

Etude de la résistance partielle de la carotte à *Alternaria dauci* par une approche de phénotypage multi-critères

AAP CTPS 2010-2013



Valérie Le CLERC AO- Equipe QuaRVeg IRHS (Angers)

Partenaires du projet

- Equipe QuaRVeg
- HMClause
- Vilmorin
- LISA (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Automatisés)
- Equipes Fungisem et Emersys (IRHS)

Contexte et problématique

France

N°2 mondial ➡ production de semences
de carotte

N°3 européen ➡ production de carotte

2^{ème} légume le plus consommé par les Français

Alternariose (*Alternaria dauci*)

Maladie foliaire la + préjudiciable
sur carotte de consommation et en
production de semences



Contexte et problématique

➤ Stratégie de lutte envisagée

Développer des variétés avec un niveau de résistance élevé et durable par **cumul de facteurs de résistance partielle** dans un même génotype

➤ Démarche proposée

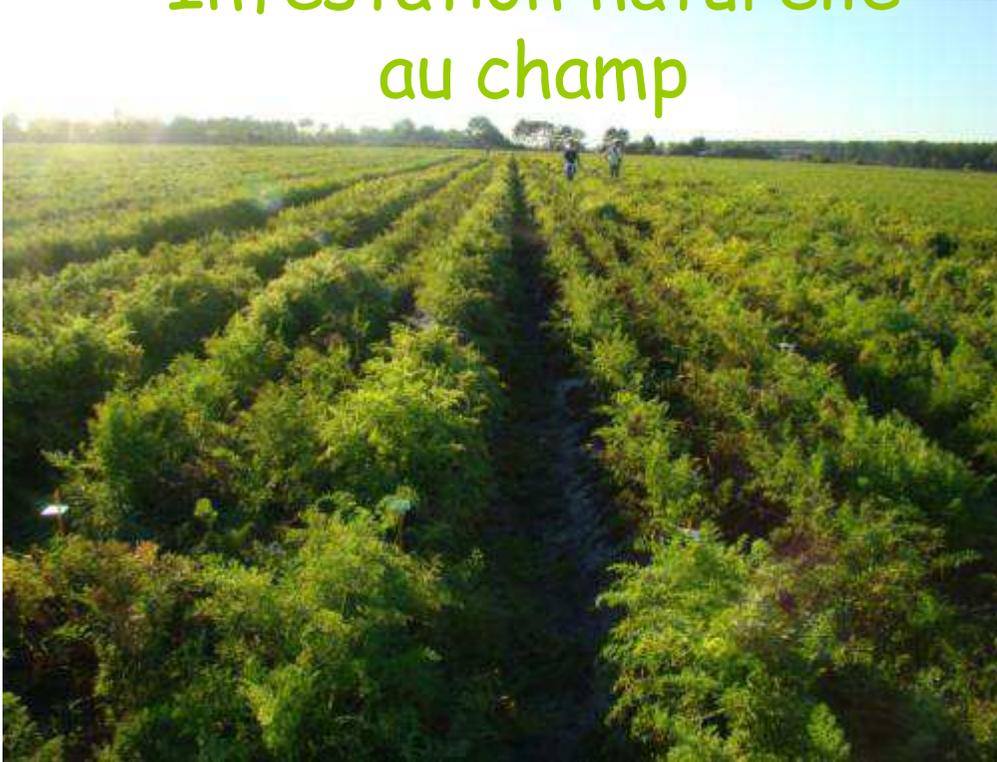
Décomposer la résistance en facteurs de résistance élémentaires, mis en évidence par un **phénotypage multi-critères**

➤ Hypothèse

Combinaison de facteurs de résistance présentant des spécificités de mode d'action vis-à-vis du cycle infectieux plus efficace pour contrôler la maladie que de s'appuyer sur un seul mode d'action

Phénotypage « classique »

Infestation naturelle
au champ



Essai en conditions
contrôlées sous tunnel



Photo: A. Suel

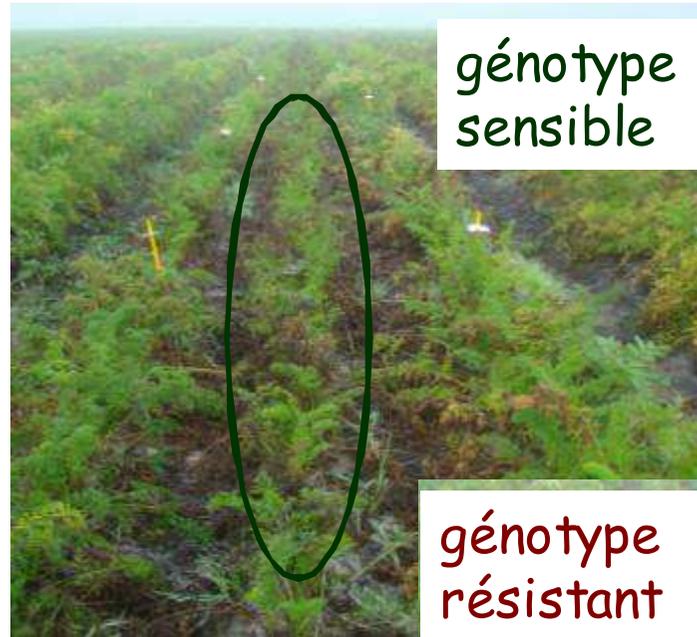
Echelle de notation des symptômes sur feuillage



0



9



génotype sensible

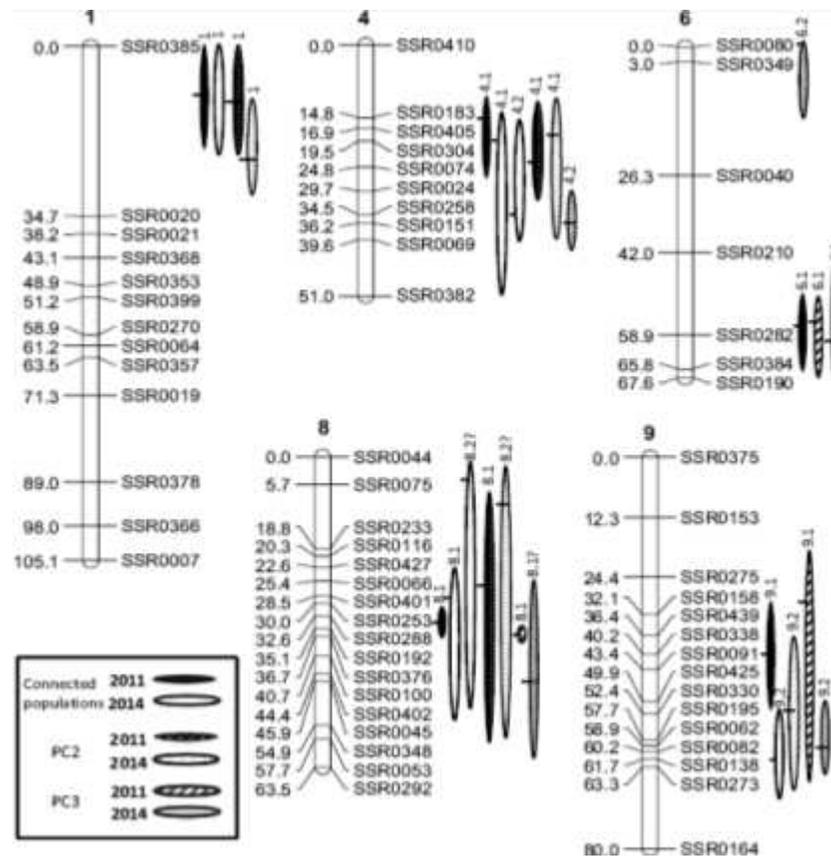


génotype résistant

Identification de qtls

Linkage group	QTL detection method	Trait	LOD	QTL position (cM)	Confidence interval (cM)	R ² (%)
2R	CIM	Score2T	2.9	62.7	54.7-70.7	16.9
	SIM	Score2T	2.6	62.7	54.7-70.7	16.9
5R	SIM	Score2F	2.9	27.1	15.6-30.6	10.6
	SIM	Score2F	2.9	27.1	15.6-30.6	10.6
8R	SIM	Score2T	4.3	20.5	6.0-30.5	17.4
	SIM	Score2T	4.3	20.5	6.0-30.5	17.4

