

Institut National Recherche Agronomique, Zoologie, BP 29, 35650 Le Rheu, France

## LA RESISTANCE DE LA BETTERAVE SUCRIERE HM1091 VIS-A-VIS DU NEMATODE A KYSTE, *HETERODERA SCHACHTII*

par

A. MAHFOUD<sup>1</sup>, C. PORTE et G. CAUBEL

**Résumé.** L'étude de la résistance de la betterave sucrière expérimentale HM1091 est entreprise dans des conditions contrôlées par comparaison avec le cv. Betty. L'évaluation de la résistance est effectuée à l'aide de différents critères qui concernent la multiplication du parasite à partir de l'inoculation artificielle précoce et tardive de jeunes plantes avec des juvéniles du deuxième stade. La production de femelles, à des délais correspondant aux deux premières générations du nématode, reste très inférieure sur HM1091 par rapport au témoin. Quelques rares plantes cependant sont bonnes multiplicatrices du nématode, l'absence de transmission du caractère de résistance est en cause. Sur les plantes résistantes, les kystes formés sont rares mais de plus ils sont petits, inférieurs à 400  $\mu$ , et renferment peu de juvéniles. Les kystes produits sont calibrés puis mis en éclosion dans l'eau et dans des exsudats de racines produits par les deux betteraves. Une stimulation forte de l'éclosion est observée en présence des exsudats émis indifféremment par l'une ou l'autre variété (90% environ d'éclosion après 3 semaines) par rapport à la sortie dans l'eau (40%). Dans les conditions expérimentales éprouvées, une betterave résistante forme potentiellement 500 fois moins de juvéniles après trois mois de culture qu'une plante multiplicatrice.

**Summary.** Resistance of the sugar-beet HM1091 against the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*. The resistance of sugar beet HM1091 line to *Heterodera schachtii* was evaluated on the basis of the production of cysts after early or late inoculation with second stage juveniles, which allowed the development of one or two generations of the nematode, respectively. In general, very few cysts were produced compared with the susceptible control, cv. Betty, and were always small (less than 400  $\mu$ m). A few plants of HM1091 that supported a high rate of multiplication of *H. schachtii* are considered to have not inherited resistance. After three months growth, the production of juveniles was 500 times more on cv. Betty than on HM1091. Root exudates from both varieties stimulated 90% of egg hatch after three weeks compared with 40% in water.

L'utilisation de variétés de betteraves résistantes à l'égard du nématode à kyste de la betterave, *Heterodera schachtii* Schm., constituerait un atout particulièrement intéressant à appliquer dans les rotations en rendant possible la culture de la betterave sucrière dans les sols infestés avec un rendement en sucre satisfaisant. La résistance connue chez *Beta procumbens* a été introduite dans le génome de *B. vulgaris* à partir de lignées de translocation homozygotes. Les recherches entreprises pour évaluer la résis-

tance de nouvelles betteraves sucrières par des tests menés en conditions de laboratoire ou au champ montrent que chez les betteraves en cours de sélection et en particulier chez HM1091, la résistance à l'égard du nématode à kyste, s'exprime par un nombre réduit de femelles formées sur la grande majorité des plantes, mais qu'il existe cependant aussi de rares plantes non résistantes qui multiplient abondamment le nématode (Caubel *et al.*, 1993; Porte *et al.*, 1995).

<sup>1</sup> Adress actuelle: Office Régional Mise en Valeur, BP 21, Agadir, Maroc.

Une étude a été réalisée dans des conditions standardisées de laboratoire sur une betterave sucrière sélectionnée pour sa résistance, comparativement à une variété témoin, afin d'analyser les différents paramètres de résistance suivants: multiplication du parasite, qualité des kystes formés et effet stimulant des exsudats racinaires de ces deux betteraves sur l'éclosion de ces kystes.

