position de **témoin résistant**, aucun cultivar étudié ne dépassant son niveau de résistance.

Conclusion

La méthode d'estimation de la résistance réalisée sur des plantules est utilisable pour des objectifs de caractérisation de la résistance et de sélection. Toutefois, le travail de sélection étant conduit sur des populations, la résistance obtenue ne peut être que partielle, avec la présence d'un pourcentage notable de plantes non entièrement résistantes, même en conditions d'inoculation artificielle énergique. Cette proportion, plus importante que dans le cas de la luzerne, confirme les résultats

d'ANDERSSON (1985). Il convient donc de réduire encore cette proportion puis d'étudier, dans les conditions agronomiques d'exploitation de la culture, ce qu'il advient de ces plantes jugées résistantes ou non.

Accepté pour publication, le 20 juin 1994

Remerciements

Ce travail, réalisé à l'I.N.R.A., a été financé en partie par le Ministère de l'Agriculture, de 1987 à 1990, dans le cadre d'un contrat I.N.R.A.-A.C.V.F. (Association des Créateurs de Variétés Fourragères). Nos remerciements s'adressent aux sélectionneurs participant au programme (G.I.E. Amélioration Fourragère, Blondeau, I.N.R.A. Dijon, Tourneur Grandes Cultures Obtention), notamment à ceux d'entre eux qui ont fourni leurs résultats sur plusieurs cycles de sélection, ainsi qu'aux deux secrétaires successifs de la section légumineuses pérennes de l'A.C.V.F., MM. CHARPENTIER et GAYRAUD.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSSON B. (1985) : «Some results of selection for disease resistance in herbage legumes at Svalöf, Sweden», *Proc. 15th Int. Grassl. Congr.*, August 24-31, Kyoto, Japan, 230-231.
- BINGEFORS S. (1970) : «Resistance against stem nematodes *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev», *EPPO Publ.*, 54, 63-75.
- BINGEFORS S., ERIKSSON K.B. (1968) : «Some problems connected with resistance breeding against stem nematodes in Sweden», *Z. Pflanzenzücht.*, 59, 359-375.
- CAUBEL G. (1974) : «Réactions de trois variétés de luzerne à l'inoculation des plantules par le nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil.», *Sci. Agron.*, 37-42.
- CAUBEL G., CHAMPION R., MARRE R. (1983) : «Le nématode des tiges des légumineuses : fumigation des semences, variétés résistantes», *Perspectives Agricoles*, 75, 23-27.
- CAUBEL G., CHARPENTIER F., GUY P. (1985) : «Résistance variétale des légumineuses fourragères à *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Fil.», *C.R. Acad. Agri. Fr.*, 71, 719-729.
- GRIFFIN G.D., KRUSBERG L.R. (1990) : «Evaluating resistance to *Ditylenchus dipsaci* and *Aphelenchoides* species», *Methods for evaluating plant species for resistance to plant-parasitic nematodes*, J.L. Starr, Ed. The Society of Nematologists, Hyattsville, Maryland, États-Unis Amérique, 58-66.

- LECLERCQ D., CAUBEL G. (1991) : «Résistance variétale de la luzerne au nématode des tiges *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev ; test d'évaluation et application en sélection», *Agronomie*, 11, 603-612.
- SHARMA S.B., SIKORA R.A., GRECO N., DI VITO M., CAUBEL G. (1994) : «Screening techniques and sources of resistance to nematodes in cool season food legumes», *Expanding the Production and Use of Cool Season Food Legumes*, Dordrecht, Kluwer Acad. Publ., Ed. F.J. Muehlbauer & W.J. Kaiser, 346-358.

RÉSUMÉ

La résistance variétale au nématode *Ditylenchus dipsaci* chez le trèfle violet est évaluée par un test de dépistage au stade plantule, fondé sur la caractérisation des symptômes exprimés après l'inoculation artificielle. La méthode employée présente certains facteurs de variabilité qui ont été étudiés. Ainsi, les symptômes à rechercher ont été précisés. Il n'a pas été décelé de pathotypes de nématodes se multipliant sur les génotypes habituellement résistants. L'homogénéité des réponses des cultivars au test a été prouvée, et l'étude de la répétabilité a permis d'établir des références pour les variétés témoins Kuhn et Quin, respectivement multiplicatrice et résistante au nématode. L'application de la méthode à la sélection variétale a permis d'évaluer les niveaux de résistance de 17 variétés, et donc de faire le point sur les sources actuelles de résistance génétique.

SUMMARY

Resistance of red clover cultivars to the stem eelworm *Ditylenchus dipsaci*

The current method used to estimate the resistance of red clover cultivars to the stem eelworm *Ditylenchus dipsaci* is based on the characterization of the symptoms exhibited by seedlings after artificial inoculation. Some factors of variability of this method were examined. The symptoms were further investigated in several experiments. Pathotypes of eelworms able to develop in resistant genotypes were not observed. The cultivars tested reacted in a homogeneous way, as shown by the results of different trials with the control cultivars Kuhn and Quin, respectively susceptible and resistant. The screening method gave estimates of the level of resistance of several cultivars, and access to a better knowledge of the existing sources of genetic resistance. Among the cultivars tested, Quin and Sabtoron proved very resistant.