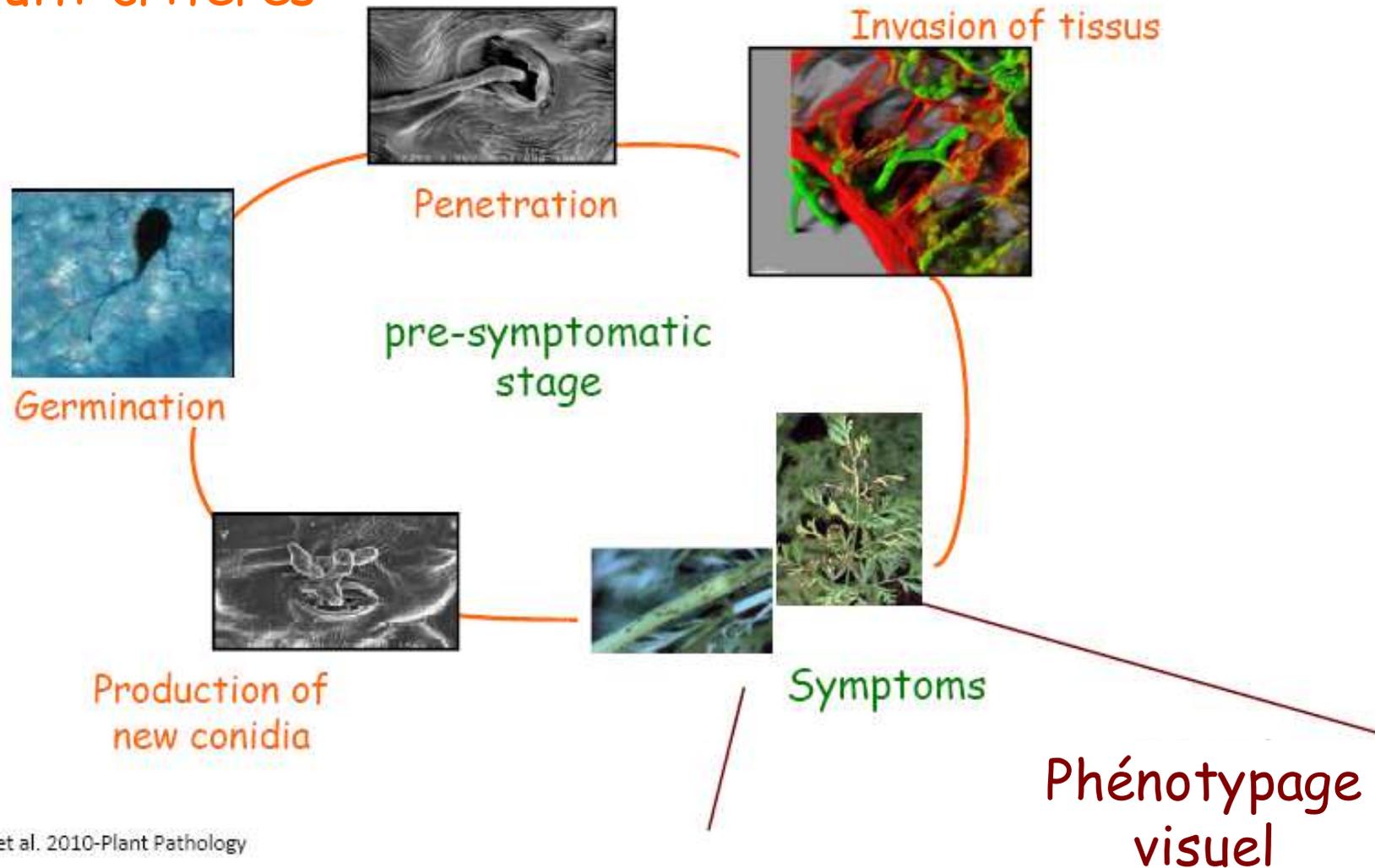
171 F2:3 progenies
(Le Clerc, Pawelec *et al.*, 2009- TAG)



286 F2:3 progenies
(Le Clerc *et al.*, 2015- TAG)

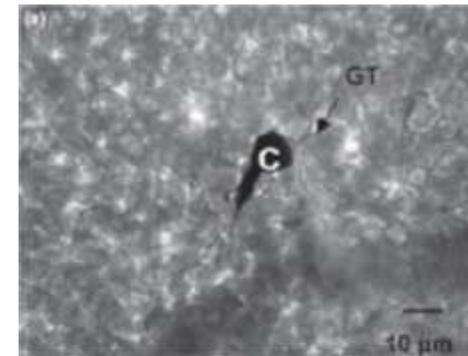
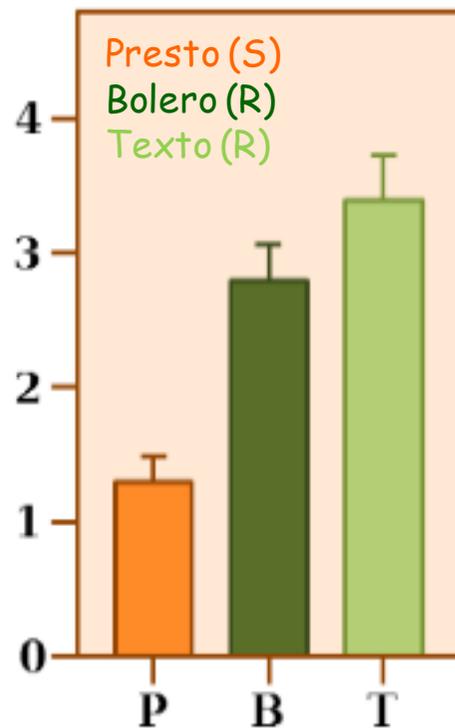
Cycle biologique d'*A. dauci* sur la carotte

Phénotypage
multi-critères

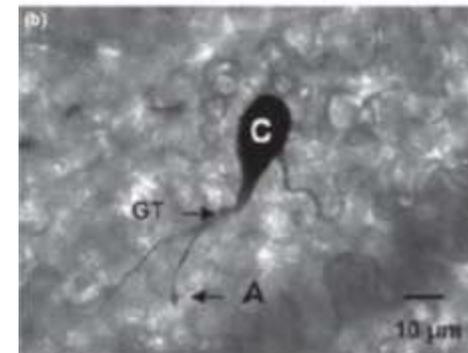


Evaluer l'aptitude à la pénétration du champignon

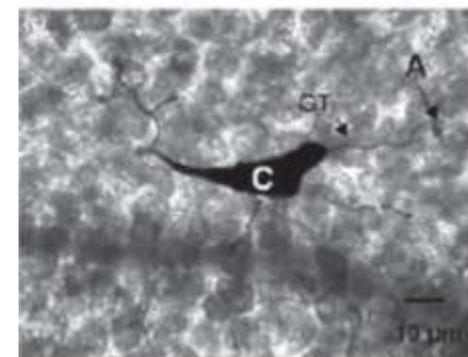
✓ nombre moyens de tubes germinatifs (tg) émis par conidie (Boedo *et al.*, 2010-Plant Pathol.)