## Matériel et méthodes

L'expérimentation compare une betterave résistante expérimentale HM1091, issue de la sélection Hilleshög (Werner *et al.*, 1995) et le cultivar Betty (*Beta Vulgaris* L.), selon la méthode

décrite par Caubel et Chaubet, 1988. Après trempage dans l'acide sulfurique pendant 10 minutes, les graines sont mises à germer en boîtes de Pétri contenant 15 g d'agar par litre et placées à 25 °C à l'obscurité pendant 72 heures. Elles sont repiquées dans des pots contenant 70 ml d'un substrat à base de sable de Fontainebleau et de kaolin. Avant le repiquage, une solution d'engrais complet est incorporée au substrat. Au total, environ 800 plantes sont placées à 20 °C et 16 heures de lumière, avant d'être inoculées. Le semis de l'ensemble des betteraves est effectué à une date unique; l'inoculation est soit précoce, 15 jours après semis, soit tardive, 70 jours après semis; ou bien encore double sur des plantes débarrassées des femelles à 48 jours (Tableau D). Chaque plante reçoit à proxi-

TABLEAU I - Schéma expérimental indiquant le nombre (*n*) de betteraves inoculées (*i*) 2 ou 10 semaines après le semis et analysées pour les dénombrements de femelles (*f*) et de kystes (*k*). Trois groupes de plantes HM1091 sont définis selon l'effectif de femelles évalué après 7 semaines (figuré entre parenthèses); elles sont repiquées immédiatement et soumises ou non à une deuxième inoculation.

| Variété           | Plantes ( <i>n</i> ) | Semaines après semis |    |    |                  |       |   |
|-------------------|----------------------|----------------------|----|----|------------------|-------|---|
|                   |                      | 2                    | 7  | 10 | 15               |       |   |
|                   |                      | 1 <sup>è</sup> i     | f  | k  | 2 <sup>è</sup> i | (f+k) |   |
| Betty<br>n = 74   | 9                    | x                    |    | x  |                  |       |   |
|                   | 10                   |                      |    |    | x                | x     |   |
|                   | 22                   | x                    |    |    |                  | x     |   |
|                   | 21                   | x                    | x  |    | x                | x     |   |
|                   | 12                   | x                    | x  |    |                  | x     |   |
| HM1091<br>n = 644 | 170                  | x                    |    | x  |                  |       |   |
|                   | 36                   |                      |    |    | x                | x     |   |
|                   | 27                   | x                    |    |    |                  | x     |   |
|                   | (+ 20 ♀)             | 3                    | x  | x  |                  | x     |   |
|                   | (1-19 ♀)             | 183                  | x  | x  |                  | x     | x |
|                   |                      |                      | 80 | x  | x                |       | x |
|                   | (0 ♀)                | 93                   | x  | x  |                  | x     | x |
|                   |                      |                      | 52 | x  | x                |       | x |

mité des racines 1 ml de suspension de juvéniles du deuxième stade larvaire (J2) contenant soit 600 J2 à la première inoculation, soit 1000 J2 à la deuxième. Ces larves infestantes sont produites à partir de kystes placés dans une solution aqueuse de Chlorure de Zinc à 4 mM. Ces kystes, stockés au froid, proviennent d'un élevage réalisé antérieurement sur colza, à partir de nématodes récoltés à l'origine dans un champ de betterave de l'Aisne.

Les nématodes femelles (cette dénomination regroupe par la suite l'ensemble femelles et kystes) et les kystes sont extraits 48 et 105 jours après semis soit cinq semaines à 25 °C après l'inoculation; le développement des adultes mâles n'est pas pris en compte. Le contenu de chaque pot est lavé sous pression, au-dessus de deux tamis superposés de 800 et 250 µm, le premier retenant les débris. Selon l'abondance des femelles formées, certaines plantes sont directement repiquées dans des pots de 250 ml sans extraction des femelles, et conservées pour l'étude du développement de la deuxième génération du nématode; d'autres sont repiquées puis soit soumises à une seconde inoculation, soit destinées à observer l'évolution de stades larvaires persistant éventuellement dans les racines après le lavage. Les plantes HM1091 inoculées quinze jours après le semis et soumises à une seconde inoculation sont réparties en trois catégories selon l'abondance des femelles qu'elles portaient: nombreuses, effectif de une à dix femelles ou aucune. Enfin, des plantes non inoculées le sont pour la première fois, deux semaines après le repiquage au stade 7-8 feuilles.

