

Université d'Angers
UFR Sciences
2, Boulevard Lavoisier
49045 ANGERS Cedex 01

AGROCAMPUS OUEST
65 rue de St Brieuc, CS 84 215, BP
35042 - RENNES Cedex
Université de Rennes I
1, 2 rue du Thabor, CS 46510 - 35065
RENNES Cedex

GEVES
Expertise & Performance
Groupe d'Étude et de contrôle
des Variétés Et des Semences
Station Nationale d'Essais de Semences

GEVES - SNES
25 rue Georges Morel - CS
9002449071
BEAUCOUZE cedex
Tel +33 (0)2 41 22 58 00

Mémoire de Fin d'Etudes

Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie et Technologie du Végétal

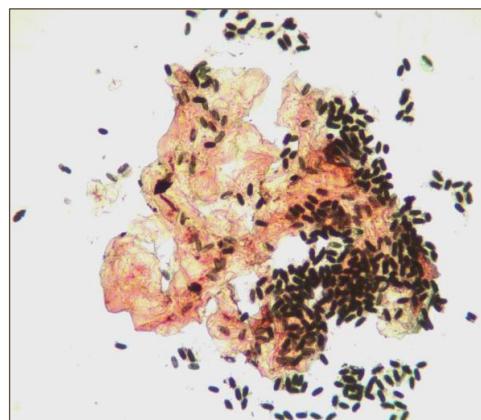
Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)

Parcours : I Productions Végétales Spécialisées / Option : Semences et plants

Année universitaire 2015-2016

Mise au point d'un test de résistance du piment contre les nématodes à galles *Meloidogyne incognita*

Par : **Fabien VIALLE**



Soutenu à Angers le : **15 septembre 2016**

Maître de stage : Geoffrey ORGEUR

Université d'Angers
UFR Sciences
2, Boulevard Lavoisier
49045 ANGERS Cedex 01

AGROCAMPUS OUEST
65 rue de St Brieuc, CS 84 215, BP
35042 - RENNES Cedex
Université de Rennes I
1, 2 rue du Thabor, CS 46510 - 35065
RENNES Cedex



GEVES
Expertise & Performance
Groupe d'Étude et de contrôle
des Variétés Et des Semences
Station Nationale d'Essais de Semences

GEVES - SNES
25 rue Georges Morel - CS
9002449071
BEAUCOUZE cedex
Tel +33 (0)2 41 22 58 00

Mémoire de Fin d'Etudes

Master 2 Sciences Technologie Santé Mention Biologie et Technologie du Végétal

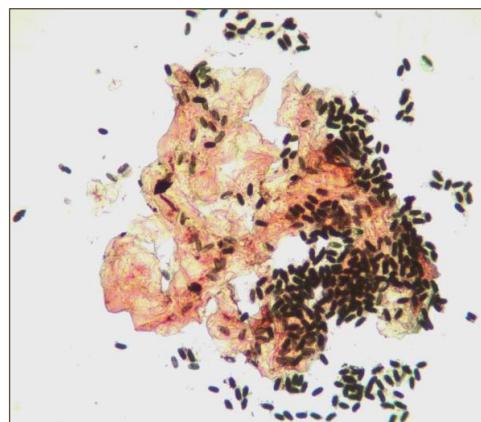
Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV)

Parcours : I Productions Végétales Spécialisées / Option : Semences et plants

Année universitaire 2015-2016

Mise au point d'un test de résistance du piment contre les nématodes à galles *Meloidogyne incognita*

Par : Fabien VIALLE



Soutenu à Angers le : 15 septembre 2016

Maître de stage : Geoffrey ORGEUR

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT M2 PROTeV 2015-2016

Je, soussigné (e) : **Fabien VIALLE**

Déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

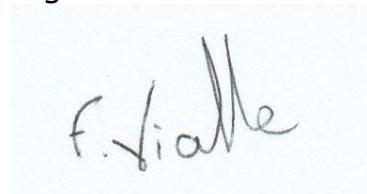
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour ce rapport, rédigé au cours de mon master 2 ProTeV.

Je m'engage également à respecter les consignes données pour la rédaction de ce rapport.

A : **Beaucouzé**

Le : 02/09/16

Signature :



f.vialle

Remerciements :

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements à Mme Valérie GRIMAUT, directrice du laboratoire de Pathologie de la SNES et Mme Sophie PERROT, responsable des activités de tests de résistance, pour avoir accepté ma candidature pour travailler sur ce sujet de stage.

Je souhaite également remercier mon maître de stage Mr Geoffrey ORGEUR, responsable de projets ainsi que Mme Sandrine HOUDAULT, référent technique concernant les nématodes *Meloidogyne* et *Heterodera*, pour leur confiance et le temps consacré à répondre à mes questions. Leurs conseils et leur soutien m'ont été d'une grande utilité tout au long du stage.

Je tiens également à remercier Mme Nathalie MARTEU, de l'INRA Sophia-Antipolis, pour nous avoir prodigué de nombreux conseils afin de mener à bien les essais d'extraction de larves à partir du protocole INRA.

Finalement, je remercie chacune des personnes ayant participées, de près ou de loin, aux activités de mon stage, ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Pathologie de la SNES avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, pour leur accueil, leur sympathie et leur esprit d'équipe.

Liste des abréviations :

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

cM : centiMorgan (unité de mesure)

COV : Certificat d'Obtention Végétale

CTPS : Comité Technique Permanent de la Sélection

DHS : Distinction – Homogénéité – Stabilité

GEVES : Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences

HR : réaction d'hypersensibilité

IG : Indice de Galles

IITA : International Institute of Tropical Agriculture

INOV : Instance Nationale des Obtentions Végétales

INRA : Institut National de Recherche en Agronomie

OCVV : Office Communautaire des Variétés Végétales

PACA : région Provence - Alpes - Côte d'Azur

SEV : Secteur d'Etude des Variétés

SNES : Station Nationale des Essais de Semences

UPOV : Union pour la Protection des Obtentions Végétales

VATE : Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale

Glossaire :

Les définitions en bleu sont tirées du dictionnaire en ligne Larousse.

Anthracnose : Maladie fongique reconnue chez la vigne ou diverses légumineuses (ex : haricot, pois) se traduisant par des taches nécrotiques sur les parties aériennes.

Céphalique : réfère à la tête. Cette partie est repérable par la présence d'une bouche.

Chromosome : Structure en forme de bâtonnet constituant le support physique de l'hérédité.

Cluster : Partie d'un chromosome sur lequel sont réunis plusieurs gènes d'intérêt.

Endophyte : la phase endophyte se déroule à l'intérieur des tissus végétaux.

Epinastie foliaire : mouvement des feuilles vers le bas.

Exophyte : la phase exophyte se déroule à l'extérieur des tissus végétaux.

Galle : excroissance d'un tissu végétal (des racines dans le cas de *Meloidogyne incognita*).

Gène : séquence d'ADN conditionnant la synthèse d'une ou plusieurs protéines et donc, la manifestation et la transmission d'un caractère héréditaire.

Inoculum : Substance contenant le germe à introduire en vue d'infecter un organisme.

Indice de galles : relatif au niveau de symptômes observés.

Légumineuses : plantes dicotylédones, appartenant à la famille des Fabacées, dont le fruit est une gousse.

Locus : Emplacement précis d'un gène sur le chromosome qui le porte.

Nématodes phytoparasite : vers némathelinthe, de forme cylindrique et non segmenté, parasite de plante.

Pathogène : qui provoque une maladie.

Ponte : une ponte (ici de *Meloidogyne incognita*) correspond aux œufs ainsi qu'à la guange protectrice qui les enrobe. On parle aussi de « masse d'œufs ».

Pyriforme : en forme de poire (par opposition à **vermiforme** : en forme de ver).

Pyramiding : construction génétique cumulant plusieurs gènes d'intérêt.

Stylet : pièce buccale permettant au nématode de percer les tissus végétaux.

Syncytium : masse cytoplasmique comportant plusieurs noyaux.

Verticilliose : Maladie fongique végétal provoquant sa mort par obstruction des vaisseaux.

Liste des illustrations :

Liste des figures :

Figure 1 - Symptômes sur racines de tomates par <i>Meloidogyne incognita</i>	5
Figure 2 - Illustration du système de notation de Zeck.....	5
Figure 3 - Différents stades des nématodes à galles (<i>Meloidogyne spp.</i>).....	6
Figure 4 - Morphologie et organisation des différents stades de <i>Meloidogyne spp.</i>	6
Figure 5 - Ornements de la partie céphalique des <i>Meloidogyne</i>	7
Figure 6 - Cycle biologie des nématodes à galles (<i>Meloidogyne spp.</i>).	7
Figure 7 - Masses d'œufs de <i>Meloidogyne incognita</i> sur racines de tomate.....	8
Figure 8 - Champignon nématophage (<i>Arthrobotrys irregularis</i>)	9
Figure 9 - Les gènes de résistance du piment sur un cluster du chromosome P9	11
Figure 10 - Recherche de solution contre le contournement de résistance.	12
Figure 11 - Entretien de souche <i>M. incognita</i> sur tomates (variété « Nainespomor »).	13
Figure 12- Pré-test : Méthodes d'inoculation au semis.	14
Figure 13 - Piment au stade 4 feuilles.	15
Figure 14 - Développement racinaire de piments sensibles et résistants (Pré-test).	19
Figure 15 – Observation des pontes de <i>M. incognita</i>	19
Figure 16 - Récolte de larves (essai 1).....	20
Figure 17 - Estimation des populations de larves et des pertes à J+15 (essai 1).	20
Figure 18 - Cinétique de populations de larves (essai 2)	21
Figure 19 - Comparaison des résultats de l'essai 1 et de l'essai 2.....	21
Figure 20 - Résultats du test de résistance.	22
Figure 21 - Différents niveaux de sensibilité.....	22

Liste des tableaux :

Tableau I – Echelle de notation des indices de galles par Zeck.....	5
Tableau II - Cultivars résistants aux <i>Meloidogyne</i> et leur(s) gène(s) de résistance.....	10
Tableau III - Conditions d'éclosion de larves.....	15

Liste des Annexes :

Annexe I : Macro Box Plot - Extraction de larves (essais 1 et 2).....	I
Annexe II : Analyses statistiques – Extraction de larves.....	III
Annexe III : Analyses statistiques – Test de résistance.....	IX

Table des Matières :

I- Introduction :	1
1. Contexte général de l'étude :	1
1.1. Inscription variétale et tests de résistance :	1
1.2. Problématique du stage :	2
2. Objectifs du stage :	2
2.1. La mise au point d'une méthode :	2
2.2. Activité secondaire : Amélioration méthodologique du test de résistance des crucifères à <i>Heterodera schachtii</i> :	3
3. Sujet de l'étude :	3
3.1. Le piment :	3
3.1.1. Généralité :	3
3.1.2. Principaux pathogènes :	3
3.2. Les nématodes à galles du genre <i>Meloidogyne</i> :	4
3.2.1. Diversité biologique et impact économique :	4
3.2.2. Symptômes :	5
3.2.3. Morphologie :	6
3.2.4. Biologie et cycle de vie :	6
3.2.5. Méthodes de lutte :	7
3.3. Résistance du piment aux nématodes à galles :	10
3.3.1. Définition :	10
3.3.2. Les gènes de résistances chez le piment :	10
3.3.3. Le problème de contournement et notion de durabilité de résistance :	11
II- Matériels et Méthodes :	13
1. Matériels :	13
1.1. Matériel végétal :	13
1.2. <i>M. incognita</i> :	13
2. Méthodes :	13
2.1. Entretien de l'inoculum :	13

2.2. Pré-test : Comparaison de différentes techniques d'inoculation :	14
2.2.1. Méthodes d'inoculation :.....	14
2.2.2. Système de notation des indices de galles :.....	15
2.2.3. Coloration des pontes à l'éosine :.....	15
2.3. Extraction d'œufs, éclosion et récolte de larves :	15
2.4. Mise en place d'un test de résistance :	16
2.4.1. Conditions testées :.....	16
2.4.2. Techniques d'inoculations :.....	17
2.4.3. Système de notations :.....	17
2.5. Analyses statistiques :	17
III- Présentation des résultats :	19
1. Résultats du pré-test :.....	19
2. Extraction des œufs et éclosion des larves :	20
2.1. Essai 1 :	20
2.2. Essai 2 :	21
2. Résultats du test de résistance :	22
IV- Discussion :	23
1. Pré-test :	23
2. Extraction de larves :	24
3. Test de résistance :	24
V- Conclusions et perspectives :	26
VI- Références bibliographiques :	27

I- Introduction :

1. Contexte général de l'étude :

1.1. Inscription variétale et tests de résistance :

L'investissement des établissements de sélection en recherche et création variétale est évalué à environ 10 à 15 % de leur chiffre d'affaire. Les obtenteurs protègent leur création via un système de protection légale propre à la création variétale : la Protection des Obtentions Végétales. Ce système est contrôlé à trois échelles : en France par l'INOV (Instance Nationale des Obtentions Végétales), en Europe par l'OCVV (Office Communautaire des Variétés Végétales), et à l'échelle internationale par l'UPOV (Union pour la Protection des Obtentions Végétales). L'obtenteur obtient alors un Certificat d'Obtention Végétale (COV) qui lui donne les droits exclusifs sur l'introduction sur le territoire, la production et la vente de sa variété (GEVES, 2016).

L'inscription des nouvelles variétés au Catalogue Officiel, réalisé par le CTPS, sert de conseil et d'appui auprès du ministère de l'Agriculture. Ce dernier s'appuie sur les résultats d'analyse et d'expérimentation menés par le GEVES pour la plus grande partie. Ces études sont communément appelées DHS (Distinction, Homogénéité et Stabilité) et VATE (Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale). Pour être inscrites au Catalogue Officiel, les nouvelles variétés doivent donc être distinctes des variétés existantes, homogènes et stables dans le temps, c'est-à-dire conserver leurs caractéristiques phénotypiques au fil des générations. Ces études DHS sont obligatoires pour toutes les espèces et sont harmonisées au niveau européen et mondial par l'OCVV et l'UPOV. D'autre part, les études VATE sont menées essentiellement sur les plantes agricoles et la vigne. Elles visent à valoriser les variétés nouvelles sur différents critères comme le rendement, l'adaptation aux différents milieux et itinéraires techniques, la limitation d'intrants, la résistance aux différents bio-agresseurs ou stress abiotiques, ou encore la transformation industrielle post-récolte.

Dans le cadre des études de DHS et de VATE, la résistance des variétés est évaluée par des tests de résistance menés aux champs par le SEV et/ou en conditions contrôlées (serres, modules climatiques) par le laboratoire de pathologie de la SNES. Les essais menés aux champs ont pour objectif de déterminer la résistance des variétés aux maladies - en tant que critère agronomique (VATE), dans l'objectif de réduire la quantité de pesticides et d'améliorer la qualité sanitaire. D'autre part, les essais menés en conditions contrôlées par la SNES sont réalisés pour distinguer les nouvelles variétés (DHS).

Au total, ce sont environ 7 500 analyses d'évaluation de résistance qui sont menées chaque année par le laboratoire de pathologie de la SNES. L'évaluation de la résistance variétale est réalisée pour divers pathogènes (bactéries, champignons, virus ou encore nématodes, pucerons) - 80 couples bio-agresseurs/ hôtes sont concernés (GEVES, 2016).

1.2. Problématique du stage :

Actuellement, aucun test officiel n'existe pour évaluer la résistance variétale du piment contre les nématodes à galles *Meloidogyne incognita*. Hors, ce nématode, extrêmement polyphage, est parasite d'une gamme d'hôtes très variée à l'origine de lourdes pertes en agriculture maraîchère. L'utilisation de variétés résistantes est nécessaire pour assurer un bon rendement de la culture, et limiter la pression de l'inoculum dans le sol pour les cultures suivantes. Enormément de recherches ont été réalisées ces dernières années sur la résistance du piment aux nématodes à galles (*M. incognita*), notamment par l'équipe « Interactions Plantes-Nématodes » du Centre INRA PACA. La résistance aux nématodes est aujourd'hui un critère important pour les établissements de sélection.

En prévision d'une émergence de variétés résistantes, l'objectif de cette étude est de développer et mettre en place un protocole d'évaluation de la résistance du piment contre *M. incognita*. Ce protocole sera proposé au CTPS et utilisé pour l'inscription des variétés au Catalogue Officiel.

2. Objectifs du stage :

2.1. La mise au point d'une méthode :

La mission principale du stage est de mettre en place un test d'évaluation de la résistance du piment contre les nématodes à galles *Meloidogyne incognita*. Pour y parvenir, les objectifs sont :

- Etudier à travers la littérature existante le cycle de vie du nématode et les modalités de résistance à ce pathogène chez le piment pour acquérir de meilleures connaissances sur l'interaction entre ces deux organismes,
- Définir grâce à cette étude bibliographique les modalités à comparer,
- Entretenir et multiplier la souche *M. incognita* sur tomate,
- Mettre au point un test d'évaluation de la résistance et son système de notation.

Pour répondre à ces différents objectifs, ce présent rapport exposera les protocoles mis en place ainsi que les résultats obtenus. Ces mêmes résultats seront interprétés puis discutés. Une conclusion générale quant aux essais mis en place viendra ponctuer ce rapport.

2.2. Activité secondaire : Amélioration méthodologique du test de résistance des crucifères à *Heterodera schachtii* :

Au cours de ce stage, la mise en place d'un test d'évaluation de la résistance chez le piment contre *M. incognita* n'a pas été la seule mission. L'amélioration du test d'évaluation de la résistance des crucifères contre les nématodes à kystes *Heterodera schachtii* fait partie du contrat de stage comme mission secondaire. L'objectif de celle-ci est de rendre plus attractif le test proposé par la SNES, jugé trop éloigné du test Allemand (Julius Kühn Institute, JKI). Cependant, les activités concernant ce pathosystème ne seront pas présentées dans ce rapport.