Presto (S)



Bolero (R)



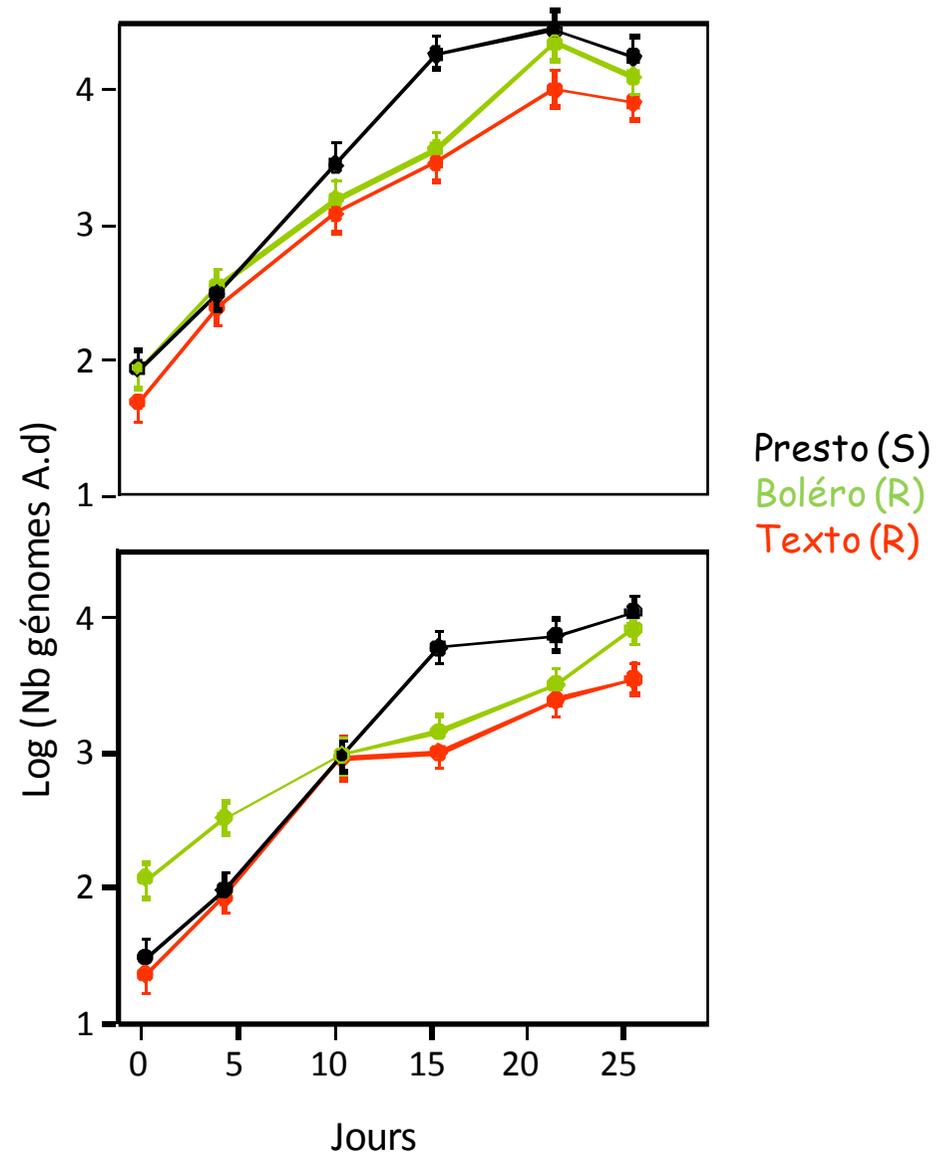
Texto (R)

Figure 1 Development of *Alternaria dauci* conidia (isolate #2) on the leaf surface of susceptible carrot cv. Presto (a), or partially resistant cvs Bolero (b) and Texto (c) at 1 day post-inoculation. Leaf samples were stained with methyl blue and observed by light microscopy. A, appressoria-like structure; C, conidium; GT, germ tube.

Evaluer le taux d'envahissement des tissus de la plante

✓ Méthode QPCR
(Boedo *et al.*, 2010-Plant Pathol.)

A2



Test en goutte sur feuilles non détachées

✓ Evaluation du nb de symptômes
(Boedo *et al.*, 2010)



- ✓ Même résolution que test "classique"
- ✓ 5 plantes par genotype



Résistant



Sensible

Programme envisagé

Phénotypage "classique" sur 3 parents de descendances (2R, 1S) et sur 2 descendances

Tunnel et champ



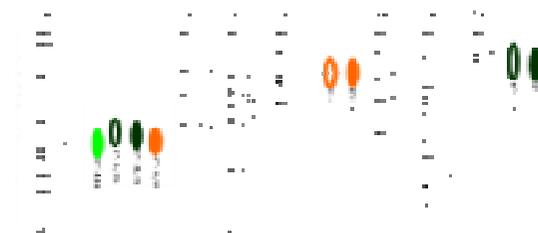
Méthodes de phénotypage "alternatives" sur 3 parents de descendances en ségrégation



Méthodes de phénotypage "alternatives" **discriminantes** sur parents R/ S testées sur 2 descendances

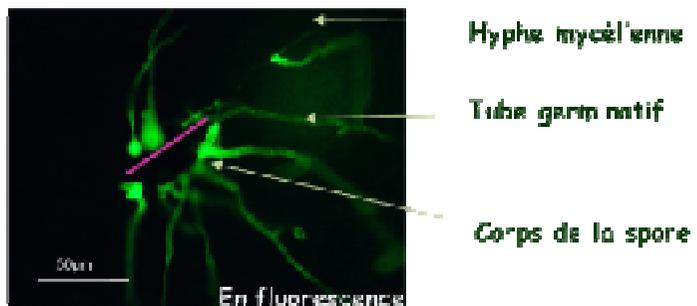
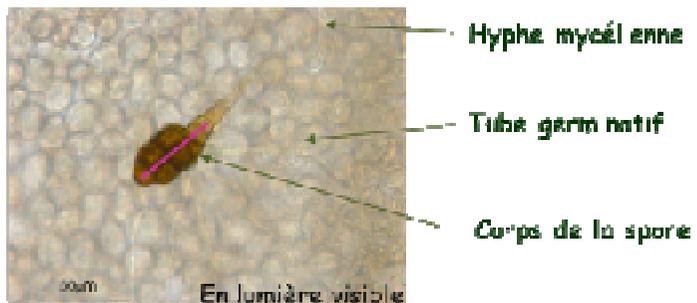
Analyse **QTLs** pour méthode(s) retenue(s)

Objectif: nouveaux QTLs ou IC + petits



Méthode testée	Phase ciblée
Comptage du nb de tubes germinatifs/spore	Pénétration du champignon
qPCR	Envahissement des tissus de la plante
Thermographie	phase présymptomatique
Mesures de variables de fluorescence- Multiplex	phase présymptomatique
Mesures de fluorescence de chlorophylle sur feuille non détachée, détachée, canopée- Caméra: fixe Open fluorcam	phase présymptomatique
Comptage du nb de symptômes	phase symptomatique
Application de filtrats bruts de culture sur plante entière ou feuille détachée	phase symptomatique
Analyse d'images de feuilles scannées	phase symptomatique
Phénotypage en plaque sur plantules	phase symptomatique
Phénotypage "classique"	phase symptomatique