En outre, une série de plantes, inoculées quinze jours après semis, sont conservées pour étudier la taille et le contenu des kystes produits sur les deux variétés. Ils sont calibrés sous un jet d'eau à pression au-dessus de trois tamis superposés de 400, 250 et 100 µm puis placés quelques semaines au froid avant la mise en éclosion. Leur contenu en juvéniles est évalué en les déposant sur des tamis immergés dans

différents milieux et placés à 20 °C. Des exsudats des deux variétés de betterave sont obtenus en laissant tremper dans 20 ml d'eau et pendant 24 heures les racines de vingt plantes âgées de dix jours; leur action stimulante est comparée sur les kystes étudiés. Tous les sept jours, durant trois semaines consécutives, les juvéniles écloses sont dénombrées et les milieux d'éclosion renouvelés. Le nombre de kystes disponibles pour ce test d'éclosion varie selon les calibres, et vu les faibles quantités parfois mises en expérience, aucune analyse statistique n'a été réalisée. Après le dernier comptage, les kystes sont écrasés pour estimer leur contenu résiduel en juvéniles et un pourcentage d'éclosion, basé sur le nombre total des oeufs et juvéniles viables, est alors calculé.

## Résultats

Les effectifs de femelles sur l'ensemble des plantes subissant l'inoculation unique sont respectivement de 43 et 1,9 par plante, sur les betteraves Betty et HM1091. Le pourcentage de plantes qui n'en portent aucune reste nul pour Betty, il est de 36% pour HM1091 (Fig. 1A); une quantité importante (58%), de plantes résistantes forment de une à cinq femelles et quelques unes (0,4%) multiplient notablement le nématode. Un indice de résistance I a été calculé sur la base des moyennes de femelles formées sur le témoin et la variété à tester selon la formule suivante:  $I = 100 (T-R) / T$ , où T est l'effectif moyen de femelles et kystes sur témoin sensible et R l'effectif moyen sur variété résistante (Caubel *et al.*, 1993). Ainsi, HM1091 présente un indice de résistance de 95.

Pour observer le développement des stades larvaires éventuellement présents dans les racines après la première extraction des femelles, 52 plantes HM1091 sans femelles blanches sont repiquées ainsi que 80 autres qui en contiennent au moins une au moment de l'extraction; 35 jours après, aucune nouvelle femelle n'a été