3. Sujet de l'étude :

3.1. Le piment :

3.1.1. Généralité :

Originaire d'Amérique latine, le piment a été introduit en Europe par Christophe Colomb au XV^{ème} siècle. Il fût introduit en Afrique et en Asie à travers les différents échanges internationaux de l'époque. Le piment est aujourd'hui cultivé partout dans le monde dans les régions tropicales à tempérées du fait de sa très grande diversité et de sa capacité à s'adapter à des milieux aux conditions agro-climatiques variées (Nondah, 2004 ; Barbary, 2014). Une importante diversité de formes et de couleurs de piments existe, essentiellement due à la forte pression de sélection subie après sa domestication. Les piments sont regroupés dans le genre *Capsicum*. Ce genre regroupe une vingtaine d'espèces différentes dont cinq domestiquées : *C. annum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* et *C. baccatum*. Leur production et leur répartition sont très inégales. Les deux dernières sont localisées principalement en Amérique du Sud tandis que les trois premières sont présentes partout dans le monde. L'espèce la plus importante en nombre de cultivars est *C. annum* (Barbary, 2014). D'après la base de données de la Commission Européenne, 2 287 variétés sont inscrites à ce jour (European Commission, consulté le 30/08/16). En 2011, 33 millions de tonnes de piments ont été produits. Il s'agit de la première production mondiale concernant les épices et la deuxième production maraîchère derrière la tomate (pomme de terre exclue) (FAO, 2014. In : Barbary, 2014). Les piments sont utilisés principalement pour l'alimentation en tant que légumes ou bien en tant que condiments ou épices.

3.1.2. Principaux pathogènes :

Du fait de l'étendue de sa répartition géographique, le piment est sujet à de nombreuses maladies provoquées par un large panel de bio-agresseurs. De plus, les pratiques culturales

de certaines régions du monde, pratiquant la culture intensive ou la monoculture (voire même la culture monovariétale), favorisent l'émergence des maladies.

Parmi les bio-agresseurs identifiés, de nombreux virus sont dommageables contre le piment : virus Y de la pomme de terre (PVY), virus de la mosaïque du concombre (CMV), virus de la mosaïque du tabac (TMV) ou encore le virus de la maladie bronzée de la tomate (TSWV). Les principaux champignons pathogènes du piment sont : *Phytophthora capsici* (responsable de la pourriture du collet et des fruits), *Leveillula taurica* (responsable de l'oïdium), *Verticillium dahliae* (responsable de la verticilliose : flétrissement et jaunissement), *Colletotrichum spp* (responsable de l'antracnose), *Fusarium oxysporum* (responsable du flétrissement vasculaire). *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* et *Ralstonia solanacearum* respectivement à l'origine de tâches bactériennes et d'une épinastie foliaire entraînant un flétrissement, sont les principales bactéries pathogènes identifiées sur piment. De nombreux insectes comme les pucerons, les mites ou encore les thrips sont également dommageables pour leur culture. Enfin, les nématodes à galles du genre *Meloidogyne*, développés ci-dessous, sont des pathogènes importants chez le piment (Sarah-Babu *et al.*, 2011 ; Barbary, 2014).

3.2. Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* :

Le phylum des *Nematoda* comprend plus de 26 000 espèces décrites dans la littérature mais la biodiversité de ce phylum est estimée à plus d'un million (Hugot *et al.*, 2001). Présents dans la plupart des milieux, les nématodes existent sous forme libre dans l'eau ou dans le sol. D'autres espèces sont décrites comme étant des parasites chez les animaux (dont l'Homme), les champignons, les insectes ou les plantes. Les nématodes phytoparasites, estimés à 4500 espèces environ, sont répartis en deux ordres : l'ordre des *Dorylaimida* (vecteurs de virus) et l'ordre des *Thylenchida*, le plus important en termes d'espèces (Barbary, 2014). Ce dernier comprend la famille des *Heteroderidae* dont font partie les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* (HYPPZ, consulté le 04/03/2016).

3.2.1. *Diversité biologique et impact économique :*

Ces nématodes phytoparasites qui entraînent un renflement au niveau du système racinaire, sont des vers telluriques microscopiques retrouvés dans de nombreuses régions du monde. Ces renflements communément appelés « galles », sont à l'origine de leur nom : les nématodes à galles ou « *Root-Knot Nematodes* » en anglais. Plus de 90 espèces du genre *Meloidogyne* sont décrites dans la littérature dont 23 sont présentes sur le continent Européen. Trois espèces de ce genre : *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*, causent



Figure 1 - Symptômes sur racines de tomates par *Meloidogyne incognita*.

A gauche : galles des racines de tomates ; à droite : nématodes *M. incognita* dans la racine, coloration à la fuchsine acide (INRA-Sophia, 2008 dans WebTimeMedias, 2008).

Tableau I – Echelle de notation des indices de galles par Zeck.

(d'après Netscher & Sikora, 1990, in : Dijan-Capralino et al., 2009)

0	système racinaire complet et sain ; pas d'infestation	1	très peu de galles de petite taille
2	petites galles plus facilement détectables	3	nombreuses petites galles ; chevelu racinaire encore complet
4	nombreuses petites galles ; quelques grosses galles ; système racinaire fonctionnant encore	5	25% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
6	50% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus	7	75% du système racinaire comportant des galles et ne fonctionnant plus
8	quasiment plus de radicelles ; chapelets de grosses galles sur les racines principales ; la plante ne peut plus se nourrir	9	système racinaire réduit et rempli de grosses galles empêchant la plante de se nourrir
10	plante et racines mortes		

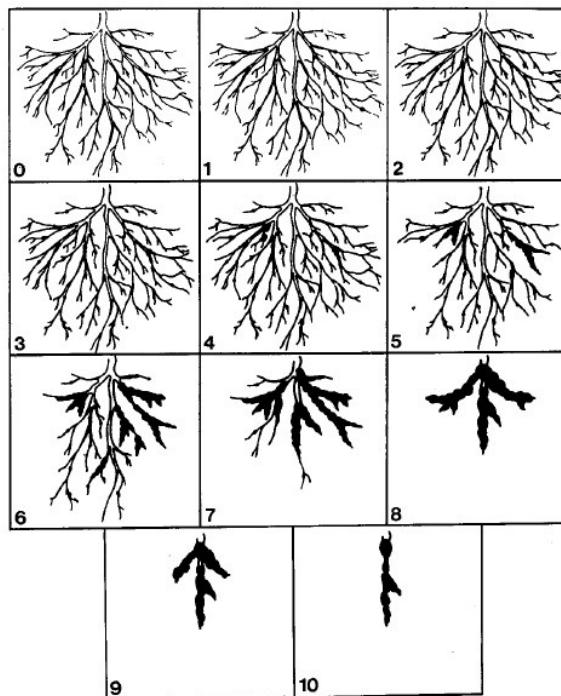


Figure 2 - Illustration du système de notation de Zeck.

(d'après Netscher & Sikora, 1990, in : Dijan-Capralino et al., 2009)

d'importants dégâts en culture sous abris autour du bassin Méditerranéen et dans le Nord de l'Europe (Barbary, 2014).

Le genre *Meloidogyne* est extrêmement polyphage. Les familles les plus sensibles sont les Solanacées, les Cucurbitacées et les Légumineuses – des familles végétales économiquement importantes en maraîchage. Des plantes d'autres familles sont également considérées comme hôtes des *Meloidogyne*, comme par exemple la carotte, la laitue, l'endive ou encore l'artichaut (HYPPZ, consulté le 04/03/2016). En région PACA, qui est un fort bassin de production, 40% des producteurs maraîchers ont des problèmes d'infestation de leur culture par des nématodes *Meloidogyne* (Dijan-Caporalino, 2010). Au niveau mondial, les nématodes phytoparasites causeraient une perte de plus 100 milliards de dollars par an dont la moitié serait causée uniquement par le genre *Meloidogyne*. Cette perte correspond d'une part aux dommages directs occasionnés par les nématodes, mais également aux dommages liés aux lésions au niveau des racines qui constituent une « porte d'entrée » pour d'autres pathogènes tels que les champignons ou les bactéries (Barbary, 2014).

M. incognita, est l'espèce la plus répandue des nématodes phytoparasites et donc à l'origine de lourdes pertes économiques. Deux tiers des symptômes de galles seraient causés par cette espèce dans les régions tropicales et subtropicales. De nombreuses plantes sont considérées comme hôtes potentiels pour ce nématode, dont une grande partie cultivée (coton, soja, tabac, pomme de terre, café, tomate, aubergine, concombre, melon, laitue, etc). Les dégâts sur les plantes cultivées peuvent entraîner des pertes relativement importantes (CABI, consulté le 11/03/2016).

3.2.2. Symptômes :

Le symptôme direct d'une attaque de nématodes *Meloidogyne* est caractérisé par la formation de galles (**Figure 1**, De Guiran & Netscher, 1970). Leur nombre, leur forme et leur taille varient en fonction de l'espèce végétale hôte, de son âge physiologique, de l'espèce de nématode elle-même et de la densité de sa population. Une échelle de notation au champ, mise au point par Zeck en 1971, (PROT-BIOL-N6 in : INRA, 2014), permet de mesurer l'intensité des symptômes. Une note allant de 0 à 10 est alors attribuée (**Figure 2 et Tableau I**). La présence de galles, entraînant une déformation des éléments vasculaires, est souvent accompagnée de symptômes sur les parties aériennes. L'alimentation en eau et en éléments minéraux de la plante est perturbée par la présence de nématodes qui en consomment une partie. La plante est également plus sensible à la sécheresse du fait de la réduction de son alimentation en eau. Les plantes infectées montrent alors des symptômes de flétrissements. L'infection de la plante entraîne donc des pertes de rendement (De Guiran & Netscher,

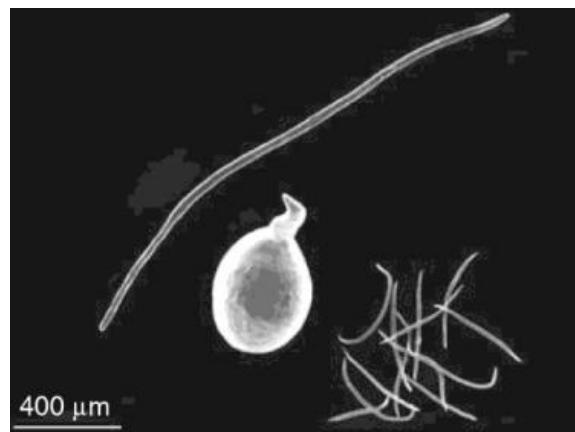


Figure 3 - Différents stades des nématodes à galles (*Meloidogyne spp.*).

Vue en microscopie électronique des dimensions de *Meloidogyne spp.* A gauche : mâle ; au centre : femelle ; à droite : larves juvéniles J2 (Perry *et al.*, 2009).

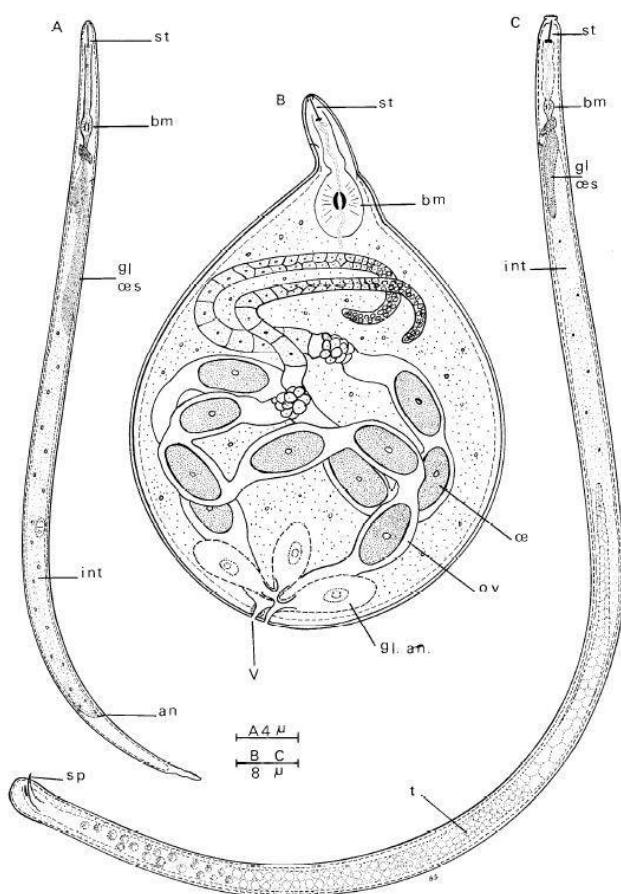


Figure 4 - Morphologie et organisation des différents stades de *Meloidogyne spp.*

A : au stade juvénile ; **B** : femelle ; **C** : mâle. an : anus ; bm : bulbe médian ; gl. an. : glandes anales ; gl. oes. : glandes de l'œsophage ; int. : intestin ; oe. : œuf ; ov. : ovarie ; sp. : spicules copulateurs ; st. : stylet ; t. : testicules ; v. : vulve. (De Guiran & Netscher, 1970).

1970). Dans le cas extrême, la plante peut dépérir entraînant une perte totale de la production.

3.2.3. Morphologie :

Les *Meloidogyne* présentent un dimorphisme sexuel. Les nématodes mâles ainsi que les larves sont vermiformes et pointus au niveau de la queue. Les femelles sont pyriformes, plus petites que les mâles, mais bien plus larges (**Figure 3** ; Perry *et al.*, 2009). Les femelles font entre 0.4 et 1.3 mm de longueur et entre 325 et 700 µm de largeur tandis que les mâles mesurent entre 0.7 et 2 mm de long (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). L'organisation générale des nématodes du genre *Meloidogyne* est illustrée par la **Figure 4** (De Guiran & Netscher, 1970). Les *Meloidogyne*, comme de nombreux nématodes phytoparasites, possèdent un stylet qui leur permet de percer les parois cellulaires et donc de pénétrer dans les racines (Ephytia, consulté le 09/03/2016). La taille du stylet varie entre 10 et 30 µm en fonction de l'espèce, du sexe et du stade de développement (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

Quelques critères morphologiques permettent de distinguer les différentes espèces les unes des autres comme les ornementations de la partie céphalique par exemple ; illustrée sur les clichés de microscopie électronique en **Figure 5** (Perry *et al.*, 2009). D'autres critères plus précis comme le stylet et son fourreau chez le mâle ou la femelle permettent aussi de les différencier (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). Cependant, cette identification nécessite une microscopie de précision ainsi que l'expertise d'un professionnel.

3.2.4. Biologie et cycle de vie :

Les nématodes *M. incognita*, ainsi que *M. arenaria* et *M. javanica*, sont des endoparasites obligatoires qui se reproduisent par parthénogénèse mitotique – autrement dit, sans reproduction sexuée. Les nématodes *M. incognita* se développent dans des gammes de températures entre 18 et 30°C avec un optimum à 27°C. Cependant, la majorité des populations est retrouvée dans des zones où la gamme de température moyenne annuelle est comprise entre 24-30°C (Eisenback & Triantaphyllou, 1991).

La durée du cycle des *Meloidogyne* varie de 3 à 10 semaines en fonction des conditions environnementales (Barbary, 2014). Pour *M. incognita* sur tomate à une température de 29°C, les premières femelles adultes apparaissent au bout de 2 semaines (13-15 jours) ; et la première ponte au bout de 3 semaines (19-21 jours). Au cours de leur cycle, les nématodes vont passer par plusieurs stades successifs : quatre stades juvéniles et un stade adulte. Le cycle se compose de deux phases distinctes (**Figure 6** ; Barbary, 2014) :

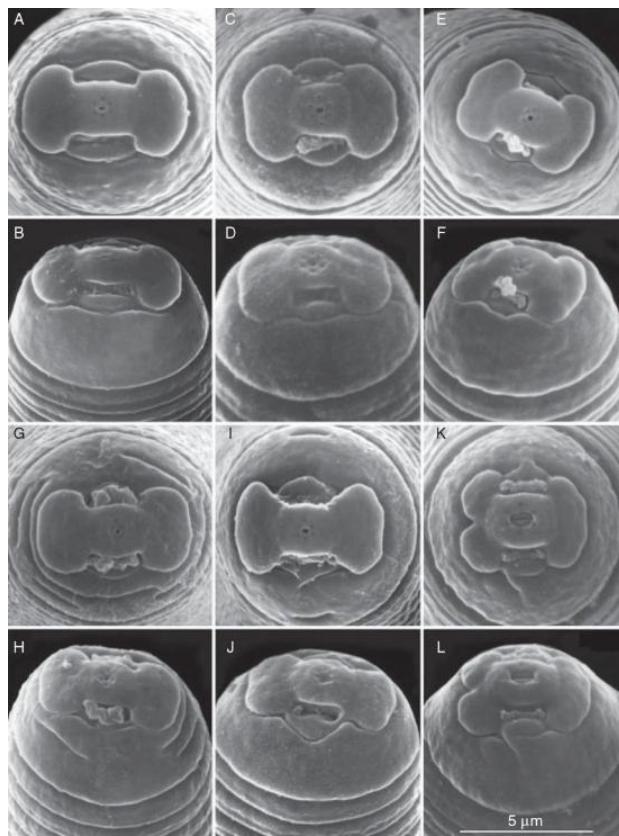


Figure 5 - Ornements de la partie céphalique des *Meloidogyne*.

Vue de face et vue latérale en microscopie électronique de la partie céphalique de larves juvéniles J2 de plusieurs espèces du genre *Meloidogyne*. **A** et **B** : *M. arenaria* ; **C** et **D** : *M. exigua* ; **E** et **F** : *M. hapla* ; **G** et **H** : *M. incognita* ; **I** et **J** : *M. javanica* ; **K** et **L** : *M. megatyla* (Perry *et al.*, 2009).

