

Utilisation d'une méthode *in vitro* pour évaluer la résistance du blé à *Stagonospora nodorum*

V. MICHEL et G. FRICK¹, Agroscope RAC Changins, case postale 254, CH-1260 Nyon 1



E-mail: vincent.michel@rac.admin.ch
Tél. (+41) 27 34 53 511.

Introduction

La septoriose sur feuille et sur épi, causée par *Stagonospora nodorum* (anciennement *Septoria nodorum*), est une des principales maladies du blé en Suisse (HÄNI *et al.*, 1990). Parmi les moyens de lutte déployés contre cette maladie figure la sélection de variétés résistante. (MICHEL, 2001). Etant donné que la résistance à la septoriose sur épi n'a pas la même base génétique que la résistance à la septoriose sur feuille (FRIED et MEISTER, 1987), l'évaluation de ces résistances se fait séparément lors de la sélection. Ce travail se déroule principalement au champ, mais peut être complété par des méthodes de laboratoire. Récemment, la mise au point d'une méthode *in vitro* de discrimination (*screening*) de la résistance du blé contre la septoriose (WICKI, 1997) a constitué l'occasion de tester un tel outil dans le cadre du programme de sélection de Changins. L'intérêt de cette méthode réside dans sa simplicité et son coût modique.

En plus des travaux de laboratoire, il existe encore d'autres méthodes pour compléter les essais au champ: un test a été développé en serre à Changins pour évaluer la résistance à la septoriose sur feuille au stade plantule. Cependant, toutes ces méthodes doivent impérativement être validées avant de pouvoir être insérées dans le programme de sélection. C'est pourquoi nous avons confronté les valeurs obtenues par ces méthodes avec les résistances observées au champ; le résultat de cette expérimentation est présenté dans cet article.

¹Avec la collaboration technique de F. Esteban et S. Kellenberger.

Résumé

Une méthode de laboratoire (*in vitro*) pour évaluer la résistance du blé à la septoriose causée par *Stagonospora nodorum* a été confrontée à l'évaluation de la résistance au champ. Les résultats obtenus en laboratoire n'étaient pas corrélés de manière significative avec ceux observés au champ. En conséquence, la méthode *in vitro* ne peut pas servir de nouvel outil d'évaluation de résistance dans le programme de sélection du blé. L'échec de la méthode *in vitro* provient en partie d'un manque de connaissance des substances toxiques utilisées. Ces substances ont été obtenues par une extraction non purifiée de grains de blé colonisés par *S. nodorum*. Cet extrait brut a inhibé la germination du blé. Un effet similaire était observé quand l'extrait brut a été remplacé par différents acides organiques. Selon la variété de blé, l'extrait brut a bien un effet différencié mais il s'agit également sur la germination de différentes espèces mono- et dicotylédones telles que l'orge, la fétuque des prés, le colza et le trèfle violet.

Matériel et méthodes

La méthode de discrimination *in vitro* pour *S. nodorum* a été développée à Agroscope FAL Reckenholz, station fédérale de recherches en agroécologie et agriculture, au cours des années nonante. Dans une première étape, des substances toxiques ont été extraites à partir d'un inoculum utilisé pour l'infection des pépinières avec *S. nodorum* (FRIED, 1989; SACHSE, 1992). Avec cet extrait brut, une méthode *in vitro* a été mise au point pour évaluer la résistance du blé à la septoriose sur épi dans l'environnement artificiel d'un laboratoire (KELLER *et al.*, 1994). Cette approche encore très laborieuse, utilisant des embryons de blé sur un milieu gélosé sophistiqué, a été modifiée par WICKI (1997) pour parvenir à un test simple, basé sur la germination de grains de blé sur un buvard imbibé de l'extrait brut de toxines. Pour la mise en valeur statistique, ce pourcentage de germination a été transformé en indice *in vitro*. Ce dernier a été corrélé de manière significative avec la résistance au champ de plantes adultes à la septoriose sur épi (WICKI *et al.*, 1999), permettant ainsi d'évaluer cette résistance en laboratoire.