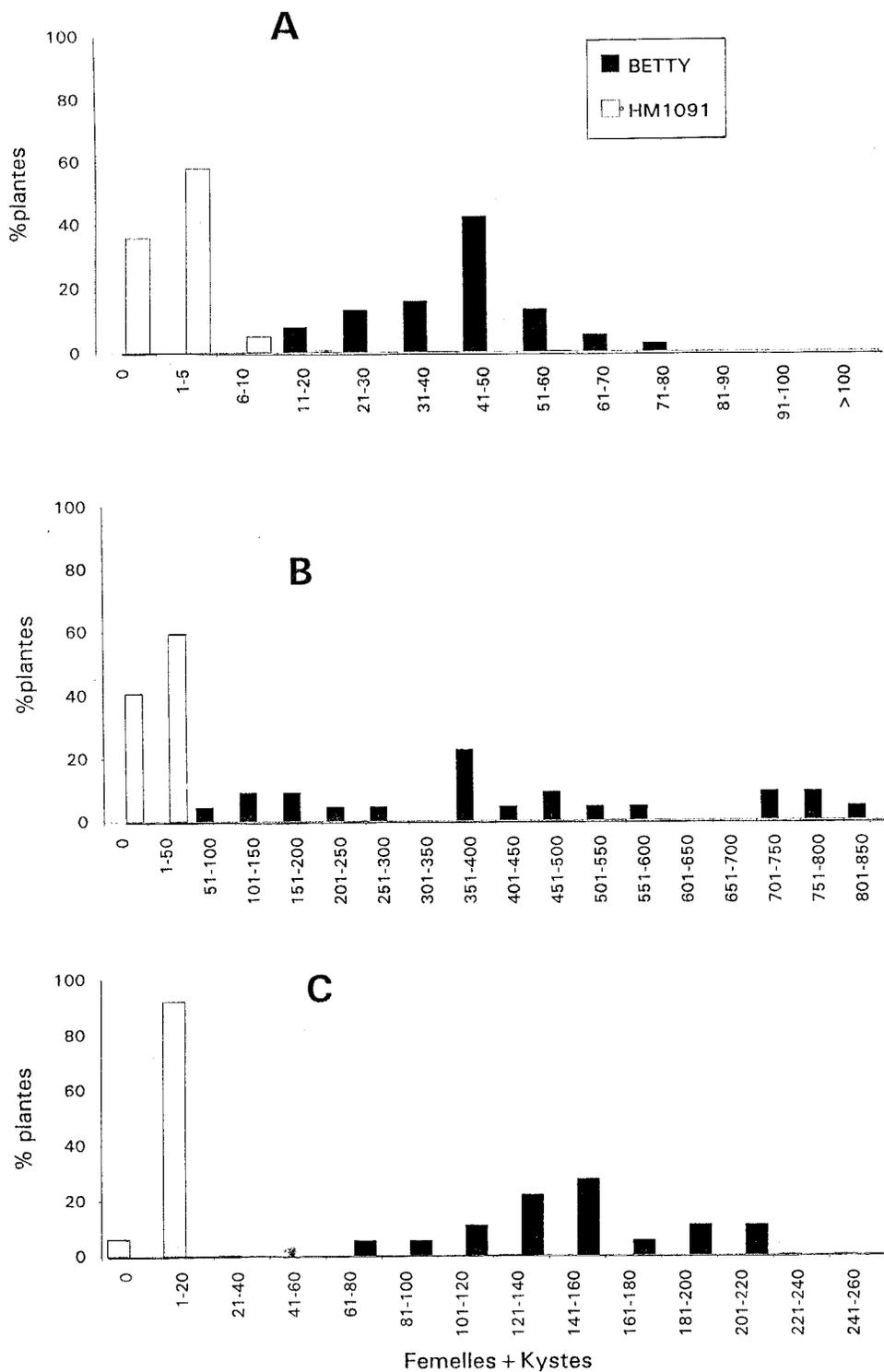


Fig. 1 - Distribution des femelles formées sur les betteraves Betty et HM1091: A, inoculation de 600 J2, analyse à 48 jours; B, inoculation de 600 J2 à 15 jours, analyse des femelles à 105 jours; C, inoculation de 1000 J2 sur plantes âgées après extraction des femelles, analyse finale à 105 jours. L'échelle des abscisses des trois graphiques diffère et pour A, la classe 1-10 a été scindée en deux.

observée dans les betteraves de la première catégorie et très peu d'individus sont apparus sur les trois plantes de la deuxième catégorie.

Le développement d'*H. schachtii* après environ trois mois sur HM1091 montre que la formation des femelles reste faible avec en moyenne 2,8 dont 0,8 kystes par plante. Le pourcentage de plantes sans aucune femelle est important (41%), équivalent à celui des betteraves avec 1 à 5 femelles; le reste (8%) porte un effectif au-delà de cinq, avec un maximum de onze individus (Fig. 1B). La multiplication est donc très faible quelle que soit la génération de *H. schachtii* considérée, toutefois le pourcentage de racines sans aucune femelle est légèrement plus élevé après le premier délai (59%) qu'après le deuxième (41%). Sur Betty, dans des conditions identiques d'inoculation précoce, on obtient 423 femelles en moyenne, avec une forte majorité de kystes.