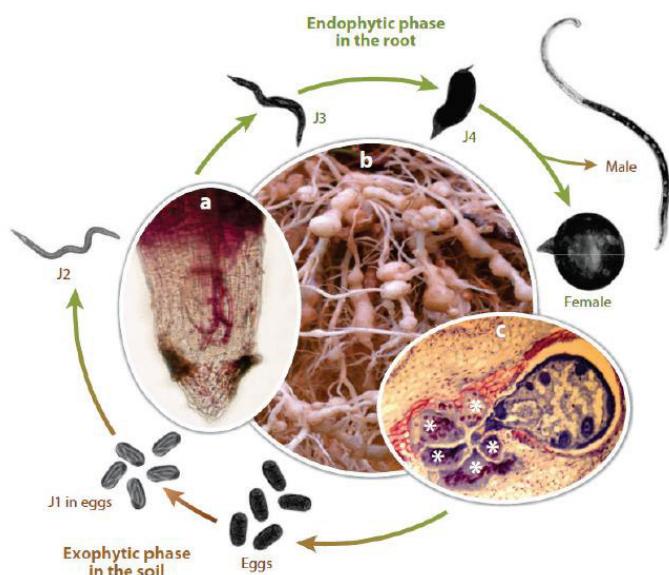


Figure 6 - Cycle biologie des nématodes à galles (*Meloidogyne* spp.).

a : Nématode dans la racine, remontant le cylindre central. **b** : galles racinaires. **c** : femelle et site nourricier constitué de plusieurs cellules géantes symbolisées par des astérisques. J1 à J4 : différents stades juvéniles. (Barbary, 2014).

- une phase exophyte, qui va de la ponte à la pénétration dans la racine ; durant laquelle les individus sont soumis aux conditions régies par le sol,
- Une phase endophyte, qui va du développement à la reproduction ; où les individus sont ici sous l'influence du milieu interne de la plante-hôte.

La phase exophyte, au niveau du sol, débute par l'éclosion des œufs et la libération des larves pré-parasitaires (J2). L'éclosion est spontanée, et n'est pas stimulée obligatoirement par la présence d'xsudats racinaires, contrairement aux larves issues de kystes comme les nématodes du genre *Heterodera* ; bien que la présence d'xsudats racinaires favorise l'éclosion des œufs de *Meloidogyne*. Ces larves correspondent au seul stade libre et infestant du cycle de vie. Toutefois, les œufs peuvent se conserver dans le sol et résister au froid et à la sécheresse. Le sol conserve alors un potentiel infectieux au cours de l'hiver ou pendant sa mise en repos.

La phase endophyte commence par la pénétration des larves juvénile (J2) au niveau de la zone d'elongation de la racine. Celles-ci remontent jusqu'au niveau du cylindre centrale où ces dernières vont sédentariser et former un site nourricier. Ce site nourricier est à l'origine de la formation de la galle au niveau de la racine et correspond à une modification des quelques cellules qui entourent la tête de la larve juvénile (J2) formant un syncytium, plus communément appelé « cellule géante ». Les larves juvéniles vont subir successivement trois mues pour devenir adultes et se transformer en femelles pyriformes, ou plus rarement en mâles. La femelle pond les œufs à l'extérieur de la racine au sein d'une gangue mucilagineuse (**Figure 7**). La quantité d'œufs au sein d'une même masse varie entre 300 et 3000 œufs (Barbary, 2014). Comme précisé précédemment, les œufs peuvent éclore de manière étalée dans le temps, et les larves libérées auront la capacité d'infecter une nouvelle plante – et rentreront dans un nouveau cycle (De Guiran & Netscher, 1970 ; Barbary, 2014).

3.2.5. Méthodes de lutte :

Pour lutter contre les nématodes phytoparasites tels que les *Meloidogyne*, plusieurs méthodes existent mais présentent néanmoins des limites.

➤ Méthodes chimiques :

La méthode chimique consiste en l'utilisation de nématicides de synthèse. Ces produits sont des composés chimiques toxiques et non spécifiques. En affectant seulement la couche superficielle du sol (jusqu'à 30-40cm de profondeur), ces produits ont un impact limité en profondeur, ce qui implique une utilisation répétée. D'autres produits peuvent être utilisés.



Figure 7 - Masses d'œufs de *Meloidogyne incognita* sur racines de tomate.

Le cercle entoure des masses d'œufs matures de couleur orangée. (Fabien Vialle, Beaucouzé, 25/04/16).

Ce sont les nématicides systémiques, comme les carbamates (ex : aldicarbe, carbofuran, oxamyl) ou les organophosphorés (ex : fosthiazate, phenamiphos, etc). En revanche, ces produits sont interdits en culture maraîchère puisque diffusent dans la plante. Depuis la mise en application de la directive européenne 9/414/EEC en 2009, uniquement trois produits disposent d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en tant que nématicides avec des restrictions d'usages (Barbary, 2014) :

- Le dazomet (une seule application tous les 3 ans)
- Le fosthiazate (uniquement sur pomme de terre et banane)
- l'oxamyl (fin de l'AMM en 2016)

Dans le cadre du plan ECOPHYTO, qui vise à réduire de moitié l'utilisation de produits phytosanitaires sur une période de 10 ans, ces produits chimiques devront à terme être remplacés par des méthodes de luttes alternatives (physique, biologique ou culturelle).

➤ *Méthodes physiques et prophylactiques :*

Ces méthodes ne permettent généralement pas d'éliminer une population de nématodes, mais de limiter plus ou moins efficacement leur propagation et leur multiplication. Les méthodes physiques sont au nombre de trois : la solarisation (bâchage de la parcelle pour atteindre une température létale pour les nématodes), la submersion (inondation de la culture pour asphyxier le pathogène) et la désinfection par la vapeur (pulvérisation de vapeurs chaudes pour éliminer les nématodes) (De Guiran & Netscher, 1970 ; GRAB, 2001 ; Barbary, 2014). Cependant, elles ne sont que très peu utilisées car sont soit peu efficaces, soit trop onéreuses ou bien controversées du fait qu'elles peuvent dégrader la qualité du sol (perte de biocénose, lessivage, etc). De plus, certaines de ces méthodes ne peuvent être efficaces que sur quelques cultures spécialisées. C'est le cas de la submersion, efficace pour les cultures de riz par exemple.

De même, les mesures prophylactiques ne favorisent pas l'élimination des nématodes mais permettent de contenir la propagation. Le nettoyage des outils de travail, la gestion des adventices autour des parcelles ainsi que l'alimentation en eau, l'utilisation de semences certifiées, l'adaptation du calendrier cultural (semis précoce ou tardif), le labour profond, ou encore la rotation culturale raisonnée (alternance cultures hôte / non hôte) sont une liste d'exemples de pratiques culturelles non exhaustives qui permettent de limiter la propagation et la multiplication des nématodes de manière efficace. En revanche, la jachère n'est pas une solution convenable et économiquement viable pour les maraîchers puisque les nématodes sont capables de se conserver très longtemps dans un sol (GRAB, 2001 ; Barbary, 2014).



Figure 8 - Champignon nématophage (*Arthrobotrys irregularis*).

Vue en microscopie électronique d'un nématode pris au piège dans des anneaux de constriction d'un champignon nématophage : *Arthrobotrys irregularis*. (Photo par : Dijan-Caporalino dans Ephytia, 2016)

➤ *Méthodes biologiques :*

Il existe plusieurs types de méthodes biologiques, utilisant soit des microorganismes (prédateurs de nématodes ; parasites des œufs et des larves), soit des plantes dites « nématicides » ou « plantes pièges ».

Plusieurs champignons sont nématophages et forment des organes de capture comme des anneaux de constriction par exemple (**Figure 8**). Peuvent être cités : *Arthrobotrys irregularis*, *A. oligospora* ou encore *A. conoides*. D'autres sont des parasites pour les œufs de nématodes : *Paecilomyces lilacinus*, *P. fumosoroseus* et *Pochonia chlamydospora*. Des bactéries sont parasites de larves comme par exemple *Pasteuria penetrans* (Caryol, 1983 ; Chen & Dickson, 1998 ; Dijan-Caporalino, 2009 ; Barbary, 2014). L'inconvénient de ces auxiliaires naturels reste le niveau d'efficacité, dépendant fortement du *pH* et de la composition du sol. De plus les interactions avec les nématodes sont très spécifiques. Le coût de développement et de production de ce type de produits est également à prendre en compte.

D'autre part, il existe un grand nombre de plantes dites « nématicides », ayant une action répulsive, inhibitrice, toxique ou encore de piégeage. Plus de 200 espèces ont été identifiées par Dijan-Caporalino (Barbary, 2014). L'œillet d'inde (*Tagetes minuta*), par exemple, est un bon précédent cultural pour lutter contre les nématodes à galles (GRAB, 2001). En pratique, les plantes « nématicides » sont utilisées en rotation, en engrais vert, en amendement, en Mulch, ou en culture associée avec une culture sensible. Actuellement, l'utilisation de ces plantes dites « de service » n'est pas encore très employée. En cas d'infestation trop importante, le problème ne peut être résolu en une seule année. Il faut coupler cette méthode avec des méthodes physiques et culturelles afin de maximiser son efficacité.

➤ *Lutte génétique :*

Enfin, la méthode de lutte par l'utilisation de variétés résistantes est sans doute la plus prometteuse. Il existe de nombreuses sources de résistances aux nématodes au sein des populations végétales sauvages, qui peuvent être introgressées aux variétés sensibles. C'est le cas chez la tomate (*Solanum lycopersicum*) pour laquelle le gène de résistance *Mi-1* a été introduit chez des variétés commerciales sensibles à partir d'une espèce sauvage de tomate (*Solanum peruvianum*). Ce gène de résistance confère une résistance aux trois principales espèces de nématodes phytoparasites du genre *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*). Cependant, le contournement de la résistance reste un facteur limitant à l'utilisation de la lutte génétique (Barbary, 2014).

Tableau II - Cultivars résistants aux *Meloidogyne* et leur(s) gène(s) de résistance.
(Dijan-Caporalino, 2013 ; Barbary 2014)

Cultivars	Gènes de résistance	Résistance contre :
« Yolo Wonder » (YW)	Me5	<i>M. javanica</i> et <i>M. arenaria</i>
« Criollo de Morelos »	Me3(=Me7) Mech1	<i>M. incognita</i> , <i>arenaria</i> et <i>javanica</i> <i>M. chitwoodi</i>
« Carolina Wonder » « Charleston Belle »	N	<i>M. incognita</i> , <i>arenaria</i> et <i>javanica</i>
HD149	Me3	<i>M. incognita</i> , <i>arenaria</i> et <i>javanica</i>
HD330	Me1	<i>M. incognita</i> , <i>arenaria</i> et <i>javanica</i>
F1[HD149xHD330] (Dijan-Caporalino, 2013) Pyramiding	Me1 et Me3	<i>M. incognita</i> , <i>arenaria</i> et <i>javanica</i>
« Doux Long des Landes » (DDL)	aucun	Très sensible

3.3. Résistance du piment aux nématodes à galles :

3.3.1. Définition :

Par définition, une plante est dite « résistante » lorsque celle-ci est capable de développer un mécanisme actif de défense en réponse à l'attaque d'un pathogène, permettant de bloquer son cycle de développement et d'empêcher sa multiplication (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011). En ce qui concerne la résistance aux nématodes, la réaction d'hypersensibilité (HR) correspond généralement à une nécrose des cellules autour du point de pénétration. Cette nécrose permet à la plante d'empêcher le développement du nématode phytoparasite dans les racines et de bloquer son cycle de vie. Les plantes résistantes ne montrent alors aucun symptôme, contrairement aux plantes sensibles. Des plantes peuvent être tolérantes et supporter un certain seuil d'infestation sans laisser apparaître une diminution du rendement. L'utilisation des variétés résistantes possède un double avantage : diminuer les dégâts directs sur la culture en cours, mais également les dégâts sur les cultures à suivre en réduisant le potentiel infectieux du sol (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011).

3.3.2. Les gènes de résistances chez le piment :

Chez le piment, il existe plusieurs gènes de résistances permettant de contrôler un spectre plus ou moins large de *Meloidogyne* (**Tableau II**), plus ou moins sensibles aux fortes températures. Cependant, certaines espèces comme *M. hapla* ou *M. enterolobii* – qui est un parasite de quarantaine inscrit sur la liste A2, ne sont pas contrôlées par des gènes de résistance chez le piment. La connaissance de la distribution des espèces du genre *Meloidogyne* sur un territoire donné est donc indispensable pour une lutte génétique efficace (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011).

➤ *Le gène majeur N :*

En 1956, des études sur les piments ont mis en évidence l'existence de gènes de résistance contre les nématodes à galles. Hare en 1956 et 1957 par exemple, a montré que certaines variétés de *Capsicum frutescens* L. résistaient aux espèces *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*, comme notamment les cultivars « Santaka XS » et « 405BMexico ». Cette résistance était régie par un gène dominant appelé *N*. Ce gène a par la suite été introduit dans des cultivars commerciaux de *Capsicum annuum* comme « Charlston Belle » ou « Carolina Wonder ». Ce gène perd cependant son efficacité à des températures supérieures à 30°C (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011 ; Barbary, 2014).

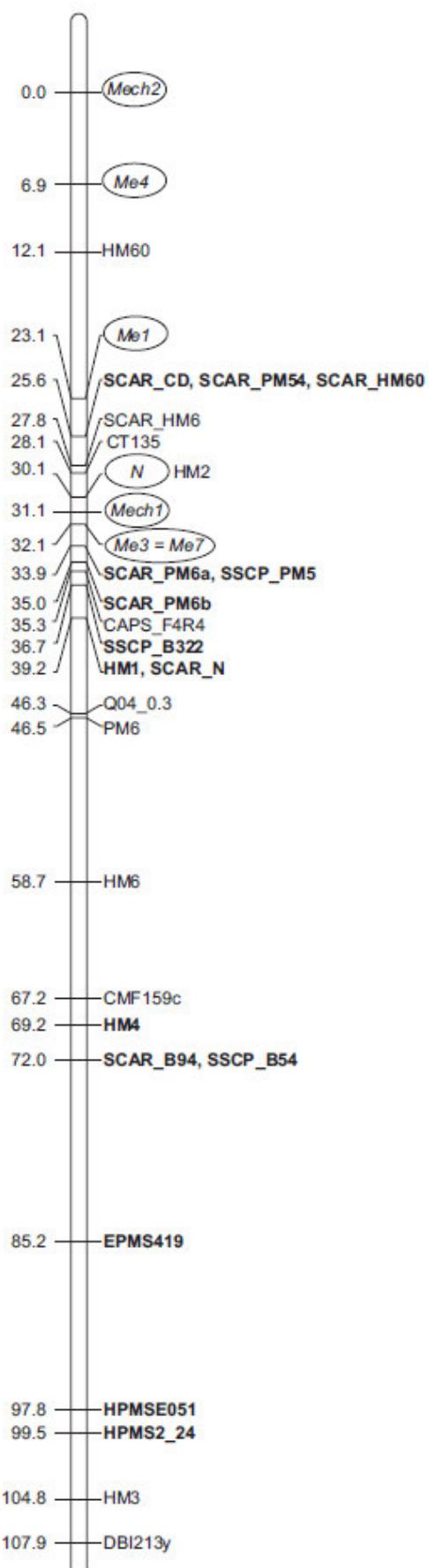


Figure 9 - Les gènes de résistance du piment sur un cluster du chromosome P9.

Les gènes de résistances du piment contre les nématodes *Meloidogyne* sont entourés. Les distances sont exprimées en cM. Le cluster correspond à une trentaine de cM. (Fazari *et al.*, 2012)

➤ *Les gènes majeurs Me1 et Me3 :*

Dans les années 1980, Hendy (d'après Bleve-Zacheo *et al.*, 1998, et Barbary, 2014) a mis en évidence d'autres sources de résistance chez *Capsicum annum* : les gènes *Me1* et *Me3* conférant une résistance à *M. incognita*, *M. arenaria* et *M. javanica*. Contrairement au gène *N*, ces gènes sont stables à de hautes températures (40°C). Ces deux gènes n'ont pas la même action. Le premier, *Me1*, induit une HR tardive au niveau du cylindre central ; tandis que *Me3* induit une HR plus précoce au niveau de l'épiderme ou du cortex de la racine (Bleve-Zacheo *et al.*, 1998 ; Barbary, 2014). Notons que le gène *Me3* correspond au gène *Me7* puisqu'il se trouve sur le même locus et correspond donc au même allèle. Ces gènes de résistances sont localisés sur le chromosome P9 sur un cluster d'environ 30 cM, où sont d'ailleurs réunis la plupart des gènes de résistance connus (dont le gène *N* et les autres gènes cités par la suite) (**Figure 9** ; Fazari *et al.*, 2012).

➤ *Les autres gènes de résistance :*

Il existe d'autres gènes dont le spectre d'action est limité à quelques espèces – voir quelques souches, de *Meloidogyne*. Le gène *Me5* est efficace contre *M. javanica* et quelques souches de *M. arenaria*, le gène *Me2* contre *M. hispanica* uniquement, ou encore le gène *Me4* efficace contre une souche particulière de *M. arenaria* (souche « Ain Toudjate »). Il existe aussi une autre famille de gène de résistance : les gènes *Mech1* et *Mech2*, qui sont efficaces contre *M. chitwoodi* (Sarah-Babu *et al.*, 2011 ; Barbary, 2014).

3.3.3. *Le problème de contournement et notion de durabilité de résistance :*

Le contournement de résistance est un phénomène plus fréquent dans les régions du monde où la monoculture est pratiquée (régions à climat tropical ou méditerranéen). Des populations virulentes de *M. arenaria* et *M. incognita* ont d'ailleurs déjà été signalées dès les années 1980 sur le territoire français. En 2011, il a été noté que seul le gène *Me3*, conduisant une HR rapide, a été contourné (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011).