Précédant une éventuelle utilisation routinière de cette méthode dans le programme de sélection, une série d'expériences a été conduite à Changins sur plusieurs facteurs. Les extraits possèdent une quantité hétérogène de toxines et doivent être dilués à différents degrés avant leur utilisation. Ce travail est indispensable pour arriver à bien distinguer les niveaux de résistance des différents génotypes de blé. Une concentration trop forte de l'extrait empêche toute germination tandis qu'une concentration trop faible n'a plus d'effet sur les grains. Dans un premier temps, des toxines ont été extraites d'un inoculum préparé avec des souches de *S. nodorum*, puis la bonne dilution de cet extrait a été déterminée en utilisant la variété résistante Arina et la variété sensible Boval comme références. Dans une deuxième étape, l'effet de cet extrait a été mesuré sur les huit variétés décrites dans le travail de WICKI (1997) afin de vérifier la répétitivité de la méthode.

Une fois le travail de laboratoire au point, les résultats ainsi obtenus ont été comparés avec ceux provenant du champ. En 1999, 68 variétés ou lignées de sélection de blé d'automne ont été inoculées au champ à

Changins et à Vouvry. Une suspension de spores de *S. nodorum* a été préparée à partir du même inoculum que pour la production des extraits destinés au test *in vitro* et a été appliquée selon le procédé standard utilisé pour l'infection des tests maladies (MICHEL, 2001). L'évolution de la septoriose sur feuille et sur épi a été notée à plusieurs reprises et le niveau de résistance des blés a été exprimé par la «surface sous la courbe de progression de la maladie» (en anglais AUDPC = *area under disease progress curve*), une méthode internationale pour mesurer l'impact d'une maladie (SHANER et FINNEY, 1977). En hiver 1999, les mêmes 68 génotypes de blé d'automne ont été soumis au test *in vitro*. Ce test a été effectué en utilisant les normes internationales de contrôle de germination.

Pendant ces travaux et en consultant la littérature traitant des toxines de *S. nodorum* (BOUSQUET et SKANJENNIKOFF, 1974; KENT et STROBEL, 1977), trois nouvelles questions ont été abordées dans une deuxième série d'expériences. La première concernait l'effet du pH sur le mode d'action de l'extrait de toxines. Le deuxième point concernait l'effet de différents acides organiques sur la germination du blé et le troisième l'effet de l'extrait de toxines sur la germination de diverses espèces mono- et dicotylédones. Pour l'évaluation de la résistance des lignées de blé à la septoriose sur feuille, la résistance

des plantules de blé inoculées sous serre a été comparée à celle observée au champ. Parmi les 23 lignées de blé testées figuraient 19 blés hybrides. Ces lignées ont été évaluées au champ dans le cadre des tests maladies 2001. Au courant de l'hiver 2001/2002, la résistance de plantules issues du même lot de semences (F1) a été évaluée sous serre. Les plantules ont été inoculées avec une suspension de spores de *S. nodorum* obtenue selon la méthode de FRIED (1989). Deux inoculations avec une suspension contenant 10^6 spores/ml ont été effectuées, la première au stade quatre feuilles et la deuxième une semaine plus tard. Les symptômes de maladie (nécroses) formés pendant les deux semaines suivant la deuxième inoculation ont été notés à quatre reprises, à quatre jours d'intervalle. Sur la base de ces notations, la «surface sous la courbe de progression de la maladie» (AUPDC) a été calculée et comparée avec les résultats obtenus au champ.

Résultats

En dépit de quelques petites modifications de la méthode d'extraction dues à l'équipement du laboratoire de pathologie de Changins, les résultats du test *in vitro* étaient comparables à ceux de WICKY (1997) lors de la mise au point de la méthode (fig. 1). En revanche, il

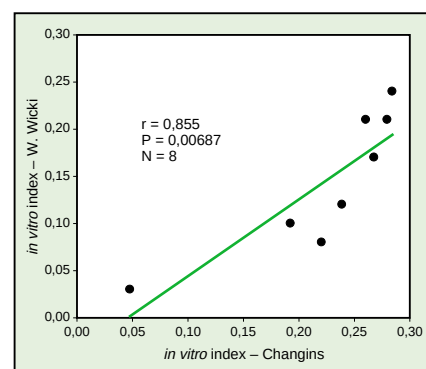


Fig. 1. Comparaison des résultats du test *in vitro* obtenus par W. Wicki (données de sa thèse) avec ceux obtenus dans le laboratoire de pathologie de la sélection à Changins. Les huit variétés de blé d'automne testées étaient Arina, Boval, Forno, Iéna, Greif, SN+, SN-, Zénith.

n'existait aucune corrélation significative entre l'indice *in vitro* et la résistance au champ (fig. 2). Dans les variétés de blé présentant un indice *in vitro* proche de 0,10 se trouvaient à la fois la plus sensible et les plus résistantes à *S. nodorum* sur épi au champ, aussi bien à Vouvry qu'à Changins.