Sur les 21 betteraves Betty subissant une seconde inoculation, une bonne multiplication est observée, puisque la moyenne des effectifs est de 148 contre 7 sur HM1091. Très peu de plantes HM1091 sont totalement indemnes, la majorité porte de 1 à 5 femelles et quelques rares racines (1,6%) portent un nombre d'individus supérieur à 20, voire 200 (Fig. 1C). La valeur de l'indice de résistance est également de 95.

Par ailleurs, chacune des 93 plantes de HM1091 sans aucune femelle blanche lors de la première analyse ont été repiquées et réinoculées à raison de 1000 J2; beaucoup produisent des femelles, mais la majorité, environ 80%, n'en porte que de 1 à 5, et une plante 12. La plupart des 263 plantes réinoculées qui contenaient de 1 à 19 femelles au premier contrôle, en portent de 1 à 10 au second. Avec deux inoculations la production des femelles est légèrement plus importante qu'un apport unique puisque l'effectif moyen obtenu est de 7 contre 1,9; mais la résistance de HM1091 demeure.

Pour Betty, les dénombrements moyens de femelles sont de 43 après l'apport précoce de 600 J2, de 124 après l'inoculation tardive unique

de 1000 J2 et de 148 après la double inoculation. Sur HM1091, les quantités moyennes de femelles, en ne prenant en compte que les plantes résistantes, sont de 1,7; 3,6 et de 3,8 respectivement, pour les trois catégories correspondantes. La quasi-totalité des betteraves n'ont formé que quelques femelles, avec un maximum pour la classe de 1 à 5. Les différentes conditions appliquées dans les séries étudiées ont donc un effet net sur Betty mais faible sur HM1091.

Une différence nette existe dans la taille des kystes selon la variété: la majorité (78%) de ceux formés sur Betty est recueillie sur le tamis de 400  $\mu\text{m}$ , le restant sur 250  $\mu\text{m}$ ; alors qu'avec HM1091 très peu (3%) dépassent 400  $\mu\text{m}$  et 85% sont compris entre 250 et 400  $\mu\text{m}$  (Tableau II). Les gros kystes sont très faiblement produits sur la betterave résistante, alors que les petits kystes, inférieurs à 250  $\mu\text{m}$ , sont quasiment absents sur Betty.

L'allure des courbes de sortie des juvéniles est semblable pour les deux origines des nématodes, le maximum des sorties est atteint après la première semaine dans les exsudats produits par les plantes résistantes ou non (Fig. 2). La quantité moyenne pondérée des J2 est moins importante, tous milieux d'éclosion confondus, sur betterave résistante du fait que les petits kystes renferment une faible quantité de juvéniles. Après trois semaines, l'émergence est nettement stimulée en présence d'exsudats produits avec une plante résistante ou non: 91% et 87% d'éclosion contre 47% dans l'eau pour les kystes de HM1091 et avec les kystes de Betty 95 et 82% contre 44% dans l'eau. En dépit de l'absence d'analyse statistique, ces valeurs de stimulation paraissent très semblables selon l'origine de l'exsudat ou des kystes.

## Discussion

L'expérimentation sur un nombre important de plantes permet d'estimer correctement le ni-

veau de résistance. Dans tous les cas, la betterave HM1091 induit une réduction importante du nombre de femelles et de kystes formés sur les racines. Néanmoins, la résistance n'est jamais totale, puisqu'un nombre non négligeable de plantes, variant de 65 à 90% selon le type d'essai, porte des femelles. Le pourcentage de racines totalement résistantes dépend du type d'inoculation puisque l'apport tardif de 1000 J2 induit une multiplication légèrement plus importante que l'inoculation précoce de 600 J2. En outre les rares plantes jugées multiplicatrices après la première inoculation le sont toujours après la deuxième. Sur Betty, les plantes inoculées en deux fois développent plus de nématodes que les autres. La quantité d'inoculum et le stade végétatif de la betterave influe sur la multiplication de *H. schachtii*; ce résultat confirme les observations antérieures, par exemple celles obtenues sur moutarde blanche par Caubel et Chaubet (1988). Mais, que l'infestation soit précoce ou tardive, la réponse globale de résistance ne change pas fondamentalement. Le développement du nématode sur les betteraves résistantes après le délai de trois mois correspond à la formation d'une deuxième génération. Un pourcentage important (41%) de plan-

tes sans femelles est alors observé et la distribution de ces individus diffère légèrement d'une génération à l'autre, les plantes en donnant plus à la deuxième.