Par définition, une population de nématodes est dite « virulente » pour un gène donné si elle occasionne des symptômes typiques d'une variété sensible sur une variété résistance. Ainsi, une population virulente ne peut pas se multiplier sur une variété portant une autre source de résistance. Il arrive toutefois d'observer des symptômes sans grande incidence sur la culture. Il s'agit ici « d'un simple échappement » de la résistance. Une résistance durable est une résistance qui reste efficace dans le temps alors que celle-ci est exploitée par un ensemble de variétés en présence du pathogène et dans les conditions favorables

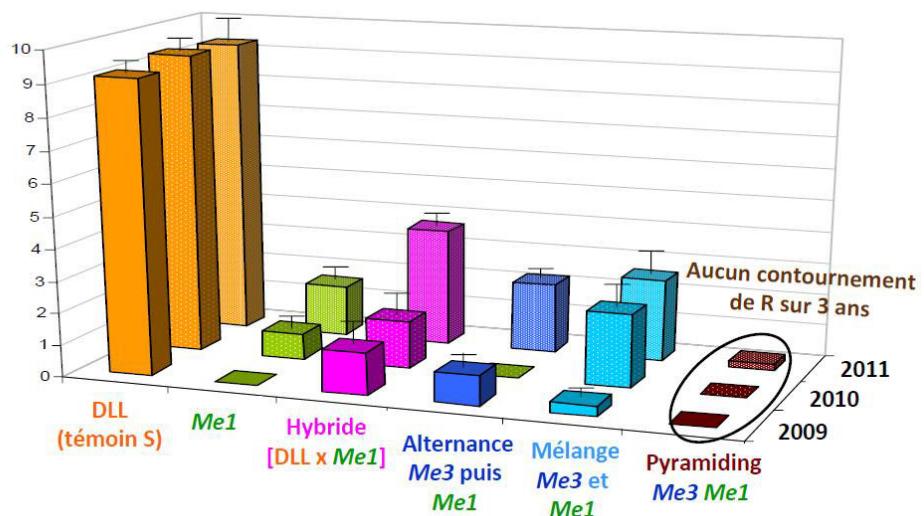


Figure 10 - Recherche de solution contre le contournement de résistance.

Moyenne des indices de galle sur une quarantaine de plants de piments après 5 mois de culture (axe des ordonnées). Les différentes modalités de rotation testées sur 3 années sont illustrées. DLL : variété « Doux Long des Landes » (témoin sensible) ; Me1 : lignée fixée Me1 ; Me3 : lignée fixée Me3. (Colloque Ecophyto, INRA PACA : Dijan-Caporalino, 2013)

pour le développement de la maladie (Barbary, 2014). La question de durabilité de résistance peut se poser pour le piment puisqu'il ne possède qu'une faible quantité de sources de résistances différentes.

Un programme de recherche a été mis en place par l'équipe « Interactions Plantes-Nématodes » du Centre INRA PACA à Sophia Antipolis et ses nombreux collaborateurs. Ce programme de recherche a pour objectif de comprendre les déterminants de la résistance des Solanacées vis-à-vis des nématodes à galles afin d'en faire ressortir des solutions, pour les sélectionneurs et les producteurs, permettant ainsi de limiter les risques de contournement (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011).

Par exemple, le pyramiding (qui consiste à cumuler au sein d'un même cultivar plusieurs gènes de résistance) semble être une solution pour éviter les problèmes de contournement (Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011). En 2013, lors d'un Colloque Ecophyto, une étude a démontré que l'introduction de lignées pyramidées au cours de la rotation réduit la population de nématodes et permet ainsi l'intégration de variétés sensibles dans une parcelle (**Figure 10** ; Dijan-Caporalino *et al.*, 2013 ; Dijan-Caporalino, 2013). D'autres solutions ou hypothèses ont été formulées, comme l'hypothèse de la « contre sélection », qui se base sur l'alternance de variétés sensibles et résistantes dans le but de retarder le possible contournement et ainsi préserver la durabilité de résistance ; ou encore l'hypothèse d'un « effet dose » dû à l'état allélique de la plante. Cependant, des résultats opposés ont été obtenus sur piment ainsi que sur tomate (Jacquet *et al.*, 2005 ; Castagnone-Sereno & Dijan-Caporalino, 2011 ; Barbary, 2014).

Toutes les informations qui ont été collectées à travers cette étude bibliographique (la connaissance des conditions de vie et du cycle épidémiologique du pathogène, la nature des sources de résistances existantes chez le piment, les répercussions économiques causées par les *Meloidogyne* et les moyens de lutte existants, les travaux menées par l'INRA PACA, etc.) seront utilisées dans l'objectif de proposer un test d'évaluation de la résistance pour ce couple hôte – pathogène.



© GEVES

Figure 11 - Entretien de souche *M. incognita* sur tomates (variété « Nainespomor »).
Plants de tomates 3 semaines après inoculation (à gauche) et 6 semaine après inoculation présentant des symptômes de flétrissements (à droite). (Fabien Vialle, Beaucouzé, 01/06/16).

II- Matériels et Méthodes :

1. Matériels :

1.1. Matériel végétal :

Pour mener à bien l'ensemble de ces essais, 4 variétés de piments sont utilisées, dont une « partiellement résistante », deux sensibles et une résistante. Elles seront codifiées respectivement A, B, C et D pour la rédaction de ce rapport. La variété A correspond à Yolo Wonder et a été choisi en rapport avec la bibliographie, la décrivant comme « partiellement résistante ». Les noms des autres variétés ne seront pas divulgués. Les semences ont été fournies par le réseau MATREF.

La variété de tomate « Nainespomor », sensible aux *M. incognita*, est utilisée pour multiplier l'inoculum entre chaque essai (**Figure 11**). Au total, 30 pieds de tomates ont été utilisés pour ces essais.

1.2. *M. incognita* :

La population de *M. incognita* utilisée est la souche 955 (code : MAT/REF/07-03-01-02). Elle provient de l'INRA d'Avignon et a été reçu le 30 septembre 2011. La population est entretenue sur tomate (variété « Nainespomor »).

2. Méthodes :

2.1. Entretien de l'inoculum :

Des semences de tomate de la variété multiplicatrice sont semées 30 à 45 jours avant l'entretien de la souche, en godets de 7x7x6cm dans du terreau « SNES », composé de 70 % de tourbe et 30 % de sable. Ce substrat est léger et nourricier, favorable à la germination. Les semis sont placés dans la grande serre dans les conditions de température variant de 19 à 23°C avec une photopériode de 12 heures.

Une à deux semaines avant l'inoculation, les plants de tomates sont repiqués par deux dans des pots de 4 litres dans du substrat « 70-30 » composé de 70 % de sable et 30 % de tourbe. Ce substrat est plus lourd et favorise la formation de racines. Les plants de tomates sont déplacés dans un module privatisé de la serre pour les essais et entretien de souche de *M. incognita*. Les conditions de température et luminosité sont identiques à celles appliquées dans la grande serre.



Figure 12 - Pré-test : Méthodes d'inoculation au semis.

A : Inoculation par mélange au substrat ; **B** : Inoculation par dépôts des tronçons de racines dans la ligne de semis. (Fabien Vialle, Beaucouzé, 25/04/16)

Le jour de l'inoculation, les plants de tomates doivent être au stade 4 feuilles. Il faut également s'assurer que les masses d'œufs présentes sur les racines de tomates âgées et parasitées (qui serviront d'inoculum) soient matures, c'est-à-dire de couleur orangée (Cf. **Figure 7**). Les racines infectées sont découpées en petits tronçons homogènes à l'aide d'un ciseau puis répartis dans deux petits trous préalablement creusés au pied de chaque plant de tomate sain.

Le suivi est régulier, avec un arrosage suffisant pour maintenir le substrat humide. Il est d'ailleurs préférable de ne pas arroser la veille ainsi que le jour même de l'entretien de souche pour favoriser les manipulations et rendre visibles les masses d'œufs orangées.

Au bout de 6 à 10 semaines (suivant la température), l'inoculum est prêt à être utilisé pour un nouvel entretien de souche et/ou un essai sur piments.

2.2. Pré-test : Comparaison de différentes techniques d'inoculation :

En premier lieu, un pré-test sur piments a été réalisé pour avoir un aperçu de l'interaction entre le piment et le nématode en faisant varier quelques facteurs comme le contenant ou le mode d'inoculation. Plusieurs conditions ont été testées en se basant sur les protocoles utilisés pour l'entretien de souches ou pour les tests de résistance à *M. incognita* chez la tomate. Grâce aux conclusions du pré-test, quelques modalités seront reproduites, modifiées ou améliorées lors de l'essai suivant.

2.2.1. Méthodes d'inoculation :

2.2.1.1. Au semis :

L'inoculation au semis, réalisée en terrine, correspond au protocole utilisé pour le test de résistance sur tomates. Deux modalités d'inoculation sont testées :

- par mélange de tronçons de racines avec le substrat (**Figure 12 A**)
- par dépôt de tronçons de racines dans la ligne de semis (**Figure 12 B**)

Chacune des modalités a été réalisée sur 2 répétitions de 10 semences par variété. Les semis sont réalisés en terrine (26,5x26,5x7 cm) dans du substrat « 70-30 » préalablement inoculé par l'une ou l'autre des modalités. Une terrine « témoin » a été préparée et non inoculée.

2.2.1.2. Au stade 4 feuilles :

L'inoculation des plantules au stade 4 feuilles est réalisée dans des pots de 14 cm de diamètre et 11 cm de profondeur. Les plants de piments au stade 4 feuilles ont été



Figure 13 - Piment au stade 4 feuilles.

Piments au stade 4 feuilles prêts pour inoculation par tronçons de racines. (Fabien Vialle, Beaucouzé, 25/04/16)

Tableau III - Conditions d'éclosion de larves.

Conditions :	Température	Source d'oxygène
C1	Ambiante (~20°C)	Aucune
C2	Etuve (25°C)	Aucune
C3	Etuve (25°C)	Eau oxygénée
C4	Ambiante (~20°C)	Bulleur d'aquarium
C5	Ambiante (~20°C)	Eau oxygénée

préalablement semées en plants-pack, puis repiqués individuellement dans un pot 14 jours plus tard. L'inoculation a été réalisée au stade 4 feuilles vraies (**Figure 13**), soit 35 jours après semis, de la même façon que les plants de tomate utilisés pour l'entretien de souche. Trois à quatre plants non inoculés par variété serviront de témoins sains.

2.2.2. Système de notation des indices de galles :

Six semaines après inoculation, les plants de piment sont déterrés et lavés à l'eau afin d'évaluer l'indice de galle (ou *IG*). Le système de notation utilisé attribue une valeur quantitative aux plantes et reflète la quantité de symptômes. L'échelle de notation se base sur le principe de Zeck : une note allant de 0 à 10 est attribuée individuellement aux plantes. (cf. *I.3.2.2. Figure 2 et Tableau I*).

2.2.3. Coloration des pontes à l'éosine :

Après la lecture des indices de galles, les plants de piments présentant des symptômes sont rempotés dans du terreau « 70-30 ». Trois semaines plus tard, ces derniers sont déterrés de nouveau afin de compter le nombre de masses d'œufs formées. Une étape de coloration est nécessaire afin de repérer plus facilement les pontes. Les racines sont immergées dans une solution d'éosine à 0,5 % pendant 5 minutes environ. Les racines sont ensuite rincées délicatement en les trempant dans une bassine d'eau pendant 5 à 10 minutes en laissant l'eau du robinet couler. Les pontes, bien visibles et colorées en rouge, sont observées sous une loupe. Pour vérifier la maturité des œufs, quelques pontes sont prélevées et observées entre lame et lamelles sous le microscope.

2.3. Extraction d'œufs, éclosion et récolte de larves :

L'objectif de ces essais est de mettre au point un protocole permettant d'obtenir une suspension de larves. Un pré-test de comparaison de différentes méthodes d'extraction des œufs (Blender, Stomacher, rouleau à billes et prélèvement manuel) a permis de définir la meilleure modalité d'extraction : le blender. Cette méthode correspond d'ailleurs à celle utilisée dans les protocoles de l'INRA (PROT-BIOL-N4, in : INRA, 2014) et de l'IITA (Coyne & Ross, 2014). Le protocole décrit ci-dessous est inspiré des protocoles existants.

Deux essais consécutifs sont réalisés. Le premier a pour but d'évaluer l'effet de l'oxygénation et de la température sur l'éclosion ainsi que sur la robustesse des larves récoltées. Tandis que l'objectif du deuxième est d'évaluer la cinétique des populations et de confirmer les résultats de l'essai précédent. Ainsi, différentes conditions d'éclosion, décrites dans le **tableau III**, sont comparées au cours de ces deux essais.

Les racines de tomates sont colorées à l'éosine (0,5%) de la même manière que pour les piments. Les pontes présentes sont dénombrées pour chaque plante. Les racines sont ensuite rassemblées dans une bassine et coupées en petits tronçons de quelques centimètres. La masse totale de racines est divisée en 5 échantillons égaux.

Les échantillons sont mixés individuellement avec de la Javel à 0.5% de manière à recouvrir légèrement les racines. Les broyats sont passés sur série de tamis 250 – 20 µm. Les tamis de 20 µm, contenant les œufs, sont déposés dans des bassines à raison d'une bassine par condition décrites dans le tableau III. Concernant la modalité eau oxygénée, quelques gouttes suffisent. Les échantillons sont mis à éclore pendant 1 semaine à l'obscurité (bâche noire).

Les récoltes et les comptages de larves sont réalisés à J+7, J+10, J+12 et J+15 après la mise en éclosion. Les larves contenues dans les bassines sont retenues par un tamis de 10 µm et récupérées dans un pot d'analyse. Pour chaque échantillon et pour chaque date de récolte, la moyenne sur dix comptages de 250 µl – rapportée au volume total, permet d'estimer la population de larves. Seules les larves vivantes (mobiles) sont comptabilisées.

Les larves issus d'une même condition d'éclosion sont réunies et conservées au frigo à 4°C jusqu'à la dernière date de récolte. Une deuxième estimation du nombre de larves est réalisée au 15^{ème} jour pour chaque condition afin d'estimer la perte.

Pour le deuxième essai, le protocole d'extraction varie légèrement. La seule différence se situe au niveau de la récolte. Les larves récoltées ne sont pas conservées à 4°C, mais remises dans les différentes bassines.

2.4. Mise en place d'un test de résistance :

L'objectif de cet essai est de comparer statistiquement différentes modalités entre elles. La finalité du test permettra de sélectionner les conditions les plus pertinentes pour étudier la résistance du piment contre ce pathogène.

2.4.1. Conditions testées :

Initialement, une modalité d'inoculation utilisant une suspension de larves devait être intégrée à cet essai. Cependant, cette condition n'a pas pu être réalisée car la mise au point de la technique d'extraction de larves n'était pas optimisée au lancement de celui-ci. Suite au pré-test et grâce aux conclusions qui ont pu en être tirées, 4 modalités seront comparées dans cet essai avec un effectif de 30 plantes par variété et par modalité. Le substrat « 70-30 » est remplacé par le terreau « SNES ». Le nombre de plantes par pot a été augmenté à

3. Les différentes modalités comparées associent deux facteurs : le contenant (représenté par deux modalités : le pot ou la terrine) et le stade d'inoculation (au semis ou stade 4 feuilles). Pour éviter tout biais expérimental, toutes les conditions sont inoculées le même jour. Un semis préventif est réalisé 40 jours avant l'inoculation afin d'obtenir suffisamment de plants de piment au stade 4 feuilles.

2.4.2. Techniques d'inoculations :

Dans un premier temps, la présence de pontes sur les racines de tomates et la maturité des œufs sont vérifiée avant qu'elles ne soient découpées en tronçons.

Pour l'inoculation, des pieds de tomates sont soigneusement extraits du substrat. Les plants de tomates sont âgés de 11 semaines. Les racines sont coupées en petits tronçons comme pour le pré-test. Le poids total de l'inoculum a été reparti de manière équitable, environ 0.4 g par plante. Pour les plantes au stade 4 feuilles, l'inoculum est déposé au pied de chaque plante dans deux petits trous préalablement creusés. Pour les inoculations au semis, l'inoculum est déposé dans la ligne de semis.

2.4.3. Système de notations :

Le système de notation utilisé est le même que pour le pré-test. Il est basé sur l'échelle de notation de Zeck. Les plantes sont déterrées et lavées au bout de 6 semaines après inoculation. Puis une note de 0 à 10 est attribuée à chaque plante en fonction de la sévérité des symptômes observés.

2.5. Analyses statistiques :

L'ensemble des données obtenues pour les tests d'extraction de larves et le test de résistance sont traitées dans un premier temps sous Excel ; puis sous le logiciel R (logiciel de traitement des données et d'analyses statistiques). L'objectif de ces analyses est de vérifier s'il existe des différences significatives entre les modalités testées.

Dans un premier temps, les résultats sont saisis sous Excel et les calculs de statistiques descriptives, moyennes et écart-types. Ces résultats sont représentés sous la forme d'histogramme. Si des hétérogénéités de résultats sont constatées, une macro préconstruite sera utilisée afin visualiser les valeurs aberrantes sur un box plot. Ces graphiques seront fournis en Annexe.

Dans un second temps, un test d'ANOVA (*ANalysis Of VAriances*) à un ou deux facteurs est réalisé. Le test de l'ANOVA permet de comparer les moyennes et d'évaluer l'effet des différents facteurs sur la variable mesurée. Préalablement, les conditions d'utilisation du test

de l'ANOVA : normalité de la distribution et homogénéité de la variance, sont vérifiées respectivement par le test de *Shapiro & Wilks* et le test de *Bartlett*. En cas d'inégalité des variances, le test non paramétrique de *Kruskal Wallis* sera réalisé pour mettre en évidence d'éventuelles différences significatives pour un seul facteur étudié. Suite au test de l'ANOVA, des groupes homogènes sont formés grâce au test de comparaison multiples *HSD (Honestly Significative Differences)* afin de mettre en évidence les différences significatives.