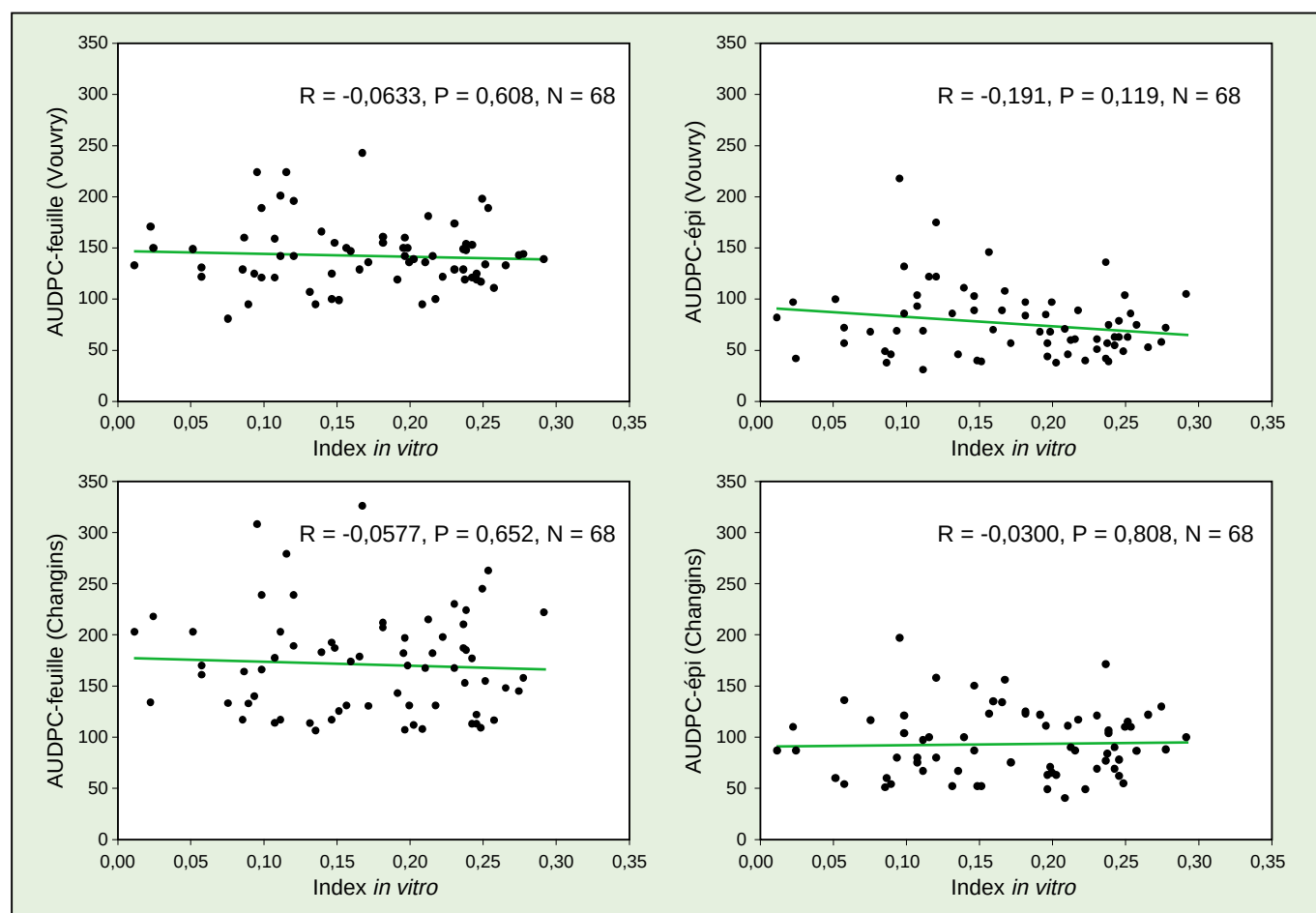