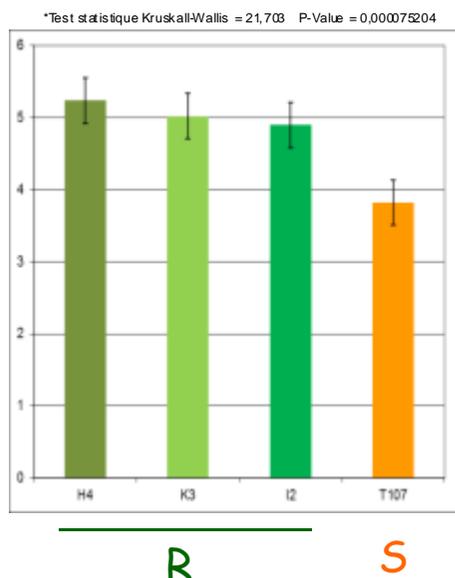
Comptage du nombre de tubes germinatifs par spore



Phase
présymptomatique

+

Confirme Boedo *et al.*, (2010)
Différenciation R/S
Compréhension mécanismes de
résistance



24hpi

-

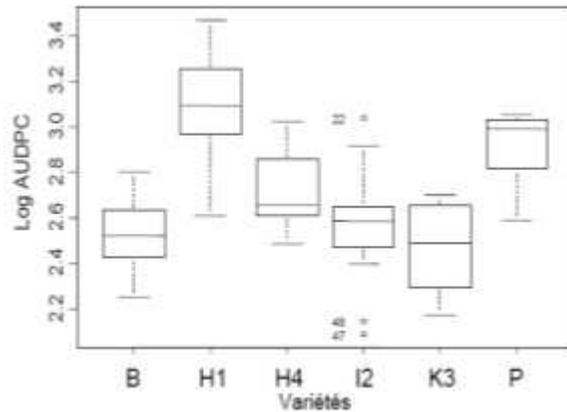
Pas de différence entre R
Phénotypage haut-débit

qPCR pour évaluer le degré d'envahissement des tissus de la plante

Inoculation par goutte

- 6 variétés x 4 plantes x 5 dates de semis et d'inoculation

Phase
présymptomatique



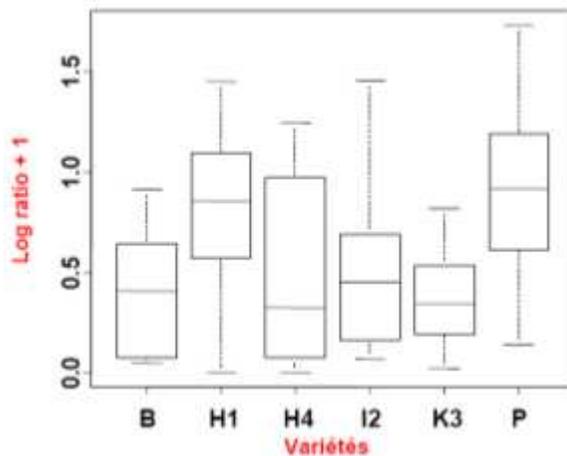
Symptômes

a	H1	3.09
b	P	2.91
c	H4	2.71
cd	I2	2.56
d	B	2.52
d	K3	2.46

→ 4 groupes

+

Compréhension mécanismes de résistance



Log ratio A dauci / ITS + 1

a	P	0.91
ab	H1	0.78
bc	I2	0.50
c	H4	0.47
c	B	0.38
c	K3	0.36

→ 3 groupes

-

Différenciation AUDPC > qPCR

qPCR: nécessite un phénotypage précis (méthode en goutte)

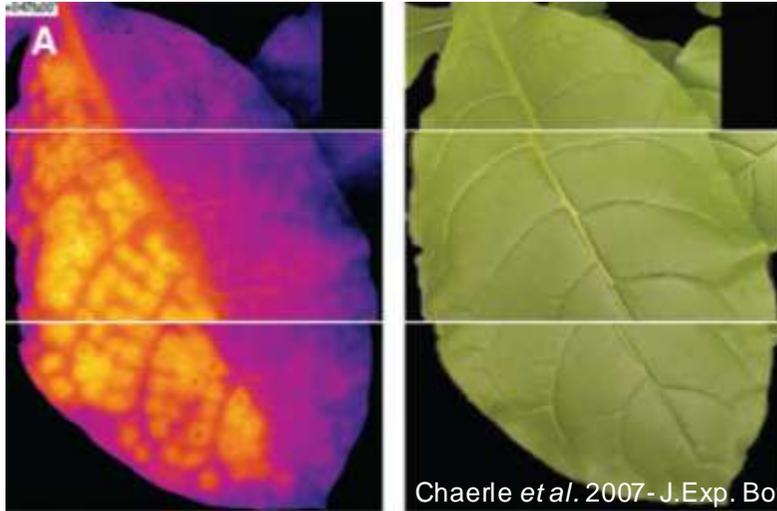
Phénotypage haut-débit

Thermographie

Phase
présymptomatique

TMV/ Tabac

2 dpi



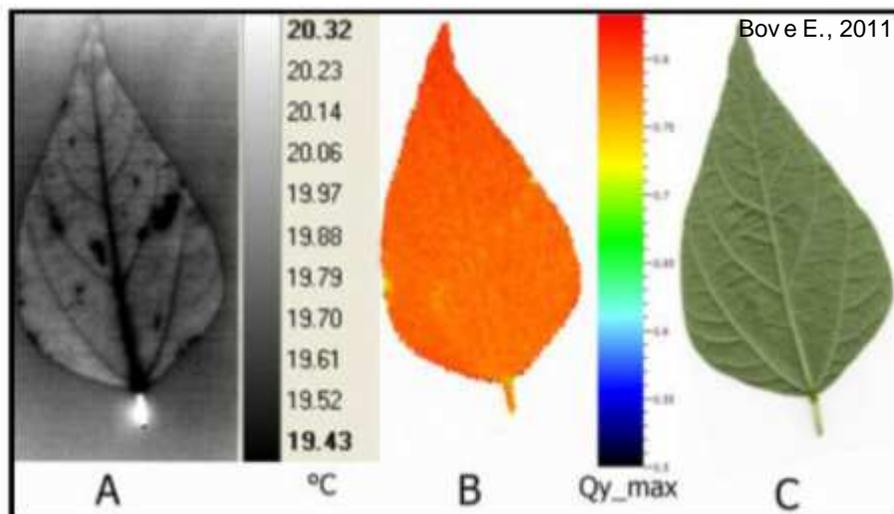
Imagerie des radiations thermiques émise par les plantes

Stress biotiques/abiotiques → modification de température en surface de la feuille