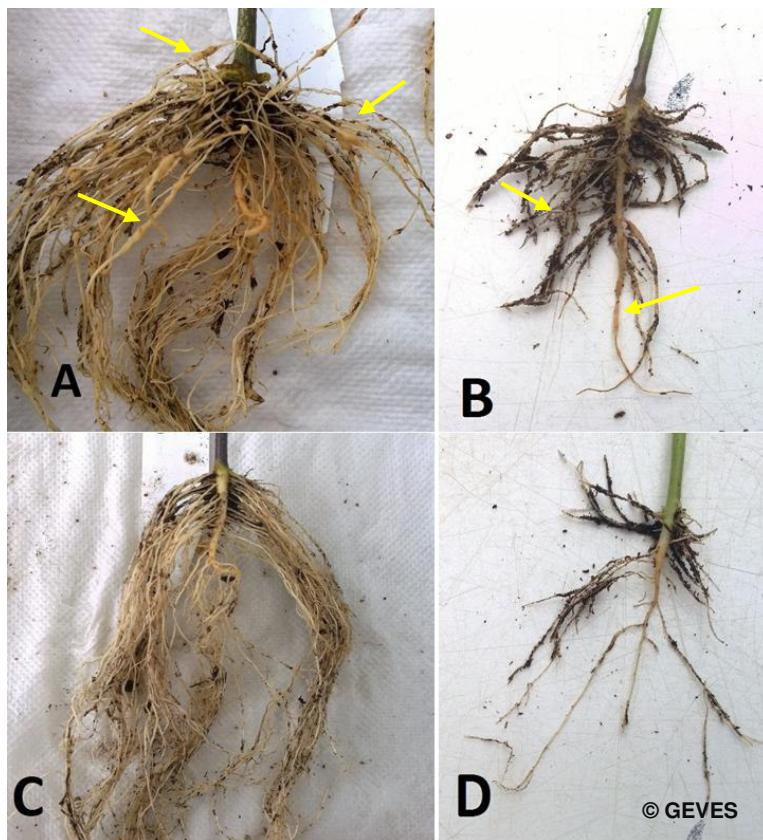


Figure 14 - Développement racinaire de piments sensibles et résistants (Pré-test).
A et B : Racines avec présence de symptômes (flèches jaunes) en pot (variété sensible) (**A**) et en terrine (**B**). **C et D :** Racines saines (variété résistante) en pot (**C**) et en terrine (**D**). (Fabien Vialle, Beaucouzé, 02/06/2016)

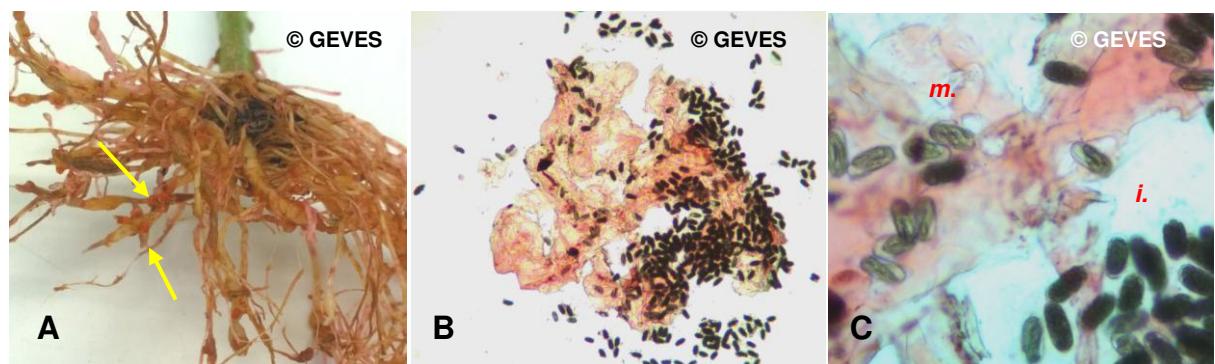


Figure 15 – Observation des pontes de *M. incognita*.
A : Pontes colorée à l'éosine sur racine de piment. **B :** vue microscopique d'une ponte et de son contenu (x100) ; **C :** détail des œufs matures (*m.*) et immatures (*i.*) (x200). (Fabien Vialle, Beaucouzé, 27/06/2016)

III- Présentation des résultats :

1. Résultats du pré-test :

➤ *Observation des symptômes :*

Une hétérogénéité de levée a été observée entre les deux modes d'inoculation au semis, réalisés en terrine. En effet, un nombre insuffisant de semences a germé lorsque l'inoculum est mélangé au substrat, alors qu'un nombre légèrement plus conséquent a germé lorsque l'inoculum est déposé dans la ligne de semis. Cependant, un taux de germination plus faible a été observé sur la variété A quelque soit les conditions d'inoculation, ainsi que sur les témoins non contaminés.

Les piments en pot, inoculés au stade 4 feuilles, présentent un bon développement foliaire et racinaire. Des galles, plus ou moins nombreuses et de tailles plus ou moins importantes sont observées sur les racines des variétés A, B et C. Aucune galle n'a été observée sur la variété D (**Figure 14 A et C**). En revanche, les piments cultivés en terrine et inoculés au semis ont un développement racinaire moins important (dû au stade de développement plus jeune), mais présentent tout de même des galles au niveau de la racine principale et quelques unes au niveau des racines secondaires (**Figure 14 B et D**). Quelques rares petites galles ont aussi pu être observées sur la variété D. L'ensemble des symptômes observé sur les différentes variétés sont évalué à l'aide de l'échelle de Zeck (Cf. **Tableau 1** et **Figure 2**).

Une note allant de 1 à 10 a été attribuée à chaque plante. La variété D se distingue clairement des autres car la majorité des plants ne présente aucune galle (notes 0). De nombreuses petites galles et quelque grosses galles éparpillées sur les racines sont observées sur les racines des variétés A, B et C (notes allant de 3 à 6). En raison d'un manque à la levée, le nombre de plantes obtenues n'a pas été suffisant. Aucune analyse statistique n'a été réalisée pour le pré-test.

➤ *Coloration des pontes :*

La coloration à l'éosine permet de discriminer visuellement les variétés sensibles des variétés résistantes. Comme le montre la **figure 15A**, les pontes sont bien visibles et fortement présentes sur les variétés sensibles. Quelques unes sont prélevées et observées au microscope (**Figure 15B**). Une hétérogénéité du stade larvaire a été constatée au niveau des œufs. Deux types d'œufs peuvent être distingués : les œufs matures, avec une larve identifiable, et les œufs immatures, où la larve est en cours de développement (**Figure 15C**).

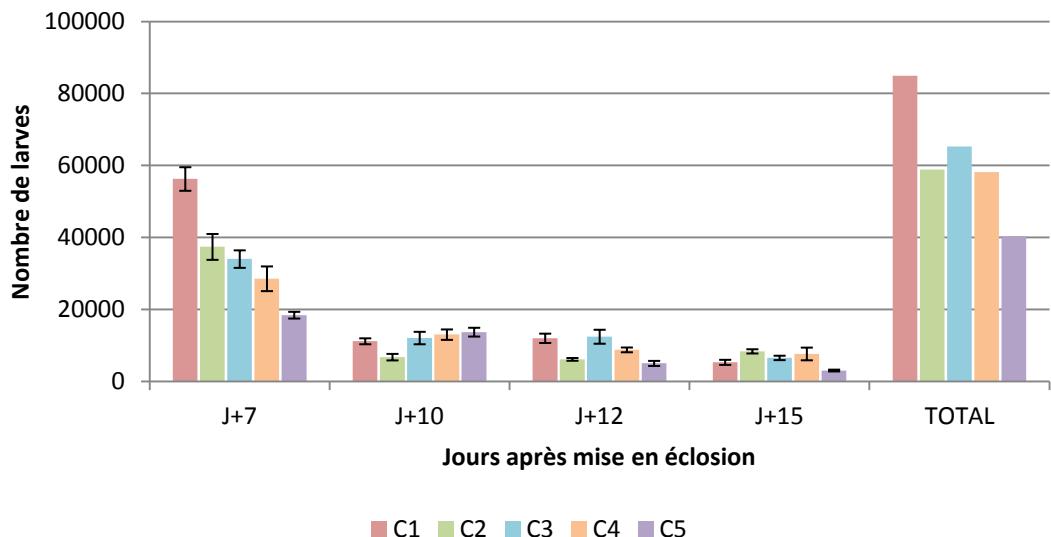


Figure 16 - Récolte de larves (essai 1).

Nombre de larves récoltées à J+7, J+10, J+12 et J+15 après la mise en éclosion. Les différentes conditions testées sont numérotées de C1 à C5.

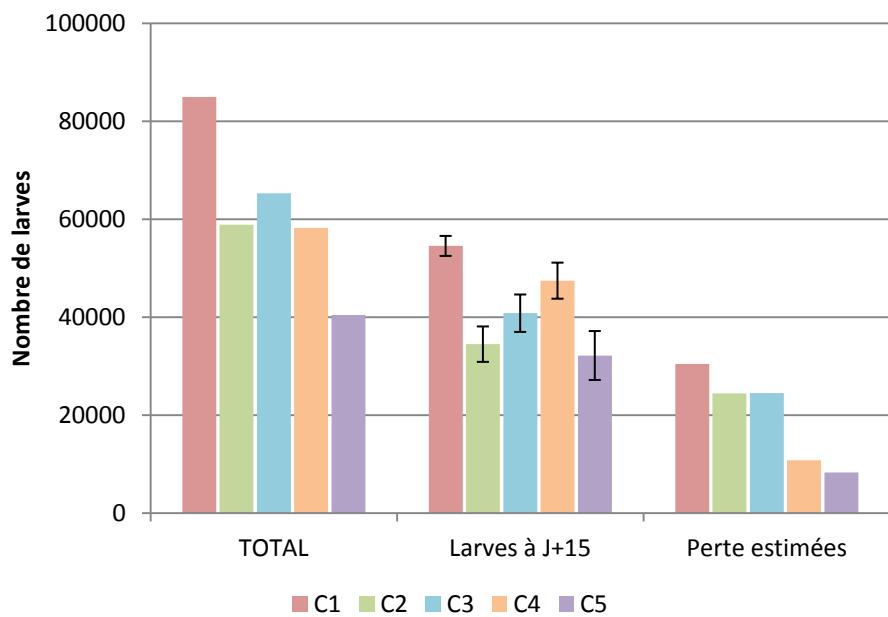


Figure 17 - Estimation des populations de larves et des pertes à J+15 (essai 1).

Les pertes correspondent, pour chacune des conditions testées, à la différence entre le nombre total de larves dénombrées lors des récoltes et la population estimée à J+15.

2. Extraction des œufs et éclosion des larves :

Les résultats du pré-test ne seront pas présentés dans le rapport mais ont permis de sélectionner la méthode utilisant le blender pour extraire les œufs. En effet, cette dernière a permis d'extraire une quantité de larves supérieure aux autres méthodes.

Lors de la préparation des échantillons de racines, les pontes présentes ont été dénombrées. Un total de 702 pontes a été utilisé pour l'essai 1 (soit 140 pontes par échantillon), contre 392 pour l'essai 2 (soit 78 pontes par échantillon).

Lors des comptages de larves (essais 1 et 2), quelques valeurs aberrantes (résiduelles) ont été constatées. Les Box plots résultant de la Macro sont illustrés dans **Annexe I** (pages I et II). Ces valeurs ne sont pas prises en compte pour l'interprétation des données. Les descriptifs des analyses statistiques réalisées sont fournis en **Annexe II**. Toutes les conditions d'utilisation ont été préalablement vérifiées.

2.1. Essai 1:

Au cours de l'essai 1, les larves ont été récoltées à chaque date de comptage puis conservées à 4°C jusqu'à la fin de l'essai. Comme le montre la **Figure 16**, toutes les conditions n'ont pas fourni la même quantité de larves. La condition C1 a permis de récolter le plus de larves, soit plus de 85 400 larves au total sur 15 jours d'éclosion. En revanche, un total de 40 900 larves a été récolté sur la même période sous la condition C5. La majorité des larves a été récoltée au bout de 7 jours d'éclosion. Une autre série de comptages a été réalisé au terme de l'essai (J+15) sur le cumul des récoltes conservées à 4°C (**Figure 17**). Les pertes ont ainsi pu être évaluées par comparaison à l'estimation totale qui correspond à la somme des récoltes des différentes dates. La condition C1 a perdu le plus de larves (environ 30 000). Les conditions C2 et C3 ont également perdu de nombreuses larves (environ 25 000). Enfin, les conditions C4 et C5 ont perdu le moins de larves (< 10 000).

Les analyses statistiques ont été réalisées sur les données obtenues sur l'ensemble des récoltes (**Annexe II**, pages III et IV). Le test de l'ANOVA a révélé des différences significatives suivant la condition d'éclosion (p-value : 9.7^{e-5}). Grâce au test *HSD*, les conditions d'éclosion ont été classées dans des groupes homogènes a, ab et b en fonction de la quantité de larves fournie. C1 a été la condition la plus efficace (groupe a). Aucune différence significative n'a été observée en fonction de l'apport d'oxygène ou non (p-value : 0.17). Aucune différence significative n'a été noté en fonction de la température testée (p-value : 0.31). D'ailleurs, le test *HSD* rassemble les deux températures au sein du même groupe homogène.

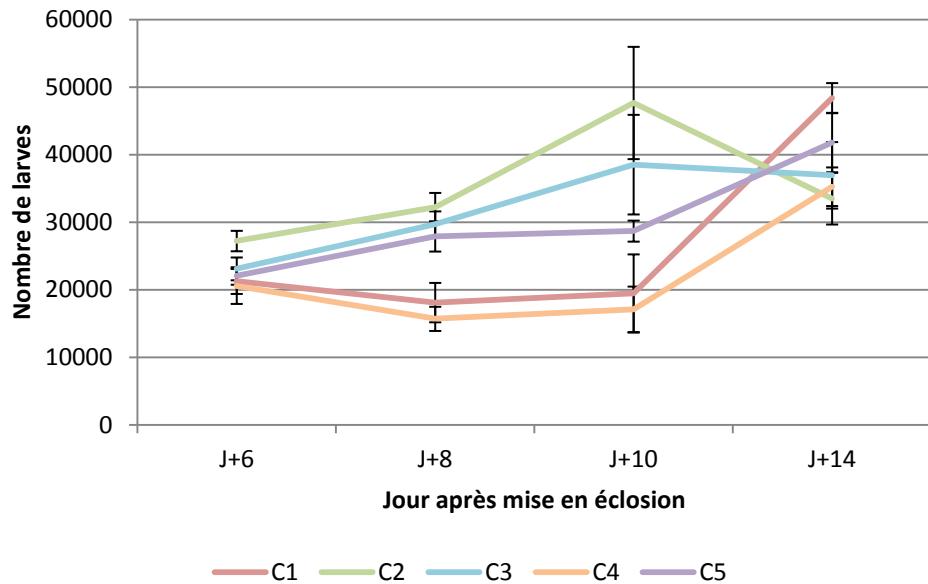


Figure 18 - Cinétique de populations de larves (essai 2)

Profils des courbes de cinétiques de populations lors des différentes conditions d'éclosion.

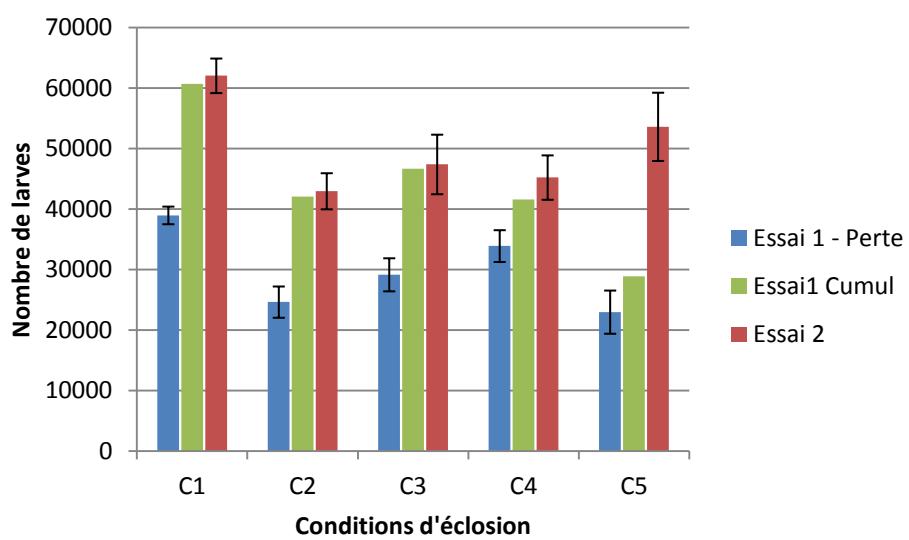


Figure 19 - Comparaison des résultats de l'essai 1 et de l'essai 2.

Les histogrammes représentent le nombre de larves obtenues à la fin de chaque essai,

Une deuxième série d'analyses statistiques a été réalisée à partir des estimations de pertes à J+15 (**Annexe II**, paged V et VI). Les résultats de l'ANOVA ont confirmés que la perte est significativement différente selon la condition d'éclosion (p-value < 2.4^{e-8}). Une légère différence significative est observée en fonction de la température (p-value : 0.08) marquée par une perte plus importante de larves à 25°C. Le test *HSD* classe d'ailleurs les deux conditions de température dans deux groupes homogènes distincts, a et b. Une autre différence plus significative est constatée en fonction de l'apport d'oxygène ou non (p-value : 2.5^{e-8}). Un plus grand nombre de larves est perdu sans apport d'oxygène.