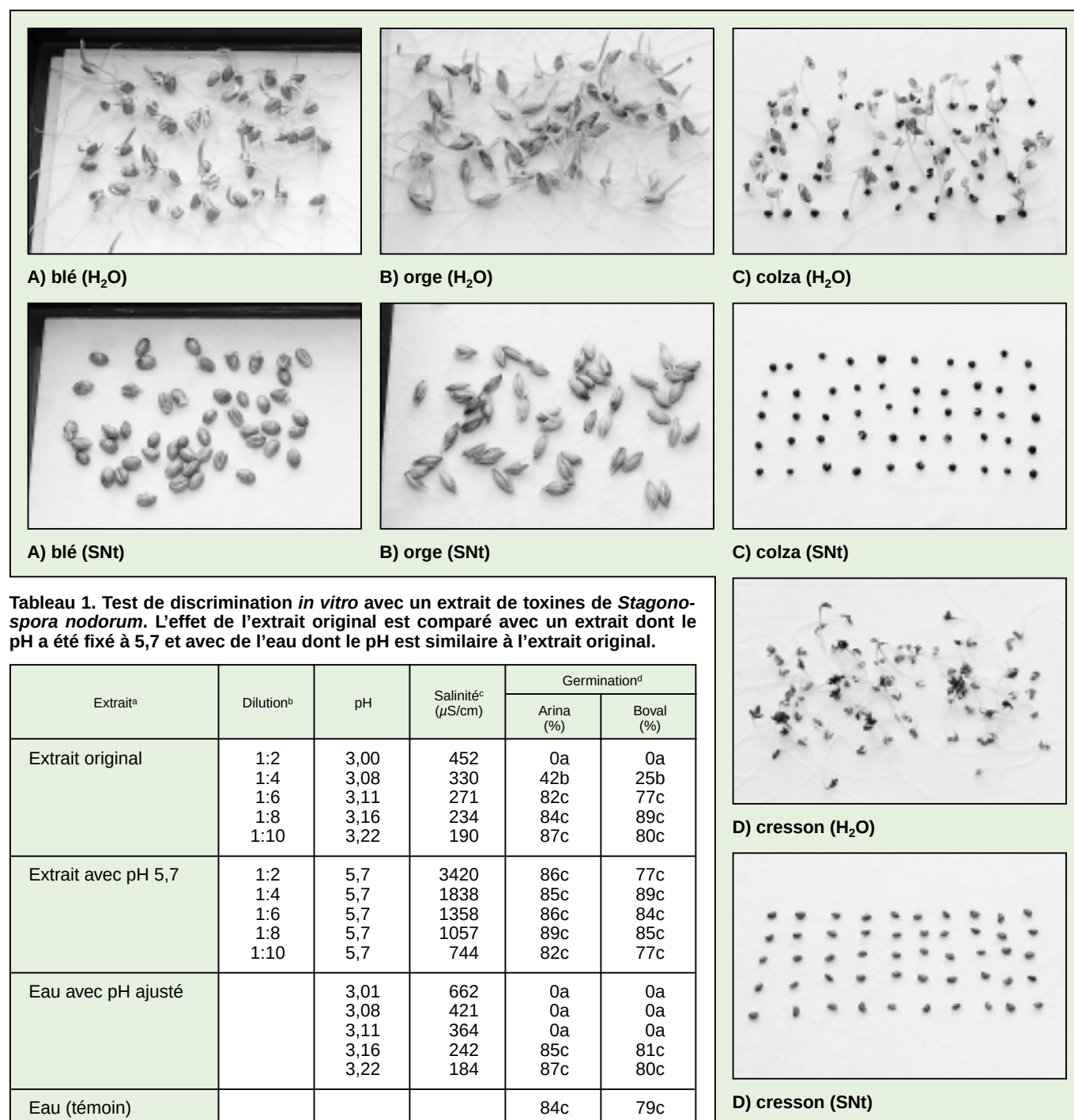