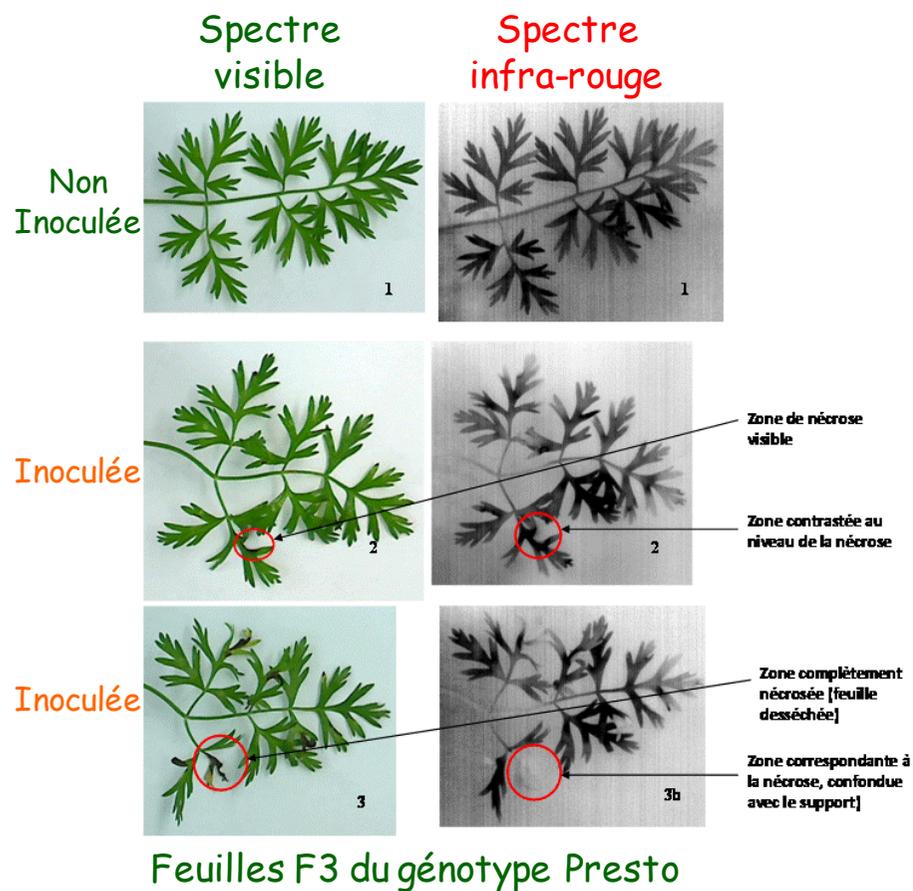
Outil prédictif de l'évolution des symptômes

X.a. pv.phaseoli / Haricot

4 dpi



Thermographie



Infra-Rouge: autant de contrastes chez I/NI

Suivi apparition des symptômes: non prédictif

Manipulation des plantes entières sur une cinétique

Observation d'une seule feuille à la fois

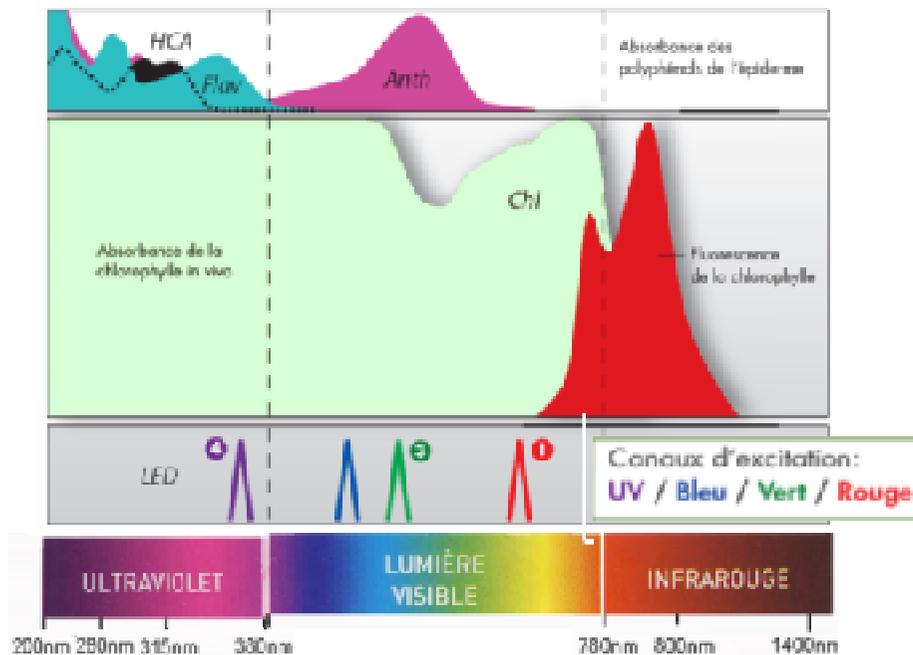
Pb de résolution/hauteur caméra

Mesures de variables de fluorescence par Multiplex



Fluorimètre portable

Mesures non destructives en mode ponctuel ou continu sur une surface de 8cm de diam



Signaux et ratio de signaux

	Excitation (nm)			
Emission (nm)	UV (375)	Blue (B) (470)	Green (G) (516)	Red-Orange (R) (625)
YF (590)	YF_UV	YF_B=R	YF_G=R	YF_R=R
RF (685)	RF_UV	RF_B	RF_G	RF_R
FRF (735)	FRF_UV	FRF_B	FRF_G	FRF_R

	YF_UV	RF_G	FRF_G	RF_R	FRF_R
FRF_UV	BRR FRF	NBI_G	-	NBI R	FER_RUV FLAV
RF_G	-	-	SFR_G	-	-
FRF_G	-	-	-	-	FER_RG ANTH
RF_R	-	-	-	-	SFR R

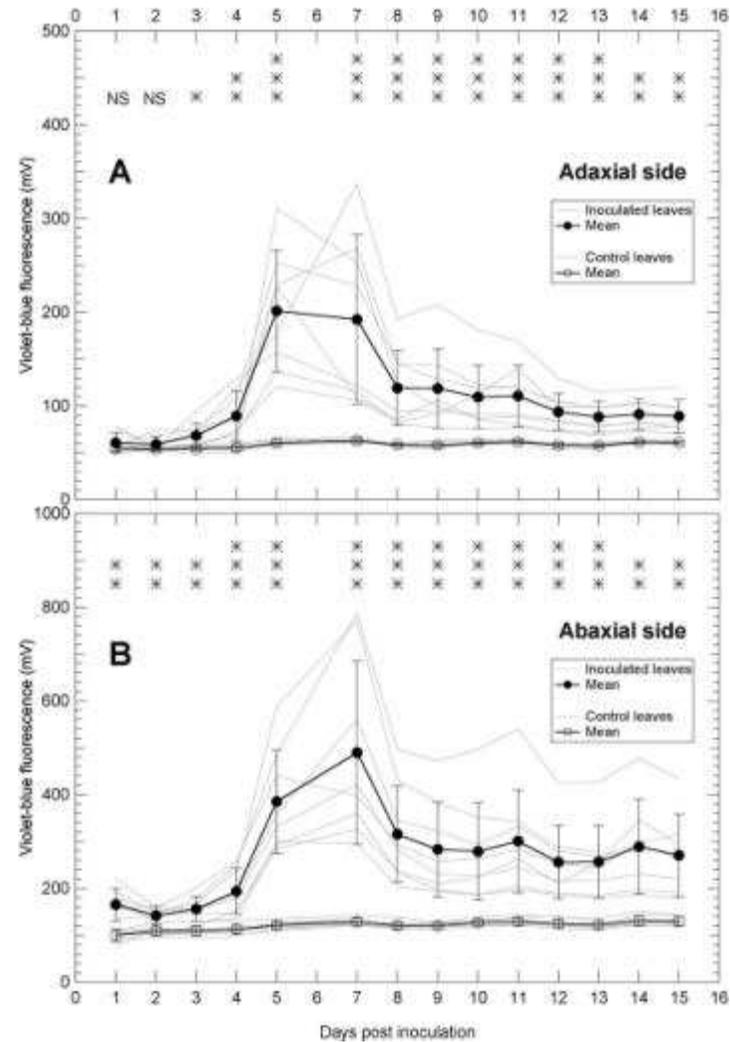
Mesures de la fluorescence de la chlorophylle

Mesures des polyphénols : flavonoïdes et annocyanes

Mesure d'indicateurs de stress biotiques et abiotiques

Mesure de la chlorophylle et des composés

Changes in violet–blue autofluorescence of grapevine leaves during *P. viticola* infection followed by the Mx-330 sensor.