2.2. Essai 2 :

Au cours de l'essai 2, les larves récoltées ont été remises dans leur bassine respective une fois les comptages effectués. Les courbes de cinétiques de population (**Figure 18**) sont difficilement exploitables du fait de la courte période d'essai (14 jours). Les profils des courbes sont différents d'une condition à une autre. Toutefois les populations de larves soumises à une température de 25°C (conditions C2 et C3) tendent à décroître au bout de 10 jours d'éclosion. A température ambiante (conditions C1, C4 et C5), les populations de larves tendent à croître de façon plus significative après 10 jours d'éclosion. La condition C1 a finalement fourni le plus de larves sur les 14 jours d'éclosion.

Des analyses statistiques ont également été réalisées sur l'ensemble des dates de récolte (**Annexe II**, pages VII et VIII). Une différence significative est observée en fonction de l'apport ou non d'oxygène (p-value : 0.04). Le classement du test *HSD* révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre l'apport d'oxygène par ajout d'eau oxygéné ou non (groupe a). En revanche, l'oxygénation en utilisant le bulleur a permis de récolté un nombre de larves plus faible (groupe b). Enfin, une différence plus significative a été notée en fonction de la température (p-value : 0.0002). Beaucoup plus de larves ont été récolté à 25°C (groupe a) qu'à température ambiante (groupe b).

La **figure 19** confronte le nombre de larves au terme des deux essais. Le nombre de pontes utilisées pour ces derniers étant différents, les valeurs obtenues ont été rapportées à 100 pontes. Des quantités comparables de larves pour l'essai 1 (cumul) et l'essai 2 ont été récoltées pour les conditions C1 à C4. Seule la condition C5 montre les résultats très différents. Cependant, en prenant en compte les pertes de l'essai 1, les quantités de larves sont très inférieures.

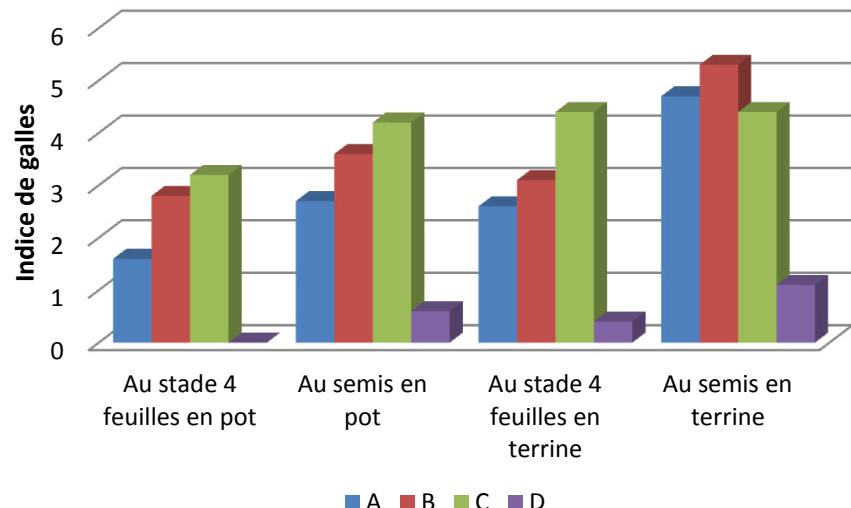


Figure 20 - Résultats du test de résistance.

Les histogrammes représentent la moyenne des indices de galles attribuées 6 semaines après inoculation des quatre variétés A, B, C et D en fonction de la condition testée.

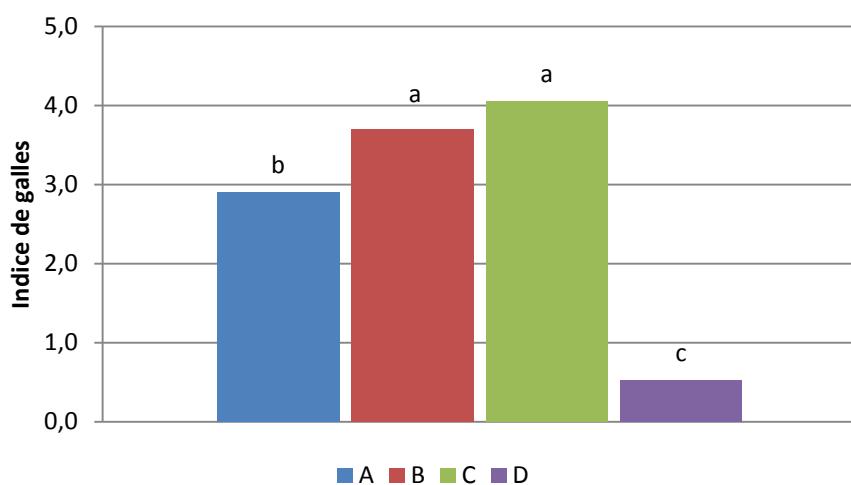


Figure 21 - Différents niveaux de sensibilité.

Les histogrammes représentent la moyenne des indices de galles attribuées aux quatre variétés (A, B, C et D), toutes conditions de test confondues. Les groupes homogènes a, b et c illustrent les différents niveaux de sensibilité observées selon les variétés. a : sensible ; b : intermédiaire, c : résistant. (Analyses statistiques sous le logiciel R, package Rcmdr et agricolae).

2. Résultats du test de résistance :

Les résultats généraux du test de résistance sont présentés dans la **Figure 20**. Comme attendu, les trois variétés A, B et C ont montré des symptômes de galles quel que soit le stade d'inoculation ou le contenant utilisé. La moyenne des IG varie entre 3 et 4 pour ces trois variétés. La variété D a montré très peu de symptômes avec une moyenne des IG inférieure à 1 (**Figure 21**). L'absence de symptômes sur les témoins sains valide l'essai.

Le Test de *Kruskal Wallis* et le test *HSD* (**Annexe III**, pages IX et X) ont permis de mettre en évidence des différences significatives entre les variétés (*Kruskal Wallis* : $p\text{-value} < 2.2^{e-16}$) plus particulièrement sur les variétés A, B et C considérées comme sensibles. Ceci a permis d'émettre un classement de sensibilité des variétés en fonction des moyennes de notes attribuées (**Figure 21**). Ainsi, trois groupes homogènes a, b et c ont été créés. Les variétés B et C font partie du groupe a (IG moyen proche de 4), la variété A appartient au groupe b (IG moyen proche de 3), et la variété D au groupe c (IG moyen inférieur à 1).

Le test de l'ANOVA a également mis en évidence des différences significative en fonction du contenant ($p\text{-value} : 4.416^{e-17}$), mais aussi en fonction du stade d'inoculation (1.712^{e-10}). Les notes attribuées aux plantes cultivées en terrine sont plus élevées que celles cultivées en pot. De la même manière, les notes attribuées aux plantes inoculées au semis sont plus hautes que celles inoculées au stade 4 feuilles.

IV- Discussion :

1. Pré-test :

Lors du pré-test, les résultats ont montré une hétérogénéité de levée entre les conditions d'inoculation au semis. La pression parasitaire pourrait être une explication à cette observation. Lorsque l'inoculum est mélangé au substrat, les semences sont directement en contact avec les nématodes entraînant une fonte de semis. Ce problème n'ayant pas été observé lors de l'inoculation par dépôt de tronçon de racines dans la ligne de semis, cette dernière a donc été retenue pour les essais suivants.

Concernant l'observation des symptômes, de nombreuses galles ont été observées sur les variétés A, B et C. Celles-ci sont donc qualifiées de sensibles. Le nombre de plantes obtenu n'est cependant pas suffisant pour différencier significativement le niveau de sensibilité de ces trois variétés. En revanche, la variété D ne présentait aucun symptôme. Elle est donc qualifiée de résistante.

D'après la littérature (Barbary, 2014), la variété A, décrite comme « partiellement résistante », possède un gène de résistance aux *Meloidogyne javanica* et *M. arenaria* : *Me5*. En revanche, elle ne possède pas de gène de résistance à *M. incognita*. Ceci explique la présence de symptômes sur cette variété.

A travers ce pré-test, l'observation des symptômes a permis de valider la maîtrise du pathosystème et d'établir une première échelle de notation basée sur celle de Zeck. Cette échelle de notation a servi de référence pour la notation des variétés lors de l'essai de test de résistance.

Dans la continuité du pré-test, les plantes doivent être conservées 3 semaines supplémentaires afin d'observer la présence de pontes sur les racines. L'utilisation de l'éosine a permis de mettre en évidence visuellement la présence de pontes sur un échantillon de racines de piment ou de tomate. L'hétérogénéité de la maturité des œufs observée au sein d'une ponte démontre qu'un gradient de maturité existe. Les œufs les plus matures sont les premiers pondus et se retrouvent du côté opposé à la vulve contrairement aux œufs immatures. Cette observation est en accord avec le cycle de formation progressif des œufs décrite dans la littérature. Ceci peut avoir une conséquence sur la récolte de larves, notamment une perte de vigueur si la durée de récolte est trop longue. Dans le protocole proposé par l'INRA (INRA, 2014), il est précisé que la première récolte, contenant les premières larves, est « éliminée », sûrement par perte de vigueur au bout de 7 jours.

2. Extraction de larves :

Au cours des deux essais, la condition 1 a toujours permis de récolter le plus larves, malgré un niveau de perte élevé. Elle a permis de récolter plus de 60 000 larves en moyenne pour 100 pontes (soit 600 larves par ponte). D'après les chiffres décrits dans la littérature, une femelle peut pondre entre 300 et 3 000 œufs par ponte (Barbary, 2014). Ce chiffre est cohérent du fait que les pontes proviennent de racines inoculées depuis 11-13 semaines.

Cependant, les résultats statistiques des deux essais ont été contradictoires. L'analyse statistique réalisée sur l'essai 1 a suggéré que ni la température ni l'oxygénation n'auraient d'influence sur l'éclosion. Or, l'analyse statistique de l'essai 2 montre que la température a bien un effet positif sur l'éclosion, et que l'oxygénation n'influencait pas. Les observations faites sur la température lors de l'essai 1 peuvent s'expliquer du fait que ce dernier ait été réalisé au cours d'une période de forte chaleur. La température de la pièce était sans doute très proche de 25°C, faussant l'interprétation de cette observation. Ainsi, la température de 25°C stimulerait l'éclosion des œufs. D'autre part, l'utilisation d'un bulleur ne convient pas pour ce type d'essai. Ce dernier entraîne une perte physique de larves causée par des projections de l'eau hors de la bassine. En revanche les résultats ont montré que l'eau oxygénée n'a pas d'effet sur la récolte de larves, mais à un impact positif la viabilité et la robustesse des larves, entraînant une réduction des pertes. En accord avec les protocoles existants (INRA, 2014 ; Coyne & Ross, 2014), l'apport d'oxygène est un point essentiel. Ainsi, le choix de la condition d'éclosion se porterait plutôt vers la condition C1 avec une amélioration par oxygénation post récolte dans le but de réduire les pertes.

La comparaison des deux essais a montré une différence de résultats, lorsque les estimations de perte au cours de l'essai 1 sont prises en compte. Comme décrit dans le protocole INRA, l'utilisation de larves âgées de 24 à 48 heures est fortement conseillée car leur longévité est éphémère (environ 2 jours). Il stipule également que la conservation des larves peut être prolongé jusqu'à une semaine après récolte à 4°C. Au-delà, les larves perdent en vigueur. Or, beaucoup moins de larves ont été dénombrés lorsque ces dernières sont conservées à 4°C après leur récolte. Un essai supplémentaire permettrait d'évaluer le taux de survie des larves à 4°C ou à température ambiante afin de valider ce résultat.

3. Test de résistance :

Les résultats obtenus sont conformes aux résultats attendus. Les variétés A, B et C sont sensibles, tandis que la variété D est résistante. Cependant, les résultats ont montré que les notes attribuées à la variété A sont inférieures à celles attribuées aux variétés B et C. La variété A (Yolo Wonder), décrite comme partiellement résistante, possède des gènes de

résistance aux nématodes à galles *M. javanica* et *arenaria* (Barbary, 2014). La possession d'un fond génétique résistant à d'autres espèces de *Meloidogyne* pourraient être à l'origine d'une résistance partielle contre *M. incognita*, expliquant la différence observée par rapport aux variétés B et C.

D'autre part, une différence significative a aussi été notée en fonction du stade d'inoculation. Les notes attribuées aux plantes inoculées au semis étaient plus élevées que celles inoculées au stade 4 feuilles. Le développement racinaire étant différent (chevelu racinaire moins dense), des notes plus sévères peuvent être attribuées aux plantes plus jeunes. En effet, le système de notation de Zeck, adapté pour une notation au champ, prend en compte l'état du chevelu racinaire et demande une estimation (en pourcentage) de son état de fonctionnement. Par exemple, la note de 5 est attribuée si au moins 25% du système racinaire ne fonctionne plus. Ceci peut s'interpréter différemment selon l'âge de la plante, et expliquer l'origine de cette différence.

Enfin, une autre différence significative est observée en fonction du contenant utilisé. Les notes attribuées aux plantes en pot sont plus faibles que celle attribuées aux plantes en terrine. La pression parasitaire est différente en fonction du contenant. En effet, la répartition de l'inoculum est plus homogène en terrine qu'en pot car l'échantillon de base est beaucoup moins subdivisé en sous-échantillons. Une inoculation avec des larves permettrait de rendre plus homogène la pression parasitaire entre les modalités. Cependant, cette condition reste à tester sur une grande population de plantes.

V- Conclusions et perspectives :

Pour conclure, les différents essais menés au cours de ce stage ont permis d'avancer dans la mise en place d'un nouveau test. La bibliographie riche et récente a été très utile notamment pour la recherche de protocole et la connaissance du pathogène et du pathosystème en général.

Le pré-test a permis d'orienter le choix des conditions à tester pour le test de résistance. Les premiers symptômes obtenus ont servi à mettre en application l'échelle de notation de Zeck.

Le protocole d'extraction de larves mis au point en se basant sur des protocoles existants est répétable et reproductible. Les conditions d'éclosion et de conservation restent à valider. Le rendement en larves est d'ailleurs suffisant pour inoculer un test de résistance sur 4 variétés, avec près de 60 000 larves viables en 15 jours d'éclosion pour environ 100 pontes. Le protocole expérimental pour l'extraction n'ayant pas été mis au point à temps, la modalité d'inoculation par larves n'a pas pu être comparée à la modalité d'inoculation par des tronçons.

Les résultats du test de résistance ont été satisfaisants. La différence de sensibilité entre la variété A (Yolo Wonder), et les variétés B et C, confirme que la possession d'un fond génétique résistant à d'autres espèces de *Meloidogyne* entraîne une « résistance partielle ». Le choix du stade d'inoculation et du contenant restera à valider par un second test. Toutefois, la terrine semble plus appropriée pour un essai car occupe moins d'espace que les pots. Quant au choix du stade d'inoculation, le stade 4 feuilles semble plus judicieux puisqu'il rend possible une inoculation par une suspension de larve.

A terme, l'échelle de notation pourrait être simplifiée par une échelle allant de 0 à 4. La note de 0 correspondrait à une racine totalement saine. La note de 1 à une racine comportant quelques rares petites galles (<5). La note de 2 concernerait les racines possédant de nombreuses petites galles disposées en chapelet sur les racines ou quelques grosses galles. Enfin, les notes de 3 à 4 correspondraient respectivement aux racines dont 25 % et 50% ou plus ne fonctionneraient plus.

Ainsi, Les différents objectifs fixés au début du stage ont été en grande partie atteint. Avant de soumettre le protocole au CTPS, il reste des tests à réaliser, notamment :

- Des tests d'inoculation de piments par une suspension de larves
- Un test de validation pour le choix de la condition d'éclosion de larves
- Un test de validation pour le choix du contenant et du stade d'inoculation des piments.

VI- Références bibliographiques :

✓ Thèse et Publications scientifiques :

- Barbary A.** (2014). Bases génétiques de la résistance vis à vis des nématodes du genre *Meloidogyne* chez le piment. *Thèse de biologie, mention biologie des interactions et écologie, Université de Nice Sophie-Antipolis.* 507 pages.
- Bleve-Zacheo T., Bongiovanni M., Melillo M.T. & Castagnone-Sereno P.** (1998). The pepper resistance genes *Me1* and *Me3* induce differential penetration rates and temporal sequences of root cell ultra structural changes upon nematode infection. *Plant Science, 133*, pp. 79-90.
- Caryol J.C.** (1983). Lutte biologique contre les *Meloidogyne* au moyen d'*Arthrobotrys irregularis*. *Revue Nématologie, 6* (2), pp. 265-273.
- Castagnone-Sereno P. & Djian-Caporalino C.** (2011). Lutte contre les nématodes à galles en cultures maraîchères : des recherches pour promouvoir la durabilité des résistances variétales. *Innovation Agronomique, 15*, pp. 55-64.
- Chen Z.X. & Dickson D.W.** (1998). Review of *Pasteuria penetrans* : Biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology, 30* (3), pp. 313-340.
- De Guiran G. & Netscher C.** (1970). Les nématodes du genre *Meloidogyne*, parasites des cultures tropicales. *Cahier ORSTOM, série Biologie, 11*, pp.151-185.
- Djian-Caporalino C., Védie H. & Arrufat A.** (2009). Gestion des nématodes à galles : luttes conventionnelle et luttes alternatives. L'atout des plantes pièges. *Phytoma, 18* pages.
- Djian-Caporalino.** (2010). Nématodes à galles, des ravageurs de plus en plus préoccupants. *Phytoma, 638*. 7 pages.
- Djian-Caporalino C., Palloix A., Fazari A., Marteu N., Sage-Palloix A.M., Mateille T., Tavoillot J., Martiny B., Risso S., Lanza R., Taussig C. & Castagnone-Sereno P.** (2013). Evaluation expérimentale de stratégies de déploiement de gènes de résistance pour la gestion durable des nématodes à galles. *Innovation Agronomique, 28*, pp. 187-199.
- Fazari A., Palloix A., Wang L., Hua M.Y., Sage-Palloix A.M., Zhang B.X. & Djian-Caporalino C.** (2012). The root-knot nematode resistance *N*-gene co-localizes in the *Me*-genes cluster on the pepper (*Capsicum annuum* L.) P9 chromosome. *Plant breeding, 131* (5), pp. 665-673.
- Hare, W. W.** (1956). Resistance in pepper to *Meloidogyne incognita* acrita. *Phytopathology, 46*, pp. 98-104.