Fig. 2. Corrélation entre l'indice *in vitro* obtenu au laboratoire de pathologie et le niveau de résistance au champ de la dernière feuille et sur épi de 68 variétés ou lignées de sélection avancées de blé d'automne. La résistance au champ est exprimée par l'AUDPC (= surface sous la courbe de progrès de la maladie) et a été mesurée en deux lieux, Changins et Vouvry (Chablais valaisan), en 1999. Une valeur plus basse signifie une résistance plus élevée aussi bien pour l'indice *in vitro* que pour la résistance au champ.



^aLe pH a été ajusté à l'aide de NaOH ou HCl.

^bLa dilution met en rapport la quantité d'inoculum extrait avec le volume d'extrait obtenu.

^cLa salinité est définie par la conductivité électrique qui s'exprime en μS/cm. Plus cette valeur est grande, plus la salinité est élevée.

^dLes procédés ayant la même lettre ne sont pas significativement différents (test Tukey avec une probabilité d'erreur de 5%). Le test porte sur la moyenne des deux variétés testées.

Lors de la mise au point du test *in vitro* à Changins, la dilution de 1:4 avait permis une bonne discrimination entre Arina (résistant) et Boval (sensible) (tabl. 1). A plus forte concentration, l'effet de l'extrait était tel qu'aucun grain des deux variétés n'a pu germer. En revanche, à plus forte dilution, l'extrait n'avait plus d'activité, ce qui se traduisait par un taux de germination égal à celui du témoin. Ce taux de ger-

mination égal à celui du témoin a également été constaté pour tous les procédés dont l'extrait de toxines avait un pH ajusté à 5,7, et ce indépendamment du degré de dilution. En revanche, lorsque les graines étaient mises sur des buvards imbibés d'eau dont le pH correspondait à celui des différentes dilutions de l'extrait de toxines, toute germination était absente dans les procédés avec un pH égal aux faibles dilu-

Fig. 3. Germination de grains de blé (a), d'orge (b), de colza (c) et de trèfle violet (d) sur des buvards imbibés avec l'extrait des toxines de *Stagonospora nodorum* (SNT) ou avec de l'eau (H₂O).

tions (1:2 à 1:6), tandis que la germination était normale dans les variantes à fortes dilutions.

Les différents acides organiques examinés ont montré un effet d'agent de sélection *in vitro* similaire à celui de l'extrait de toxines de *S. nodorum* (tabl. 2). Sur l'acide formique, à une dilution de 1:30 et 1:35, le taux de germination d'Arina était légèrement plus élevé que celui de Boval. En revanche, Boval

Tableau 2. Test de discrimination *in vitro* avec différents acides organiques.

Acide	Dilution ^a	pH	Salinité ^b ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Germination ^c	
				Arina (%)	Boval (%)
Acide acétique	1:10	2,94	512	0	0
	1:15	3,02	424	0	0
	1:20	3,08	368	0	0
	1:25	3,12	332	0	0
	1:30	3,15	305	17	0
	1:35	3,19	288	19	27
Acide citrique	1:10	2,39	1691	89	91
	1:15	2,47	1373	88	88
	1:20	2,52	1179	89	90
	1:25	2,57	1052	91	89
	1:30	2,61	946	91	88
	1:35	2,67	859	91	93
Acide formique	1:10	2,46	1688	0	0
	1:15	2,56	1359	0	0
	1:20	2,61	1190	0	0
	1:25	2,66	1061	0	0
	1:30	2,70	961	15	10
	1:35	2,74	878	26	21
Acide lactique	1:10	2,41	1677	0	2
	1:15	2,50	1366	11	18
	1:20	2,56	1170	25	36
	1:25	2,61	1054	47	73
	1:30	2,65	950	93	87
	1:35	2,71	863	92	94
Acide propionique	1:10	2,97	443	0	0
	1:15	3,05	368	0	0
	1:20	3,11	322	0	0
	1:25	3,16	288	0	0
	1:30	3,20	264	0	0
	1:35	3,23	242	0	0
Eau (témoin)				91	93

^aLa dilution met en rapport le volume d'acide avec le volume d'eau.

^bLa salinité est définie par la conductivité électrique qui s'exprime en $\mu\text{S}/\text{cm}$. Plus cette valeur est grande, plus la salinité est élevée.