Les kystes produits par les plantes résistantes sont rares et petits. L'étude sur la taille des kystes confirme clairement un fait bien établi: petits, ils renferment une faible quantité de juvéniles. Ainsi, la quantité larvaire moyenne pondérée produite par kyste, est largement inférieure chez HM1091, 68 juvéniles, par rapport à Betty, 369 juvéniles. Müller (1992) indique aussi que le contenu larvaire est corrélé avec l'effectif de kystes formés par betterave, quelle que soit la variété.

Par ailleurs, les exsudats des deux betteraves étudiées stimulent fortement l'éclosion d'*H. schachtii*, on peut donc espérer en particulier que la variété résistante piégera au champ un maximum de juvéniles infestantes. Cette stimulation forte de la sortie des juvéniles sous l'action des betteraves résistantes va dans le même sens que les résultats obtenus avec les exsudats de moutardes et de radis résistants au nématode à kyste de la betterave (Caubel, 1985; Steele *et al.*, 1982).

La résistance de HM1091 à l'égard d'*H. schachtii* présente donc un niveau intéressant, même si elle n'est pas totale puisque de rares pe-

TABLEAU II - Caractéristiques des kystes formés sur deux variétés de betterave, HM1091, résistante (récoltés sur 180 plantes) et Betty non résistante (récoltés sur 10 plantes): contenu larvaire et pourcentage d'éclosion par rapport au contenu viable en présence d'exsudats, selon le calibre des kystes.

| Variété d'origine | Calibre $\mu\text{m}$ | Nombre de kystes | Répartition % | Contenu larvaire | Éclosion % |
|-------------------|-----------------------|------------------|---------------|------------------|------------|
| Betty             | > 400                 | 275              | 78,1          | 439              | 96         |
|                   | > 250                 | 76               | 21,6          | 118              | 88         |
|                   | > 100                 | 1                | 0,3           | —                | —          |
|                   | Total                 | 352              | 100           |                  |            |
|                   | Moyenne pondérée      | —                | —             | 369              | 94         |
| HM 1091           | > 400                 | 5                | 3,0           | 304              | 96         |
|                   | > 250                 | 142              | 85,5          | 67               | 89         |
|                   | > 100                 | 19               | 11,5          | 14               | 94         |
|                   | Total                 | 166              | 100           |                  |            |
|                   | Moyenne pondérée      | —                | —             | 68               | 90         |

