



N° d'ordre... 16/2013

THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

Présentée par

Mme Samira KHALLOUK

Spécialité : Biotechnologie

INTERACTION MELOIDOGYNE-PRUNUS :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MECANISMES HISTOLOGIQUES ET DE LA DURABILITE
DE LA RESISTANCE

Formation Doctorale concernée : Sciences et Génie de la matière de la terre et de la vie

Thèse présentée et soutenue le 25 Novembre 2013 devant le jury :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Mme Majida HAFIDI	PES	FS-Meknès	Rapporteur
Mr. Eric GRENIER	Chargé de recherche	INRA France	Rapporteur
Mr. Abdellatif JANATI IDRISSE	PES	Faculté des Sciences - Fès	Rapporteur
Mr. Michel NICOLE	Directeur de recherche	IRD France	Examineur
Mr. Daniel ESMENJAUD	Ingénieur de recherche	INRA France	Examineur
Mr. Jean-Loup NOTTEGHEM	PES	SupAgro Montpellier	Directeur
Mr. Saïd AMIRI	PES	ENA- Meknès	Co-Directeur
Mr. Lahsen EL GHADRAOUI	PES	FST- Fès	Directeur
Mr. Aziz BELRHITI ALAOUI	PES	FST- Fès	Président

Année Universitaire 2013/2014

Interaction *Meloidogyne-Prunus* : Contribution à l'étude des mécanismes histologiques et de la durabilité de la résistance

Résumé Les nématodes à galles *Meloidogyne* spp. sont des ravageurs extrêmement polyphages qui attaquent notamment les espèces fruitières à noyau du genre *Prunus* sous climat méditerranéen. Face au retrait des nématicides, la résistance naturelle basée sur des portegreffe hybrides interspécifiques est privilégiée et s'appuie sur plusieurs gènes majeurs dont *Ma* à spectre complet chez le prunier et *RMia* à spectre plus étroit chez le pêcher. Du fait de la polyphagie des *Meloidogyne* et du caractère pérenne des *Prunus*, cette stratégie est exposée à un risque théorique de contournement plus élevé que chez les plantes annuelles car le même génotype est confronté à un grand nombre de générations de l'agresseur et doit donc répondre à un défi majeur de durabilité. Afin de mettre en place une gestion de la résistance génétique à long terme en particulier au Maroc, cette thèse a abordé d'une part les mécanismes histologiques de la résistance portée par *Ma* et d'autre part une approche expérimentale de la durabilité des gènes *Ma* et *RMia*. Une prospection réalisée dans la principale région de pépinières de *Prunus* au Maroc a mis en évidence dans les parcelles la fréquence élevée des trois espèces parthénogénétiques mitotiques du complexe polyphage, *M. arenaria*, *M. incognita* et *M. javanica* et donc souligné la nécessité d'une résistance à large spectre. L'étude histologique, réalisée sur *M. incognita* en tant qu'espèce-modèle de ces nématodes parthénogénétiques mitotiques, met en lumière, chez les clones résistants *Ma*, un itinéraire de pénétration et migration des larves mobiles de 2^{ème} stade qui est équivalent à celui des clones sensibles et qui est suivi de l'induction d'une réaction de type hypersensible ('hypersensitive-like reaction' = HLR) sans évolution des larves vers un stade plus avancé et sans initiation de site nourricier. Il a été montré que, notamment en présence de fortes inoculations, le méristème apical primaire des plants *Ma* est désorganisé par les larves, ce qui induit la formation de racelles latérales en amont de l'apex et constitue en fait une réaction active de défense contre le nématode. L'expérimentation de durabilité, par association de plants de *Prunus* portant différentes combinaisons des gènes *Ma* et *RMia* avec des tomates multiplicatrices assurant une pression continue d'inoculum de *M. incognita* sur des durées de 2 à 4 ans, n'a pas permis de sélectionner des nématodes virulents sur *Prunus* résistants alors que, par le même protocole, de tels virulents ont été obtenus sur tomates portant le gène de résistance *Mi* associées à des tomates multiplicatrices. Enfin un essai d'évaluation au champ de matériel génétique *Prunus* portant différentes combinaisons des gènes *Ma* et *RMia* a été initié au Maroc dans une parcelle naturellement contaminée par les trois espèces du complexe polyphage et les premiers résultats sur l'aptitude d'hôte de ce matériel sont en accord avec le spectre des gènes mis en jeu. Ce travail a donc permis de préciser nos connaissances histologiques sur le matériel portant le gène *Ma* et d'acquérir des données expérimentales sur la durabilité des gènes *Ma* et *RMia* comme base d'une stratégie de protection des espèces pérennes du genre *Prunus* contre les nématodes à galles dans le contexte marocain.