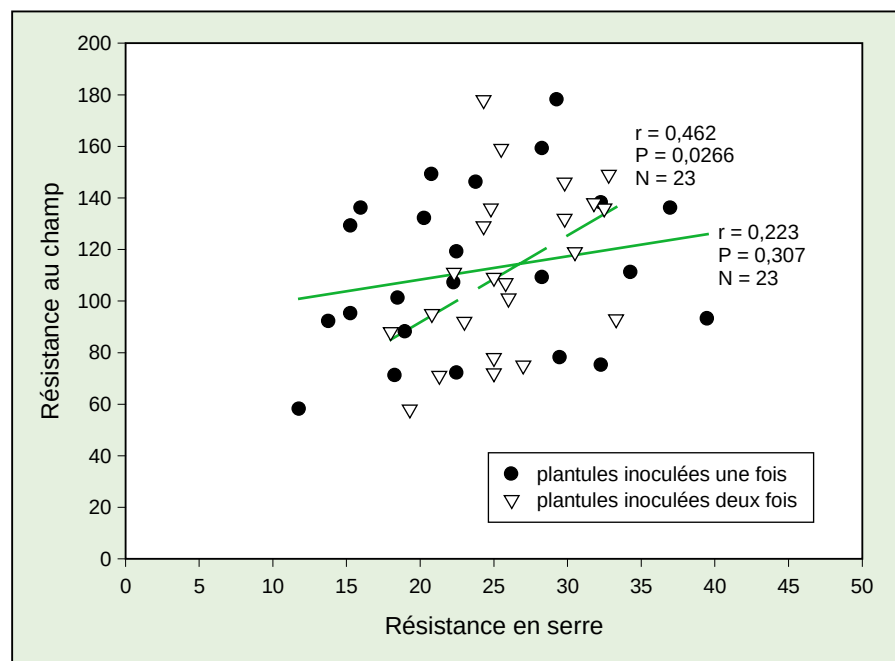


Fig. 4. Corrélation entre les résistances sur feuille de 23 génotypes de blé d'automne mesurées sur des plantules sous serre et sur des plantes adultes au champ. Les plantules ont été inocuées avec une suspension de spores de *Stagonospora nodorum*, soit une fois (●), soit deux fois avec un intervalle d'une semaine (▽). La résistance est exprimée par l'AUDPC (= surface sous la courbe de progrès de la maladie).

germait mieux sur certaines dilutions d'acide lactique. Dans d'autres cas, on notait l'absence d'effet sur la germination (acide citrique) ou un effet marqué empêchant toute germination (acide propionique). L'effet graduel de la dilution était très net avec l'acide lactique et assez net avec l'acide acétique et l'acide formique.

Quant à l'effet de l'extrait de toxines sur d'autres espèces végétales que le blé, il s'est montré uniforme aussi bien sur des monocotylédones que sur des dicotylédones (fig. 3). L'absence de germination des grains posés sur des buvards mouillés avec l'extrait de toxines a été constatée aussi bien pour l'orge, le ray-grass d'Italie, la fétuque des prés, le cresson, le colza que pour le trèfle violet.

La résistance à *S. nodorum* des plantules testées en serre n'était que faiblement corrélée avec celle qu'on a observée au champ (fig. 4b); en outre, une corrélation significative n'a pu être obtenue qu'avec deux inoculations consécutives (fig. 4a).

Discussion

L'inadaptation du test *in vitro* pour évaluer la **résistance sur feuille** à *S. nodorum* n'est pas surprenante car déjà lors de la mise au point de la méthode, cette utilité n'était pas démontrée (WICKI, 1999). En revanche, l'inadéquation de la méthode *in vitro* pour l'évaluation de la résistance de l'épi à *S. nodorum* peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Premièrement, pour établir une méthode de sélection *in vitro*, la ou les substances spécifiques causant la toxicité doivent d'abord être identifiées (DAUB, 1986). Ensuite elles doivent être obtenues soit par purification, soit par synthèse pour être utilisées ultérieurement dans une méthode *in vitro*. Dans le cas de la méthode pour évaluer la résistance de l'épi à *S. nodorum*, la production des toxines n'a jamais dépassé le stade de l'extraction brute d'un amalgame de substances toxiques non identifiées. Deuxièmement, la neutralisation de l'effet de l'extrait de toxines par l'ajustement du pH à 5,7 et l'effet similaire provoqué par plusieurs acides organiques démontrent le rôle potentiel que joue l'acidité dans le milieu sélectif utilisé. En effet, les chercheurs américains KENT et STROBEL (1976) ont observé une influence de différents acides organiques, dont les acides citrique, succinique, fumarique et glutarique, sur la germination du blé. Comme nous, ils ont constaté une différence au sein des variétés dans le taux de germination du blé. En accord avec nos résultats, ils ont trouvé une influence des