Sébastien Bellow et al. J. Exp. Bot. 2012;jxb.ers338

Mesures de variables de fluorescence par Multiplex

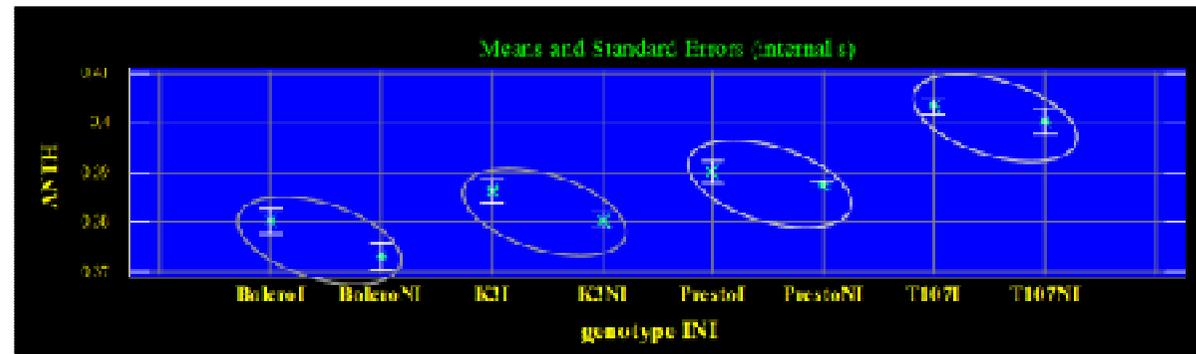
4 variétés I/NI, cinétique de mesures

Mise au point: variation au sein d'une plante (F3, F6),
variation intra génotype, impact hauteur couvert
végétal,...

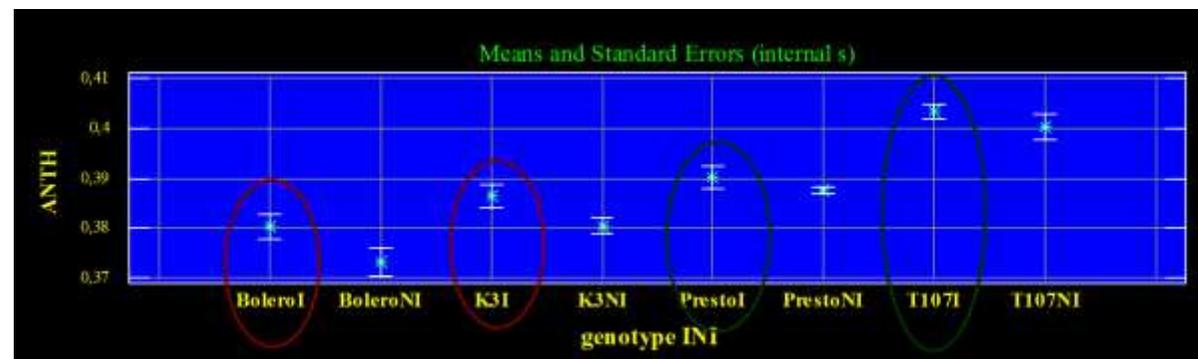


Variation intra-génotype

- 7 plantes
- 4 mesures / plante
- 1 Surplomb et 3 côtés



➔ I > NI



Classement logique des variétés
Différenciation des 4 génotypes: B < K3 < P < T107

Mesures de variables de fluorescence par Multiplex



Tests au champ (Mode balayage)

Non destructif

Tester stade jeune



Répétabilité: augmenter nb de mesures

Coût location

Inoculation de feuilles détachées avec des filtrats bruts de culture d' *A. dauci*

Objectif: Tester des filtrats bruts ayant un effet toxique
sur culture cellulaire sur feuille détachée

Ho: la résistance partielle de la carotte à *A. dauci*
serait en partie due à la résistance aux toxines

Matériel et Méthodes

Feuille n°3 - Presto et Boléro (semis 7 ou 9 semaines)

Filtrat brut de culture d'*A. dauci* dans milieu liquide Gamborg 24°C

→ pendant 9j (Traitement 2)

→ pendant 21j (Traitement 3)

10 µL filtrat brut - 6 dépôts / feuille

Témoin - = milieu liquide Gamborg nonensemencé (Traitement 1)

Témoin eau = Eau distillée stérile pH 5.8 (Traitement 0)

3 dpi: nécroses visibles → acquisition images

Traitement des images sous ImageJ → calcul de la surface nécrosée



Témoin milieu (T1)

Culture 9jrs (T2)

Culture 21jrs (T3)