Mots-clés : *Prunus*, plante pérenne, *Meloidogyne* spp., nématode à galles, résistance génétique, mécanisme histologique, durabilité, gène majeur, prospection.

Interaction *Meloidogyne-Prunus*: Contribution to the study of histological mechanisms and durability of resistance

Abstract Root-knot nematodes (RKN) *Meloidogyne* spp. are extremely polyphagous pests that attack notably stone fruit crops *Prunus* spp. in Mediterranean climates. Because of the ban of nematicides, natural resistance (R) based on interspecific rootstocks is promising and relies on several major genes including the *Ma* complete-spectrum plum gene and the *RMia* peach gene with a more restricted spectrum. Given the polyphagy of RKN and the perennial status of *Prunus* crops, this strategy will be exposed to an increased risk of being broken than annuals because the same accession has to face a higher number of generations of the nematode pest, which challenges the durability of resistance. In order to manage this genetic resistance particularly in Morocco, this thesis first deals with the histological R mechanisms carried out by *Ma* and then with an experimental approach of the durability of both *Ma* and *RMia* genes. A survey conducted in the main *Prunus* nursery region in Morocco revealed the high frequency of the three species of the polyphagous parthenogenetic mitotic complex, *M. arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica* and thus highlighted the need for a wide spectrum resistance in *Prunus* rootstock material. The histological study, using *M. incognita* as a model species for mitotic parthenogenetic RKNs, revealed, in *Ma*-resistant plant material, i) the routes of penetration and migration of 2nd-stage juveniles (J2s) and then ii) the occurrence of a hypersensitive-like reaction (HLR) without evolution of J2s into more advanced stages and without initiation of feeding sites. We could show that, particularly under high inoculations, the primary apical meristem is completely disturbed by J2s, which induces the development of subterminal lateral roots providing an active resistance reaction to HLR damage. Durability experiments by cultivating *Prunus* plants with the different gene combinations together with RKN-susceptible tomatoes applying a continuous inoculum pressure of *M. incognita* for 2- to 4-year durations, did not allow to select virulent nematodes on R *Prunus*, while, using the same protocol, such virulent individuals were obtained on tomatoes carrying the *Mi* R gene co-cultivated with susceptible tomatoes. Lastly a field experiment for evaluation of *Prunus* material carrying different combinations of the *Ma* and *RMia* genes has been initiated in Morocco in a plot naturally infected with the three species of the polyphagous complex and the first results on the host suitability of this material are in agreement with the spectra of the genes involved. Therefore this work permitted to gain a good histological knowledge on plant material carrying the *Ma* gene and to acquire experimental data on the durability of *Ma* and *RMia* genes as a basis for the control strategy of *Prunus* perennial crops against RKN in the Moroccan context.

Key words: *Prunus*, perennial plant, *Meloidogyne* spp., root-knot nematode, genetic resistance, histological mechanism, durability, major gene, survey.