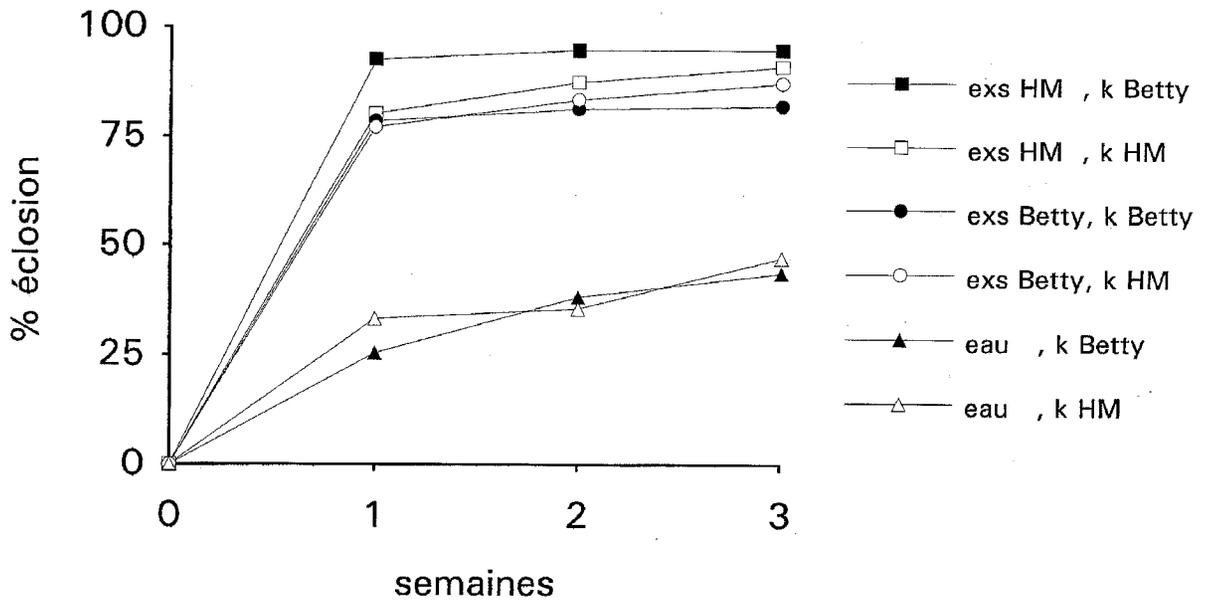


Fig. 2 - Eclosion des kystes (k) formés sur les betteraves Betty et HM1091 (HM), en présence d'eau ou d'exsudats (exs) provenant de racines de chaque variété.

tits kystes dont le contenu en juvéniles reste faible sont formés sur certaines plantes. Elle s'exprime non seulement sur le nombre de femelles adultes formées mais aussi sur leur fécondité. En moyenne, après trois mois de culture dans nos conditions expérimentales, une betterave résistante donnera potentiellement environ 500 fois moins de juvéniles qu'une plante multiplicatrice. Il importe maintenant d'étudier dans les conditions de plein champ et en fonction de différents niveaux initiaux d'infestation, comment la culture d'une betterave résistante de ce type fait évoluer la densité de la population de *H. schachtii* dans le sol.

**Remerciements.** Les auteurs remercient l'Institut Technique de la Betterave, ITB, pour leur soutien à la réalisation de cette étude, ainsi que la firme Hillesthög pour la fourniture des semences de betterave HM1091, présentée à l'inscription au catalogue français des variétés et inscrite depuis Janvier 1996 sous le nom "Evasion".

#### Littérature citée

- CAUBEL G., 1985. Eclosion et multiplication de *Heterodera schachtii* en présence de colza ou de radis fourrager. *Agronomie*, 5: 463-466.
- CAUBEL G. et CHAUBET B., 1988. Résistance de variétés de Crucifères à l'égard du nématode à kyste de la betterave, *Heterodera schachtii*. 2ème Conf. int. Maladies des Plantes, 8-10 Novembre 1988, Bordeaux, Tome III: 1646-1656.
- CAUBEL G., MUCHEMBLED C. et PORTE C., 1993. Betterave résistante au nématode à kyste *Heterodera schachtii*: expérimentations de plein champ et de laboratoire. C.R. 3ème Conf. int. Ravageurs Agric., Ann. Assoc. Natle Protection Plantes, 7-9 Décembre 1993, Montpellier, Tome II: 1035-1042.
- MÜLLER J., 1992. Detection of pathotypes by assessing the virulence of *Heterodera schachtii* populations. *Nematologica*, 38: 50-64.
- PORTE C., MUCHEMBLED C. et CAUBEL G., 1995. La résistance de la betterave sucrière au nématode à kyste *Heterodera schachtii*. 58è Congrès IIRB, 19-22 Juin 1995, Beaune: 233-241.
- STEELE W., TOXOPEUS H. et HEIJBROEK W., 1982. A comparison of the hatching of juveniles from cysts of *Heterodera schachtii* and *H. trifolii*. *J. Nematol.*, 14: 270-274.
- WERNER T., KARLSSON G., RYDSTRÖM G. et HALLDEN C., 1995. Breeding for beet cyst nematode (*H. schachtii*) resistance. 58è Congrès IIRB, 19-22 Juin 1995, Beaune: 163-164.