acides organiques sur la germination d'autres graminées telles que l'avoine, le seigle et l'orge. Il est donc possible qu'un ou plusieurs acides organiques soient à l'origine de l'effet *in vitro* de l'extrait de toxines que nous avons utilisé pour nos tests de germination. Etant donné que le solvant utilisé pour l'extraction était de l'acétate d'éthyle, une apparition d'acide acétique dans l'extrait final est théoriquement possible. Ce risque est d'autant plus probable que la température d'extraction de 52 °C dépasse largement les 35 °C considérés comme valeur maximale par l'industrie pharmaceutique pour l'extraction de substances organiques, telles que les toxines naturelles (Eliane Abou-Masour, Université de Neuchâtel, comm. pers.).

La non-spécificité de l'extrait brut observée sur toutes les espèces soumises aux tests de germination est probablement le troisième facteur qui explique l'échec de la méthode *in vitro*. Un effet négatif d'une toxine produite par *S. nodorum* sur différentes espèces mono- et dicotylédones a déjà été observé par des chercheurs français il y a trente ans (BOUSQUET et SKANJENNIKOFF, 1974). Dans leur étude, une solution contenant 200 ppm de cette toxine inhibait presque totalement l'élongation racinaire de plantules de blé, de riz, de colza, de maïs, de tomate et de sorgho.

L'inoculation de plantules de blé sous serre pour l'évaluation de la résistance sur feuille n'est pas une alternative valable à la méthode *in vitro*. La faible corrélation entre les tests en serre et au champ confirme les observations faites par d'autres chercheurs (ARSENIUK et FRIED, 1991; TROTTET et BENACEF, 1989) et elle est insuffisante pour permettre une sélection du blé résistant à *S. nodorum* sur feuille au stade plantule.

Comme les deux méthodes testées ne sont pas applicables, la question de leur insertion dans un schéma de sélection existant, comme celui de Changins (MICHEL, 2001), ne se pose que théoriquement. Malgré leur simplicité, les deux méthodes demandent plus de main-d'œuvre que la méthode d'évaluation de résistance au champ actuellement utilisée. Dans le contexte d'une rationalisation du travail dans les stations de recherches, ce dernier point est d'une grande importance et ne doit pas être négligé dans le développement de nouvelles méthodes de sélection.

Bibliographie

ARSENIUK E., FRIED P.M., 1991. Comparison of resistance of triticale, wheat and spelt to *Septoria nodorum* blotch at the seedling and adult plant stages. *Euphytica* 55, 43-48.

Conclusions

- ❑ L'absence de corrélation significative entre les résultats au champ et ceux obtenus par une méthode *in vitro* rend cette dernière inapplicable dans le programme de sélection de Changins.
- ❑ Cette absence de corrélation peut s'expliquer par le manque d'identification des toxines à l'origine de l'effet *in vitro*.
- ❑ Cet effet semble être causé, au moins partiellement, par des acides organiques et ne se manifeste pas que sur le blé.

Summary

Use of an *in vitro* method for screening wheat resistant to *Stagonospora nodorum*

An *in vitro* method for screening wheat resistant to leaf and glume blotch caused by *Stagonospora nodorum* was compared to the results observed in the field. Data from laboratory and field were not significantly correlated. Therefore, the *in vitro* method cannot be used as a new tool for resistance screening in the regular wheat improvement program. This failure can partially be explained by missing knowledge about the toxic substances used for the *in vitro* method. These substances were obtained by a non purified extraction of wheat kernels colonised by *S. nodorum*. This crude extract inhibited the germination of wheat. A similar effect was observed when the crude extract was replaced by different organic acids. The effect was cultivar-specific on wheat, but there was also an effect on the germination of different mono- and dicotyledons such as barley, meadow fescue, oil seed rape and red clover.