Hugot J.P., Baujard P. & Morand S. (2001). Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: an overview. *Nematology*, 3 (3), pp. 199.208.

Jacquet M., Bongiovanni M., Martinez M., Verschave P., Wajnberg E., Castagnone-Sereno P., (2005). Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology* 54, pp. 93-99.

Sarath Babu B., Pandravada S.R., Prasada Rao R.D.V.J., Anitha., K., Chakrabarty S.K. & Varaprasad K.S. (2011). Global sources of pepper genetic resources against arthropods, nematodes and pathogens. *Crop Production*, 30, pp. 389-400.

Zeck W.M. (1971). A rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz-Nachrichten*, 24, pp. 141-144.

✓ Ouvrage:

Eisenback J.D. & Triantaphyllou H.H. (1991). Chapter 6 : Root-Knot Nematodes : *Meloidogyne* species and races. In : Manual of Agricultural Nematology. Nickle W.R, édition Dekker, New York, pp. 191-274.

Perry R.N., Moens M. & Starr J.L. (2009). Root-Knot Nematodes. CABI publishing, Pondicherry, 488 pages.

✓ Colloque :

Dijan-Caporalino C. (2013). Evaluation expérimentale de stratégies de déploiement de gènes de résistance pour la gestion durable des nématodes à galles. In : *Colloque Ecophyto, session 5 : Durabilité de l'efficacité des solutions techniques au regard de l'évolution des bioagresseurs : sélection, émergence, invasion, INRA PACA*, 2013, 20 pages.

✓ Document de formation et protocoles :

Coyne D.L. & Ross J.L. (2014). Protocol for nematode resistance screening root-knot nematodes *Meloidogyne spp.* International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, 27 pages.

INRA (2014). Formation 2014, initiation à la nématologie - théorie et pratique axée sur les nématodes à galles des racines. Sophia-Antipolis. 117 pages.

- **PROT-BIOL-N4** : Extraction des œufs de *Meloidogyne spp.* et éclosion en condition quasi stérile. 3 pages.
- **PROT-BIOL-N5** : Tests Biologiques pour déterminer le caractère résistant ou sensible des plantes aux *Meloidogyne*. 4 pages.

- **PROT-BIOL-N6** : Système de notation des indices de galles pour estimer les dégâts dus aux nématodes du genre *Meloidogyne* (échelle de Zeck, 1971). 2 pages.

✓ **Sitographie :**

GRAB. (2001). Lutter contre les nématodes à galles en Agriculture Biologique. (Consulté le 04 mars 2016)

http://www.itab.asso.fr/downloads/Fiches-techniques_maraichage/fiche%20nematodesmini.pdf

CABI. (2016). *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). (Consulté le 11 mars 2016)

<http://www.cabi.org/isc/datasheet/33245>

European Commission. (2015). Plant variety database. (Dernière mise à jour le 15 juillet 2015)

http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=H&species_id=14&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted

HYPPZ. (1998). Nématodes à galles des racines. (Consulté le 04 mars 2016)

<http://www7.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/3melspp.htm>

GEVES. (2016). Généralité sur les variétés. (Consulté le 09 mars 2016)

http://www.geves.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=283&lang=fr

Ephytia. (2016). Anatomie des nématodes phytoparasites. (Consulté le 09 mars 2016)

<http://ephytia.inra.fr/fr/C/7581/Infos-bioagresseurs-Anatomie>

Nondah T. (2004). Contribution à la stratégie de sélection de génotypes de piments (*Capsicum annum* L.) adaptés aux conditions tropicales chaudes et humides. (Consulté le 27 avril 2016)

http://www.memoireonline.com/10/10/4002/m_Contribution--la-strategie-de-selection-de-genotypes-de-piments-capsicum-annuum-l-adaptes-au4.html#toc32

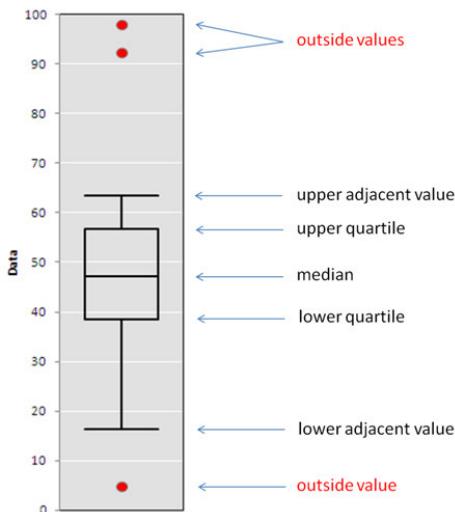
WebTimeMedia. (2008). INRA Sophia : le premier génome d'un animal parasite de plante séquencé. (Consulté le 05 mars 2016)

<http://www.webtimemedia.com/comment/reply/19849>

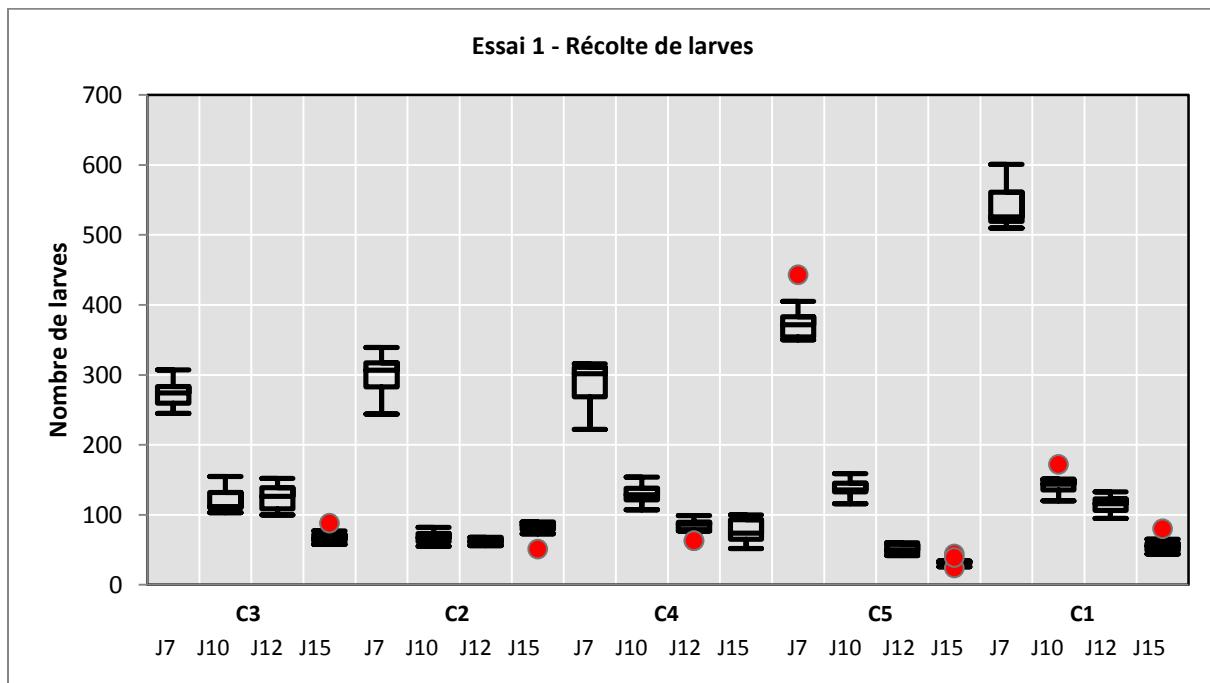
ANNEXES

Annexe I : Macro Box Plot - Extraction de larves (essais 1 et 2).....	I
Annexe II : Analyses statistiques – Extraction de larves.....	III
Annexe III : Analyses statistiques – Test de résistance.....	IX

Annexe I : Macro Box Plots – Extraction de larves (essai 1 et 2).

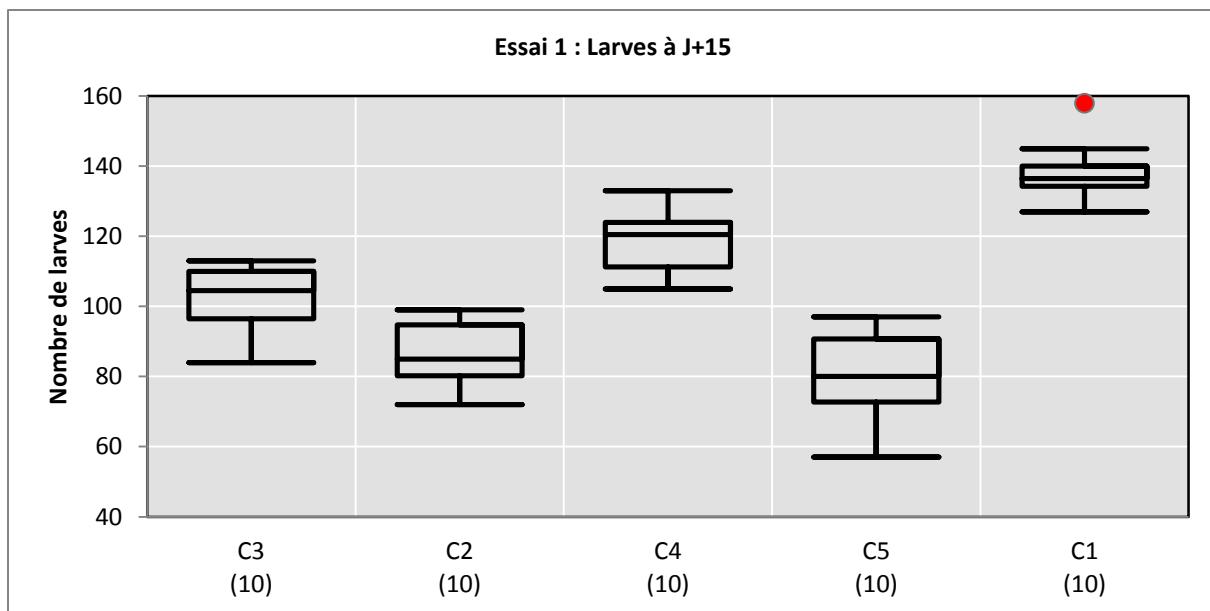


Interprétation d'un box plot.



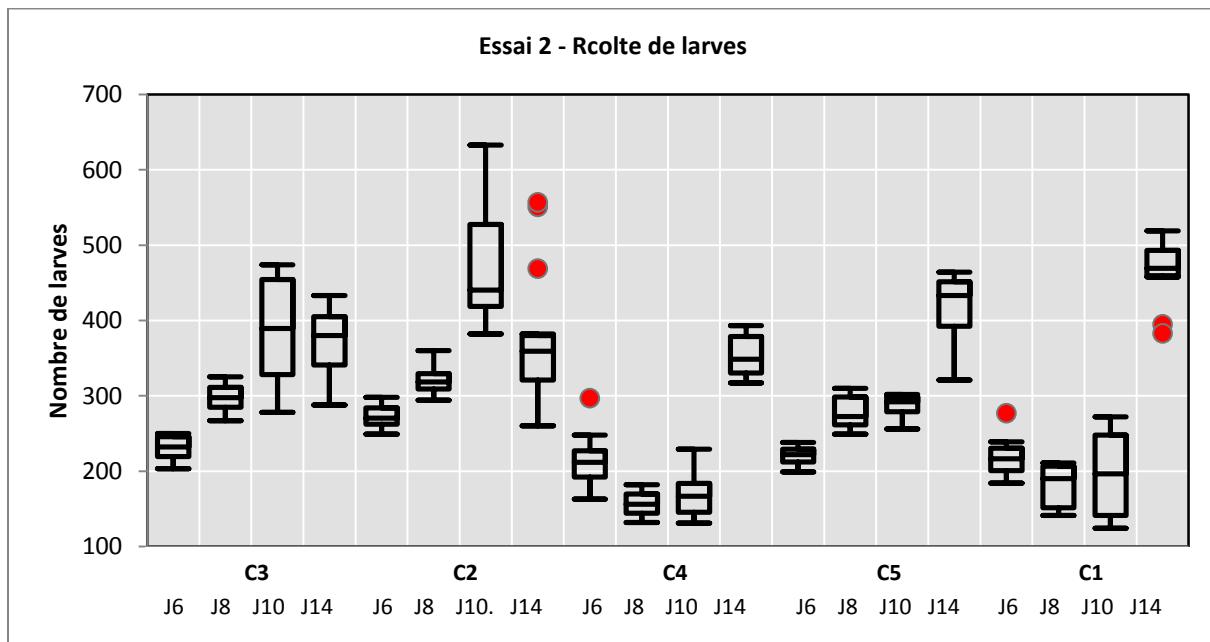
Macro Box Plot - Récolte de larves (essai 1)

Les ronds rouges illustrent les valeurs aberrantes (outside values). Les valeurs représentent le nombre de larves pour des comptages sur une dilution par 100.



Macro Box Plot – Estimation à J+15 (essai 1)

Les ronds rouges illustrent les valeurs aberrantes (outside values). Les valeurs représentent le nombre de larves pour des comptages sur une dilution par 400.



Macro Box Plot - Extraction de larves (essai 2)

Les ronds rouges illustrent les valeurs aberrantes (outside values). Les valeurs représentent le nombre de larves pour des comptages sur une dilution par 100.

Annexe II : Analyses statistiques -

Extraction de larves.

Analyses des données de récoltes de l'essai 1 :

1) Shapiro-Wilk normality test

```
data: larves
W = 0.7597, p-value = 2.758e-16
```

2) Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by condition
Bartlett's K-squared = 62.3002, df = 4, p-value = 9.525e-13
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by oxygene
Bartlett's K-squared = 34.8049, df = 2, p-value = 2.768e-08
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by temperature
Bartlett's K-squared = 8.3265, df = 1, p-value = 0.003907
```

3)

Anova Table (Type II tests)

```
Response: larves
          Sum Sq  Df F value    Pr(>F)
oxygene      5.5062e+08  2  1.7698    0.1733
temperature  1.5648e+08  1  1.0059    0.3172
oxygene:temperature 2.4707e+09  1 15.8825 9.706e-05 ***
Residuals    2.8623e+10 184
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

4)

```
Study: mod ~ "condition"

HSD Test for larves

Mean Square Error: 1555561096

condition, means

  larves      std  r  Min  Max
C1 22392.65 21139.686 37 4500 62504
C2 12317.95 10067.479 39 2800 33900
C3 16569.23 10795.870 39 5800 38375
C4 14852.63  8814.016 38 5200 31600
C5 10454.17  6280.427 36 2600 20250

alpha: 0.05 ; Df Error: 184
Critical Value of Studentized Range: 3.896183

Harmonic Mean of Cell Sizes 37.7636
Honestly Significant Difference: 7907.755
```

Means with the same letter are not significantly different.

```
Groups, Treatments and means
a      C1      22390
ab     C3      16570
ab     C4      14850
b      C2      12320
b      C5      10450
```

HSD Test for larves

```
Mean Square Error: 168012979
```

oxygene, means

```
  larves      std  r  Min  Max
aucune 17222.74 17074.941 76 2800 62504
bulleur 14852.63  8814.016 38 5200 31600
H2O2   13634.00  9379.015 75 2600 38375
```

```
alpha: 0.05 ; Df Error: 186
Critical Value of Studentized Range: 3.341262
```

Harmonic Mean of Cell Sizes 56.81063
Honestly Significant Difference: 5746.019

Means with the same letter are not significantly different.

```
Groups, Treatments and means
a      aucune      17220
a      bulleur     14850
a      H2O2       13630
```

HSD Test for larves

```
Mean Square Error: 169222231
```

temperature, means

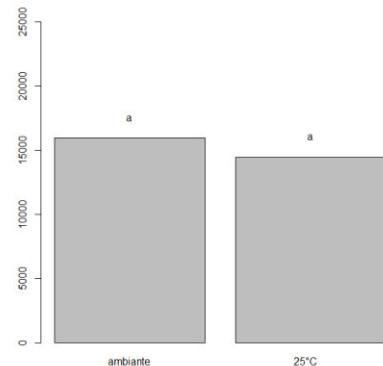
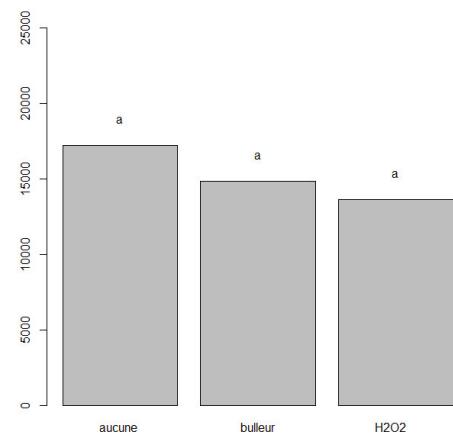
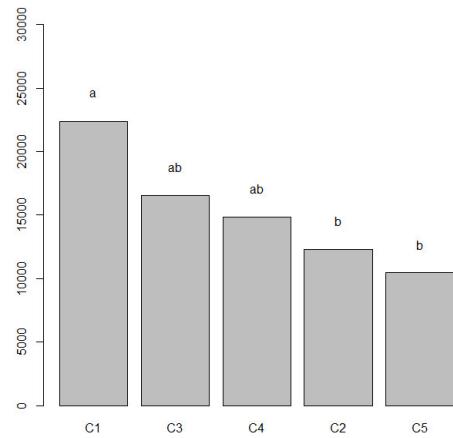
```
  larves      std  r  Min  Max
25°C   14443.59 10588.42 78 2800 38375
ambiante 15939.44 14463.67 111 2600 62504
```

```
alpha: 0.05 ; Df Error: 187
Critical Value of Studentized Range: 2.789863
```