Presto

Boléro

Presto

Boléro

Presto

Boléro

40 X



10 X



1 X



EAU

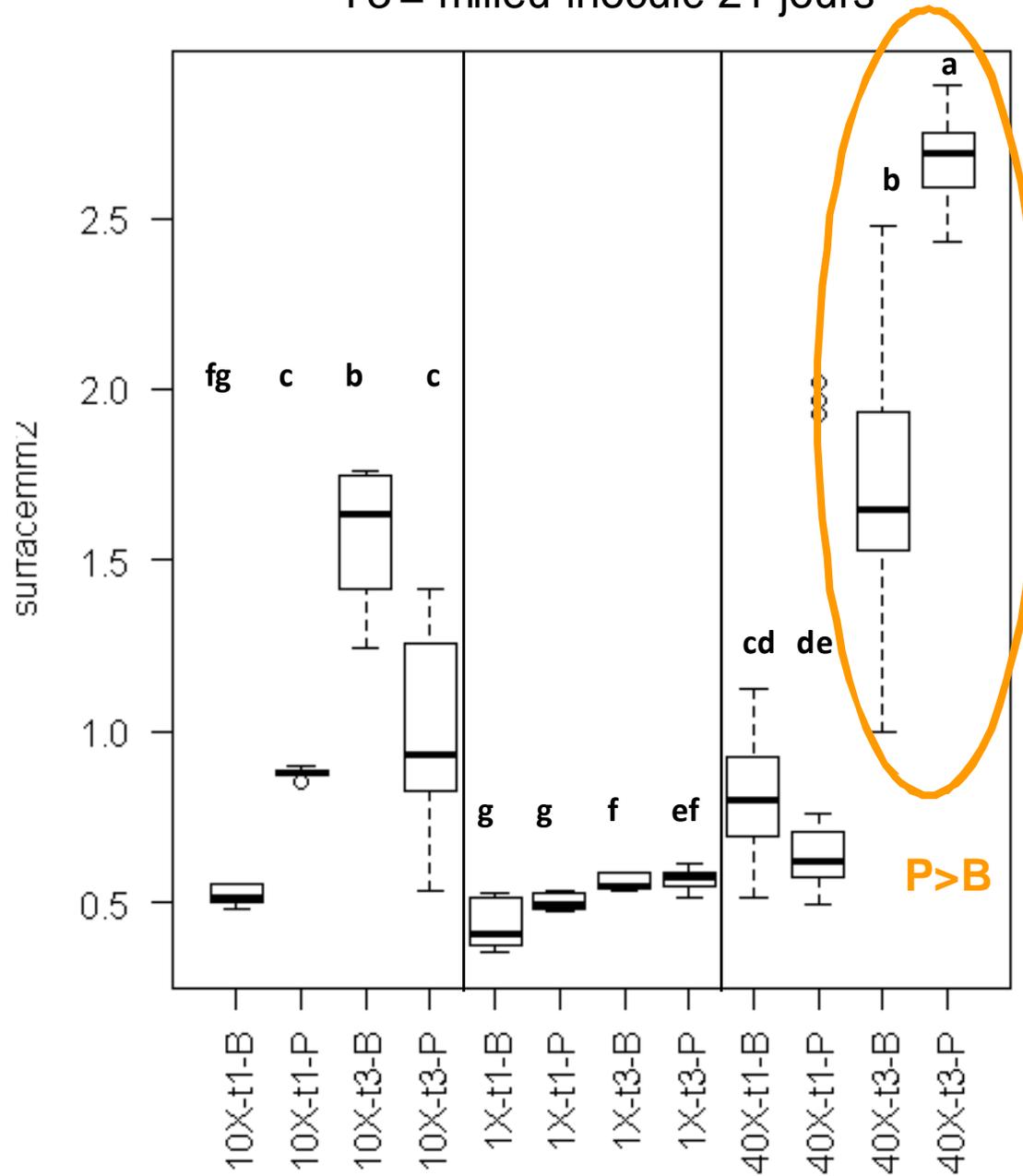
Presto

Boléro



T1 = milieu non inoculé

T3 = milieu inoculé 21 jours

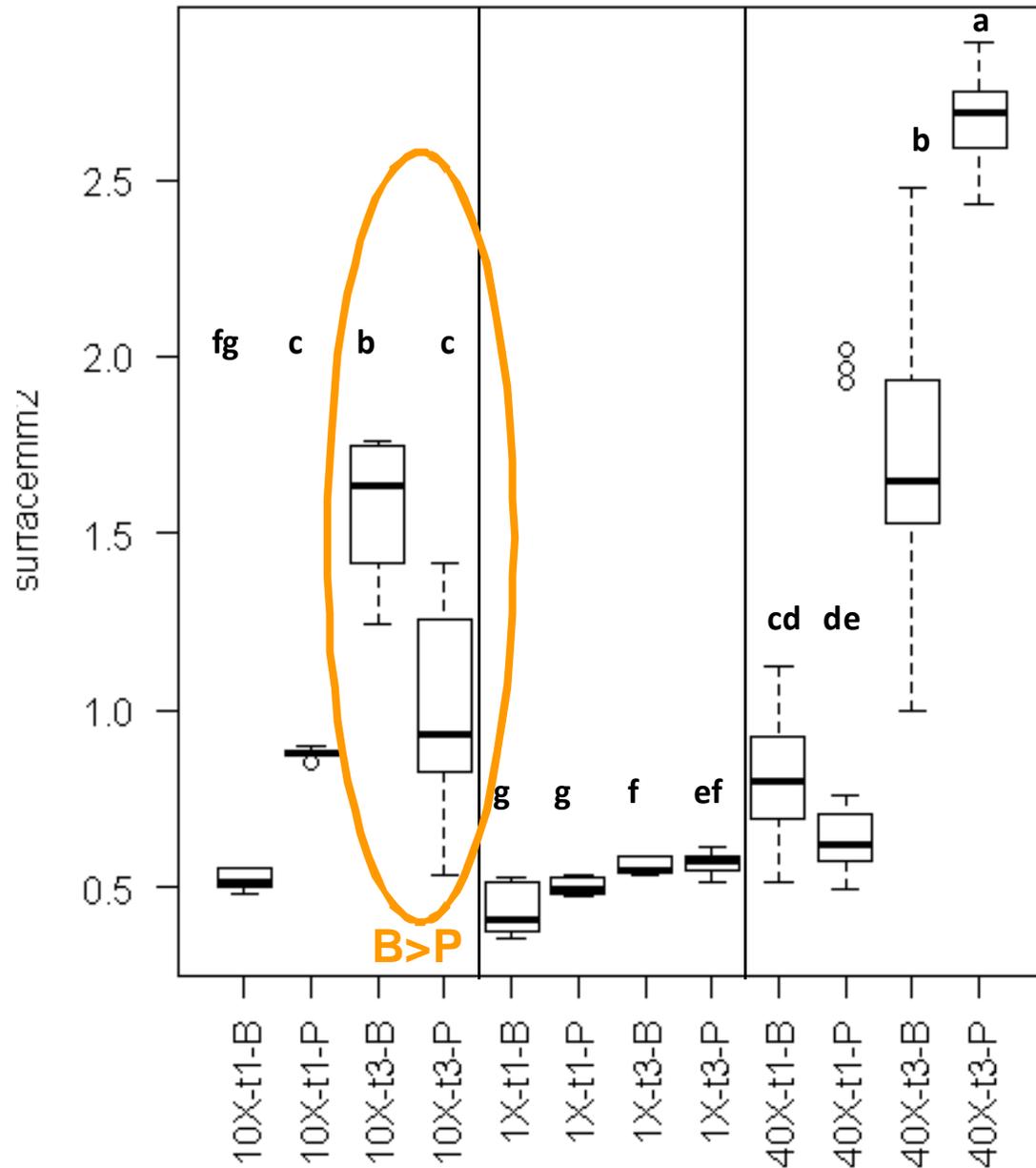


Kruskal-Wallis test's
Pvalue : 0

Groups	Treatments	mean of the ranks	mean surface mm2
a	40X-t3-P	160.8	2.67
b	40X-t3-B	130.3	1.72
b	10X-t3-B	126.9	1.58
c	10X-t1-P	93.67	0.88
c	10X-t3-P	89.67	0.98
cd	40X-t1-B	74.94	0.80
de	40X-t1-P	58.07	0.77
ef	1X-t3-P	39.8	0.57
f	1X-t3-B	37.08	0.56
fg	10X-t1-B	22.5	0.52
g	1X-t1-P	14.42	0.50
g	1X-t1-B	8.167	0.43

T1 = milieu non inoculé

T3 = milieu inoculé 21 jours



Kruskal-Wallis test's

Pvalue : 0

Groups	Treatments	mean of the ranks	mean surface mm2
a	40X-t3-P	160.8	2.67
b	40X-t3-B	130.3	1.72
b	10X-t3-B	126.9	1.58
c	10X-t1-P	93.67	0.88
c	10X-t3-P	89.67	0.98
cd	40X-t1-B	74.94	0.80
de	40X-t1-P	58.07	0.77
ef	1X-t3-P	39.8	0.57
f	1X-t3-B	37.08	0.56
fg	10X-t1-B	22.5	0.52
g	1X-t1-P	14.42	0.50
g	1X-t1-B	8.167	0.43