Key words: *in vitro*, glume blotch, resistance, *Stagonospora nodorum*, wheat.

Zusammenfassung

Anwendung einer *in vitro* Methode für das Auffinden von *Stagonospora nodorum*-resistenten Weizen

Die Resistenz von Weizen gegen die durch *Stagonospora nodorum* verursachte Blatt- und Spelzbräune wurde im Labor mittels einer *in vitro* Methode bestimmt. Die dadurch erhaltenen Resultate wurden mit den Beobachtungen im Feld verglichen. Dabei erwies sich, dass keine signifikante Korrelation zwischen den Labor- und Felddaten existiert. Demzufolge kann die *in vitro* Methode nicht im bestehenden Weizenzüchtungsprogramm angewandt werden. Dies könnte teilweise auf die mangelnden Kenntnisse der in dieser Methode verwendeten toxischen Substanzen zurückzuführen sein. Diese Substanzen stammten aus einer ungereinigten Extraktion von mit *S. nodorum* bewachsenen Weizenkörnern. Dieser Rohextrakt hemmte die Keimung von Weizen. Eine ähnliche Hemmung wurde beobachtet wenn der Rohextrakt durch verschiedene organische Säuren ersetzt wurde. Der Rohextrakt hatte eine sortenbedingte unterschiedliche Wirkung beim Weizen, beeinflusste aber auch die Keimung von mehreren ein- und zweikeimblättrigen Arten wie Gerste, Wiesenschwingel, Raps und Rotklee.

BOUSQUET J. F., SKANJENNIKOFF M., 1974. Isolement et mode d'action d'une phytotoxine produite en culture par *Septoria nodorum* Berk. *Phytopathol. Z.* 80, 355-360.

DAUB M. E., 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 159-186.

FRIED P. M., 1989. Improved method to produce large quantities of *Septoria nodorum* inoculum. In: *Septoria of cereals, Proceedings of 3rd International Workshop on Septoria Diseases of Cereals*, July 4-7, 1989, Zurich, Switzerland, 28-31.

FRIED P. M., MEISTER E., 1987. Inheritance of leaf and head resistance of winter wheat to *Septoria nodorum* in a diallel cross. *Phytopathology* 77, 1371-1375.

HÄNI F., POPOW G., REINHARD H., SCHWARZ A., TANNER K., VORLET M., 1990. Protection des plantes en production intégrée. LmZ, Zollikofen, 334 p.

KELLER B., WINZELER H., WINZELER M., FRIED P. M., 1994. Differential sensitivity of wheat embryos against extracts containing toxins of *Septoria nodorum*: First steps towards *in vitro* selection. *J. Phytopathol.* 141, 233-240.

KENT S. S., STROBEL G. A., 1976. Phytotoxin from *Septoria nodorum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 67, 354-358.

MICHEL V., 2001. La sélection de variétés de blé et de triticale résistantes aux maladies. *Revue suisse Agric.* 33 (4), 133-140.

SACHSE J., 1992. Identification and determination of mellein in cultures of the fungus *Septoria nodorum* (Berk.) by thin layer and high-performance chromatography. *J. Chromatography* 609, 349-353.

SHANER G., FINNEY R. E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67, 1051-1056.

TROTTET M., BENACEF N., 1989. Relationship between the resistance to *Leptosphaeria nodorum* of wheat lines and the stage of development of the plant. In: *Septoria of cereals, Proceedings of 3rd International Workshop on Septoria Diseases of Cereals*, July 4-7, 1989, Zurich, Switzerland, 47-50.

WICKI W., 1997. Resistance to leaf and glume blotch (*Septoria nodorum* Berk.) and sensitivity *in vitro* to pathogen metabolites in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Thèse n° 12482, EPF Zurich, 103 p.

WICKI W., MESSMER M., WINZELER M., STAMP P., SCHMID J., 1999. *In vitro* screening for resistance against *Septoria nodorum* blotch in wheat. *Theor. Appl. Genetics* 99, 1273-1280.