Harmonic Mean of Cell Sizes 91.61905
Honestly Significant Difference: 3791.567

Means with the same letter are not significantly different.

```
Groups, Treatments and means
a      ambiante     15940
a      25°C        14440
```



Analyses des données de pertes de l'essai 1 à J+15 :

```
1)      Shapiro-Wilk normality test

data: larves
W = 0.9328, p-value = 0.007792

2)      Bartlett test of homogeneity of variances

data: larves by condition
Bartlett's K-squared = 15.0226, df = 4, p-value = 0.004655

data: larves by temperature
Bartlett's K-squared = 26.3002, df = 1, p-value = 2.923e-07

data: larves by oxygene
Bartlett's K-squared = 7.7846, df = 2, p-value = 0.0204

3)

Anova Table (Type II tests)

Response: larves
           Sum Sq Df F value    Pr(>F)
oxygene      2141445814  2 32.0903 2.539e-09 ***
temperature   105082828  1  3.1494  0.08287 .
oxygene:temperature 1533800240  1 45.9691 2.403e-08 ***
Residuals    1468100000 44
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*' 0.1 ' ' 1
```

4)

```
HSD Test for larves

Mean Square Error: 33365909

condition, means

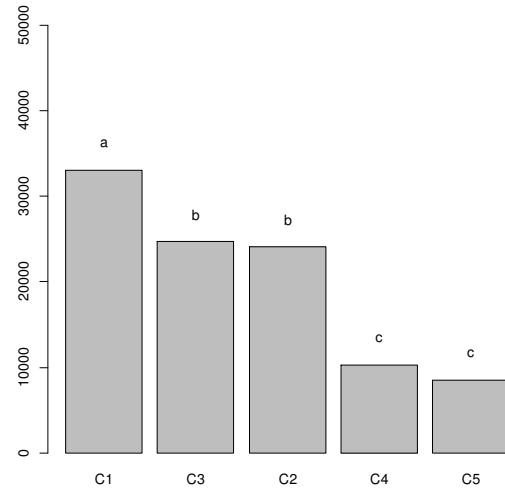
  larves      std  r  Min  Max
C1  33069  9859.457 10 22269 59469
C2  24138  3659.326 10 18958 29758
C3  24700  3822.739 10 20300 31900
C4  10260  3681.546 10  4500 15700
C5   8520  5234.501   9  2120 18120

alpha: 0.05 ; Df Error: 44
Critical Value of Studentized Range: 4.022172

Harmonic Mean of Cell Sizes 9.782609
Honestly Significant Difference: 7428.219

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means
a      C1      33070
b      C3      24700
b      C2      24140
c      C4      10260
c      C5       8520
```



```
HSD Test for larves

Mean Square Error: 67543110

oxygene, means

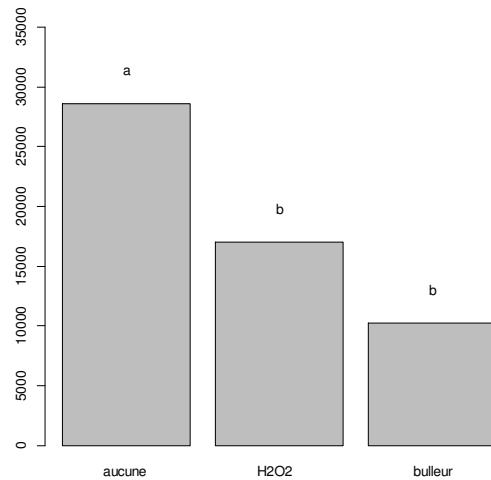
  larves      std  r  Min  Max
aucune  28603.50  8566.181 20 18958 59469
bulleur 10260.00  3681.546 10  4500 15700
H2O2    17035.79  9400.914 19  2120 31900

alpha: 0.05 ; Df Error: 46
Critical Value of Studentized Range: 3.424983

Harmonic Mean of Cell Sizes 14.80519
Honestly Significant Difference: 7315.464

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means
a      aucune      28600
b      H2O2       17040
b      bulleur     10260
```



```
HSD Test for larves

Mean Square Error: 109432895

temperature, means

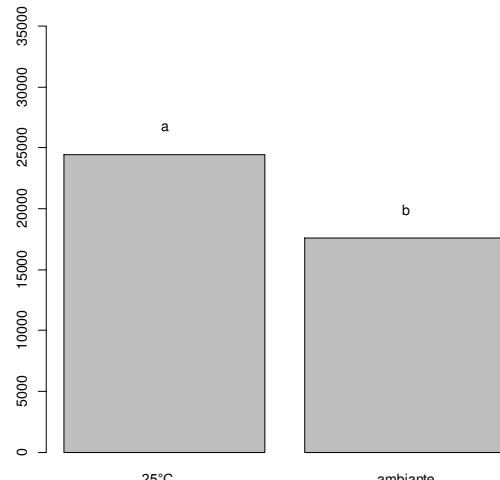
  larves      std  r  Min  Max
25°C     24419.00  3653.515 20 18958 31900
ambiante 17585.17 13214.887 29  2120 59469

alpha: 0.05 ; Df Error: 47
Critical Value of Studentized Range: 2.845031

Harmonic Mean of Cell Sizes 23.67347
Honestly Significant Difference: 6116.88

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means
a      25°C      24420
b      ambiante   17590
```



Analyses des données de l'essai 2 :

1) Shapiro-Wilk normality test

```
data: larves
W = 0.9655, p-value = 8.86e-05
```

2) Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by condition
Bartlett's K-squared = 13.3833, df = 4, p-value = 0.009547
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by temperature
Bartlett's K-squared = 3.5255, df = 1, p-value = 0.06043
```

Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: larves by oxygene
Bartlett's K-squared = 13.7796, df = 2, p-value = 0.001018
```

3)

Anova Table (Type II tests)

Response: larves

	Sum Sq	Df	F value	Pr(>F)
oxygene	9.1853e+08	2	5.5653	0.0044684 **
temperature	1.1841e+09	1	14.3483	0.0002029 ***
oxygene:temperature	4.9361e+08	1	5.9815	0.0153535 *
Residuals	1.5927e+10	193		

Signif. codes: 0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*' 0.1 '.' 1

4)

Study: mod ~ "oxygene"

HSD Test for larves

Mean Square Error: 90280725

oxygene, means

	larves	std	r	Min	Max
aucune	30846.84	11506.897	79	12400	63300
bulleur	22076.92	8181.187	39	13100	39300
H2O2	30842.50	7740.617	80	19900	47400

alpha: 0.05 ; Df Error: 195

Critical Value of Studentized Range: 3.340018

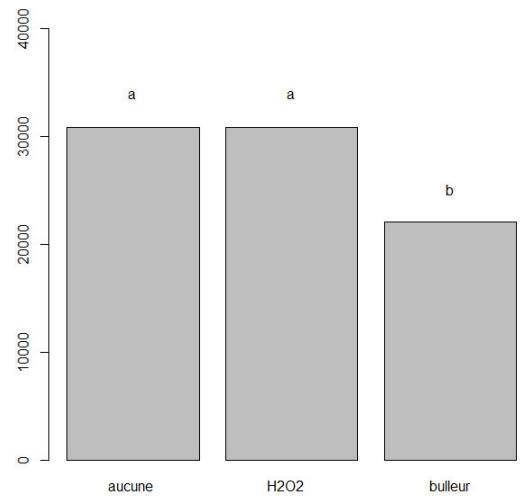
Harmonic Mean of Cell Sizes 59.05599

Honestly Significant Difference: 4129.661

Means with the same letter are not significantly different

Groups, Treatments and means

a	aucune	30850
a	H2O2	30840
b	bulleur	22080



Study: mod ~ "temperature"

HSD Test for larves

Mean Square Error: 88465326

temperature, means

	larves	std	r	Min	Max
25°C	33487.80	8309.007	82	20300	63300
ambiante	26028.45	10106.819	116	12400	51900

alpha: 0.05 ; Df Error: 196

Critical Value of Studentized Range: 2.789029

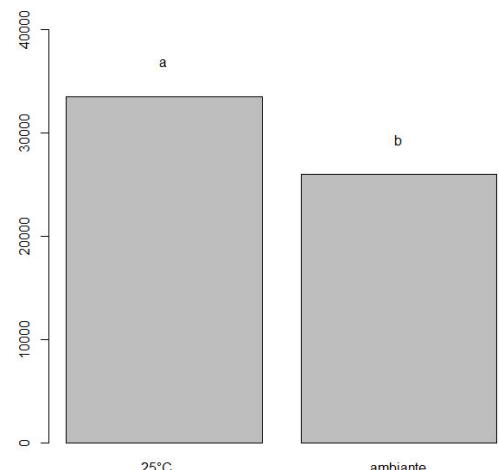
Harmonic Mean of Cell Sizes 96.08081

Honestly Significant Difference: 2676.216

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means

a	25°C	33490
b	ambiante	26030



Annexe III : Analyses statistiques –

Test de résistances :

1) Shapiro-Wilk normality test

```
data: IG
W = 0.9215, p-value = 4.406e-14
```

2) Bartlett test of homogeneity of variances

```
data: IG by variete
Bartlett's K-squared = 53.3169, df = 3, p-value = 1.569e-11

Bartlett test of homogeneity of variances

data: IG by stade
Bartlett's K-squared = 1.551, df = 1, p-value = 0.213
Bartlett test of homogeneity of variances

data: IG by contenant
Bartlett's K-squared = 1.6804, df = 1, p-value = 0.1949
Bartlett test of homogeneity of variances

data: IG by interaction(contenant, stade)
Bartlett's K-squared = 2.1892, df = 3, p-value = 0.5341
```

3) Kruskal-Wallis rank sum test

```
data: IG by variete
Kruskal-Wallis chi-squared = 213.8687, df = 3, p-value < 2.2e-16

Anova Table (Type II tests)

Response: IG
          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
contenant     82.39  1 26.3256 4.416e-07 ***
stade        134.16  1 42.8682 1.712e-10 ***
contenant:stade  4.78  1  1.5269    0.2173
Residuals    1314.39 420
---
Signif. codes:  0 '****' 0.001 '***' 0.01 '**' 0.05 '*' 0.1 ' ' 1
```

4)

```
Study: mod ~ "variете"

HSD Test for IG

Mean Square Error: 1.778041

variete, means

  IG      std   r Min Max
A 2.8316832 1.6496624 101   0   7
B 3.6785714 1.4219279 112   0   7
C 4.0188679 1.3308152 106   0   6
D 0.5047619 0.7859806 105   0   3

alpha: 0.05 ; Df Error: 420
Critical Value of Studentized Range: 3.647746
```

Harmonic Mean of Cell Sizes 105.8556
Honestly Significant Difference: 0.4727576

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means

a	C	4.019
a	B	3.679
b	A	2.832
c	D	0.5048

Study: mod ~ "contenant"

```
HSD Test for IG

Mean Square Error: 3.129503

contenant, means

  IG      std   r Min Max
pot 2.300971 1.768753 206   0   6
terrine 3.224771 1.934392 218   0   7

alpha: 0.05 ; Df Error: 420
Critical Value of Studentized Range: 2.779818
```

Harmonic Mean of Cell Sizes 211.8302
Honestly Significant Difference: 0.3378782

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means

a	terrine	3.225
b	pot	2.301

Study: mod ~ "contenant"

```
HSD Test for IG

Mean Square Error: 3.129503

contenant, means

  IG      std   r Min Max
pot 2.300971 1.768753 206   0   6
terrine 3.224771 1.934392 218   0   7

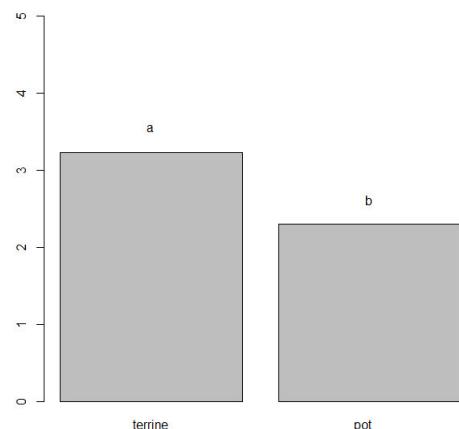
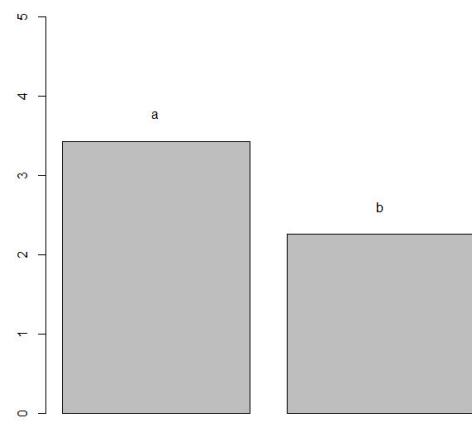
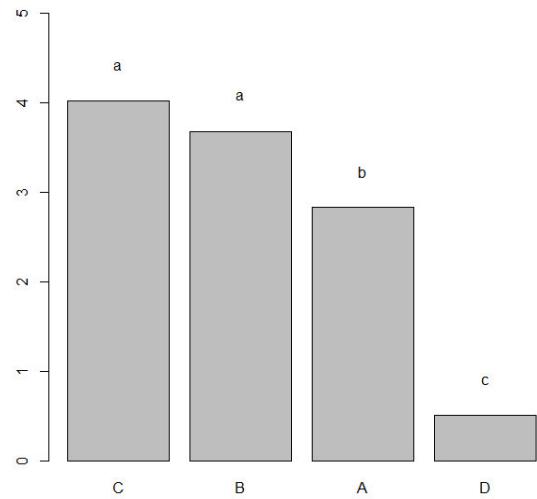
alpha: 0.05 ; Df Error: 420
Critical Value of Studentized Range: 2.779818
```

Harmonic Mean of Cell Sizes 211.8302
Honestly Significant Difference: 0.3378782

Means with the same letter are not significantly different.

Groups, Treatments and means

a	terrine	3.225
b	pot	2.301



  	<p>Diplôme / Mention : Biologie et Technologie du Végétal Spécialité : Production et Technologie du Végétal (ProTeV) Parcours : Productions Végétales Spécialisées (PVS) Option : Semences et Plants</p>
Auteur : Fabien VIALLE Date de naissance : 10 mai 1993	Organisme d'accueil : GEVES Adresse : 25 Rue Georges Morel, 49070, Beaucouzé
Nb pages : 29 Annexes : (3) 10 pages	
Année de soutenance : 2016	Maître de stage : Geoffrey ORGEUR
<p>Titre français : Mise au point d'un test de résistance du piment contre les nématodes à galles <i>Meloidogyne incognita</i>.</p> <p>Titre anglais : Development of a resistance test of pepper against root-knot nematodes <i>Meloidogyne incognita</i>.</p>	
<p>Résumé : Les nématodes à galles du genre <i>Meloidogyne</i> sont très polyphages. L'espèce <i>M. incognita</i> est la plus répandue dans le monde à l'origine de pertes économiques importantes. Les piments sont sensibles aux <i>Meloidogyne</i>. L'utilisation raisonnée de variétés résistantes permettrait de réduire la pression parasitaire des sols. Actuellement, il n'existe pas de test de résistance officiel pour ce pathosystème. L'objectif de ce stage est d'établir un protocole permettant d'évaluer la résistance des piments contre ce pathogène. Ce protocole sera proposé au CTPS et utilisé pour l'inscription des variétés au Catalogue Officiel. Pour les tests de résistance, quatre variétés de piments sont contaminées avec des tronçons de racines infectées, soit au semis, soit au stade 4 feuilles, dans deux types de contenants différents. Une échelle de notation des indices de galles est mise en place à partir de l'échelle de Zeck. Les résultats ont mis en évidence trois niveaux de sensibilité : sensible, intermédiaire et résistance selon les variétés. En parallèle, deux tests d'extraction de larves ont été réalisés dans le but de comparer différentes méthodes d'extraction et différentes conditions d'éclosion des œufs (température et oxygène). Les résultats obtenus lors du second test ont permis de valider la méthodologie. De bons rendements de larves ont été obtenus. La condition 1 (température ambiante et pas d'apport d'oxygène) a permis d'obtenir plus de larves que les autres et sera sélectionnée pour le protocole final. De futurs essais seront réalisés pour valider les différentes modalités sélectionnées avant proposition au CTPS.</p>	
<p>Abstract : Root-Knot nematodes of the genus <i>Meloidogyne</i> are very polyphage. <i>M. incognita</i> is the most widespread species causing important economical losses. Hot peppers are sensitive to <i>Meloidogyne</i>. Using resistant varieties allow to reduce the parasitic pressure in the soil. Currently, it does not exist official resistance test for this pathosystem. The objective of this internship is to establish a protocol to evaluate hot pepper's resistance against this pathogen. This protocol will be proposed to CTPS and used for the registration varieties in the Official Catalogue. For resistance tests, four different varieties of hot pepper are infected with sections of infected roots, at the sowing stage or at the four leaves stage, in two different containers. A rating scale of galls damage is adapted from the scale of Zeck. Results showed three levels of sensitivity: sensitive, intermediate and resistant. In parallel, two tests of extraction of larvae are realized with the aim to compare different extraction methods and different hatching eggs conditions (temperature and oxygen). Results obtained during the second test allowed validating the methodology. Good yields of larvae were obtained. Condition 1 (room temperature without oxygen supply) permitted to obtain more larvae than the others and will be selected for the final protocol. New tests will be realized in order to validate the conditions selected before proposal to the CTPS.</p>	
<p>Mots-clés : Piment, Nématodes, <i>Meloidogyne incognita</i>, Galles, Test de résistance, Extraction de larves</p> <p>Key Words: Pepper, Nematodes, <i>Meloidogyne incognita</i>, Root-knot, Resistance test, Extraction of larvae</p>	