SOMMAIRE

Introduction générale	7
A. Généralités	11
I- Les nématodes	12
I-1 Le phylum des Nematoda	12
I-2 Les nématodes phytoparasites	12
I-3 Le genre <i>Meloidogyne</i> : les nématodes à galles.....	14
I-3-1 Position systématique.....	14
I-3-2 Cycle biologique et reproduction	14
I-3-3 Interaction compatible entre les <i>Meloidogyne</i> et la plante.....	17
I-3-4 Les symptômes et dégâts.....	19
I-3-5 Identification et diversité génétique des nématodes.....	21
I-3-6 Les moyens de lutte.....	22
II- Les arbres fruitiers à noyaux.....	23
II-1 Données botaniques et génomiques.....	23
II-2 Cartographie génétique des <i>Prunus</i>	24
II-3 Les porte-greffe des <i>Prunus</i>	25
II-3-1 Le rôle des porte-greffe	25
II-3-2 L'amélioration des porte-greffe	25
II-3-3 Le prunier myrobolan	26
III- La résistance des plantes aux agents pathogènes	27
III-1 Notions générales sur la résistance des plantes aux agents pathogènes.....	27
III-2 Structure-fonction des gènes de résistance et mécanismes de reconnaissance des effecteurs	27
III-3 la résistance des plantes aux nématodes <i>Meloidogyne</i>	30
III-3-1 Les gènes de résistance.....	30
III-3-2 Les mécanismes biologiques et histologiques	33
III-4 La durabilité de la résistance.....	36
III-4-1 La notion de durabilité.....	36
III-4-2 La durabilité de la résistance vis-à-vis des nématodes <i>Meloidogyne</i>	39
B. Importance des problèmes de <i>Meloidogyne</i> en pépinières de <i>Prunus</i> dans la région du Saïs et Moyen-Atlas	45
I- Introduction	46
II- Matériel et méthodes.....	466
II-1 Présentation de la zone d'étude	46

II-2 Méthode d'échantillonnage	46
II-2-1 Choix des pépinières	46
II-2-2 Technique de prélèvements des échantillons.....	46
II-3 Traitement des échantillons.....	47
II-3-1 Evaluation des niveaux d'inoculum en laboratoire	47
II-3-2 Test biologique	47
II-3-3 Identification spécifique des <i>Meloidogyne</i>	48
III - Résultats	49
III-1 Détection des nématodes <i>Meloidogyne</i> en fonction du secteur géographique.....	49
III – 2 Résultats du test biologique	49
III-3 Identification spécifique des populations de <i>Meloidogyne</i>	50
IV- Discussion et conclusion.....	51
C. Mécanismes histologiques de la résistance vis-à-vis de <i>M. incognita</i> chez les <i>Prunus</i>	53
I – Introduction	54
II- Article publié.....	54
D. Evaluation de la durabilité de la résistance du gène <i>Ma</i>	62
D.1 Etude de la durabilité en conditions contrôlées.....	63
I- Introduction	63
II- Article publié.....	63
D.2 Spectre de résistance en conditions contrôlées de diverses accessions de <i>Prunus</i> et premiers éléments de la durabilité de leur résistance <i>Ma</i> et <i>RMia</i> dans un essai au champ au Maroc	72
I- Introduction	72
II- Matériel et Méthodes	72
II-1 Matériel végétal	72
II-2 Protocole d'étude du spectre de résistance du matériel <i>Prunus</i> en serres.....	73
II-3 Protocole d'étude de la durabilité de la résistance chez les <i>Prunus</i> vis-à-vis de populations marocaines de <i>Meloidogyne</i> au champ.....	74
III- Résultats et discussion.....	76
III-1 Spectre de résistance du matériel en serre vis-à-vis de cinq espèces de <i>Meloidogyne</i>	76
III-1.1 Résultats.....	76
III-1-2 Discussion.....	77
III-2 Identification des espèces de <i>Meloidogyne</i> présentes dans la parcelle d'essai	77
III-2-1 Résultats.....	77
III-2-2 Discussion.....	78