Test miniaturisé au stade plantules



Culture en microplaque
Eau-agar 1.5% + Gamborg

Inoculation

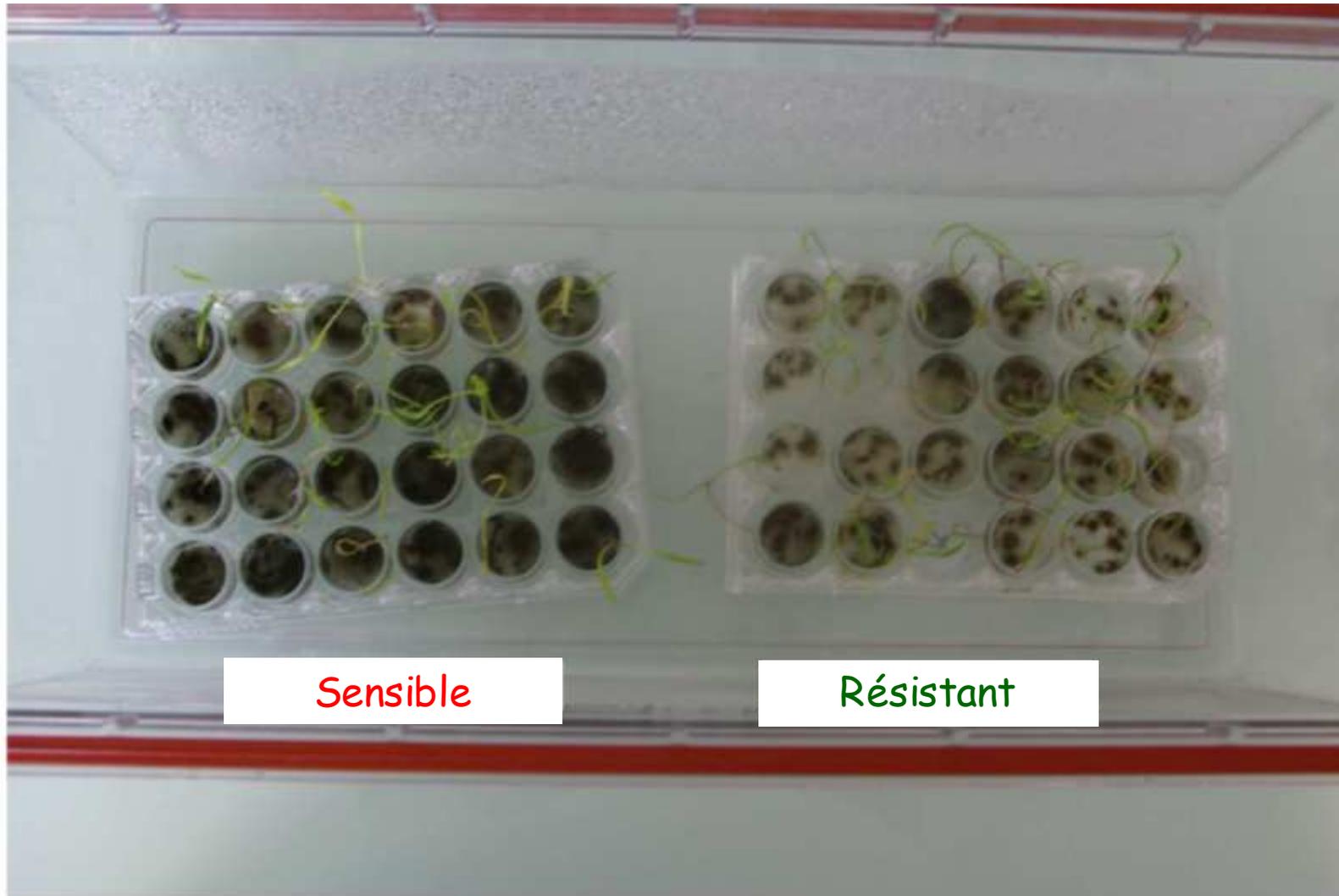
13j (stade cotylédons)

A. dauci (souche P2) : 5000sp/ml

Incubation

miniserres 24°C, photopériode 6h-22h

Test miniaturisé au stade plantules

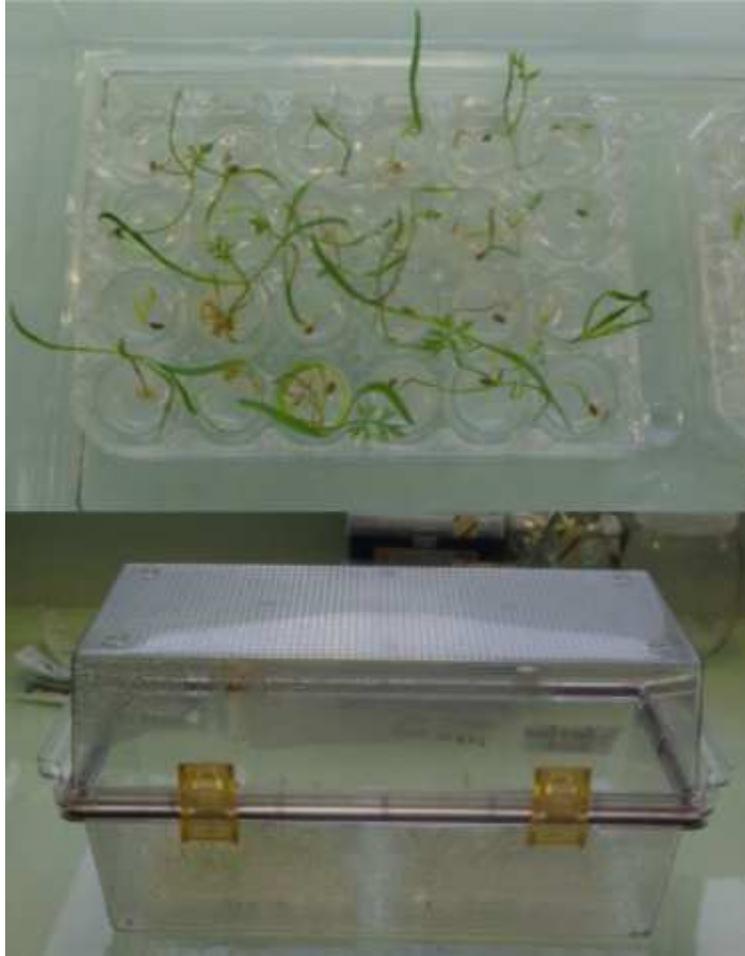


Dénombrement
plantules avec
symptômes

15/24 62,5%

3/27 11%

Test miniaturisé au stade plantules



Test précoce

Lecture automatisable



Étapes limitantes: désinfection
et mise en CIV

Reproductibilité (pb miniserres)

CONCLUSION

- ✓ Adaptation des méthodes à chaque nouveau pathosystème
- ✓ Problématique Carotte: feuille très découpée, « fragile », sensible à la dessiccation
- ✓ besoin de phénotypage haut débit

Sorties du projet:

Recherche: compréhension des mécanismes de résistance

Amélioration modèles de prévision des risques (Ctifi)

Pas de test utilisable actuellement en évaluation variétale

Remerciements

✓ Equipe QuaRVeg

Anita Suel
Sébastien Huet
Romain Berruyer
Latifa Hamama
Linda Voisine
Mickaël Lecomte
Mathilde Briard

Elodie Auperpin
Sabrina Marquès

✓ HMClause

Perrine David
Monique Henry
Robert Prieur

✓ VILMORIN

Laure Barrot

✓ Equipe Fungisem/EmerSys

Pascal Poupard
Stéphanie Bersilland
Tristan Boureau

✓ LISA

David ROUSSEAU
Etienne BELIN

✓ INEM

✓ Et les stagiaires...

Julien Lambert
Lauriane Cayzac

✓ SONAS

Jean-Jacques Helesbeux

✓ CTPS- Ministère de l'Agriculture