

## CHAPITRE IV

### RESISTANCE DES PLANTES AUX BACTERIES



## TESTS DE RESISTANCE DES *MALOIDEAE* AU FEU BACTERIEN (*Erwinia amylovora*)

Roland Chartier<sup>1</sup>

Provoquée par une entérobactérie *Erwinia amylovora*, cette maladie qui attaque Poirier, Pommier, Aubépine, Pyracantha, Cotoneaster, Sorbier, ... est en train de se généraliser en Europe. Les moyens de lutte directs (chimiques, biologiques) sont peu efficaces. C'est pourquoi la plantation et la sélection de cultivars résistants constituent une méthode intéressante. La connaissance de la sensibilité d'un cultivar à *E.amylovora* repose sur l'observation au champ. Elle peut aussi s'obtenir expérimentalement par différentes méthodes :

- sur microboutures *in vitro*,
- sur scions en serre,
- sur arbres (pousses et fleurs) au verger.

En France celles-ci ont été mises au point par le laboratoire feu bactérien de l'UMR PaVé, au centre INRA d'Angers.

**Remarque :** *E. amylovora* étant une bactérie de quarantaine, l'expérimentation avec cette bactérie exige des autorisations des Services Officiels (Direction Générale de l'Alimentation, Service de la Protection des Végétaux). Elle ne peut se faire que dans des locaux agréés.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Matériel végétal

##### 1.1.a. Boutures *in vitro* (Poirier)

Des extrémités de tiges (1,5 à 2 cm) en croissance active sont repiquées une à deux semaines avant inoculation, sur milieu de culture approprié. Des variétés à comportement connu sont obligatoirement incorporées dans la liste des cultivars à tester : Old Home (résistant), Passe Crassane (sensible). Prévoir au moins 24 répétitions par variété.

##### 1.1.b. Scions en serre (S2) (Pommier et Poirier)

Des greffons prélevés sur les cultivars de comportement connu ou à tester sont greffés sur des porte-greffes (Poirier : BA 29, Pommier : MM106). Ces scions cultivés en pots sont disposés en serre (18°C la nuit, et 22°C le jour en lumière naturelle). Une croissance régulière est assurée par un arrosage journalier et un apport d'engrais. Le greffon doit avoir un développement compris entre 15 et 20 cm avant d'être inoculé, mais il doit toujours être en croissance. Les standards résistants et sensibles à greffer sont respectivement : Poirier (Old Home et Passe Crassane) et Pommier (Evereste et Idared). Prévoir au moins 9 répétitions (9 individus par variété à tester).

##### 1.1.c. Arbres au verger

En parcelle de quarantaine, conduire les scions sur plusieurs pousses pendant trois ans minimum avant de réaliser les premières inoculations. Pour les inoculations sur fleurs, il faut attendre 5 ans. Un arbre constitue une répétition. Chaque variété est représentée par au moins cinq arbres. Il est indispensable de planter également les variétés standard de sensibilité et de résistance connues.

---

<sup>1</sup> UMR PaVé, Centre INRA d'Angers, 42 rue Georges Morel, BP 60057, 49071 BEAUCOUZE CEDEX

Marquer individuellement des pousses d'une longueur de 15-20 cm au minimum et en pleine croissance au moment de l'inoculation (on note le n° et la longueur de la pousse). Sur fleurs, marquer les bouquets dont au moins une fleur est ouverte au moment de l'inoculation (on note le n° du bouquet). L'effectif à inoculer est d'au moins 12 pousses (3 pousses par arbre sur 4 arbres). Pour les fleurs, il est de 100 bouquets (25 par arbre sur 4 arbres) par variété.

## 1.2. Inoculum bactérien

*E. amylovora* est conservée par lyophilisation (Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Angers). Elle peut être aussi conservée à -20°C dans un milieu approprié (50% glycérol et 50% de milieu B de King). On vérifie la pureté par étalement à la sortie de conservation. On ensemence la bactérie sur milieu B de King solide (boîte de Pétri) et on incube 24 heures à 26°C. Prélever à l'anse et faire une suspension dans de l'eau distillée stérile. On ajuste la concentration, par exemple par comparaison à l'échelle de Mc Farland (Tableau 1) qui est un test visuel en tube de l'opacité de la suspension bactérienne. On place ensuite le tube de la suspension ajustée visuellement dans de la glace pilée pour le transport entre le laboratoire, la serre ou le verger. Il faut absolument que le délai entre la préparation de l'inoculum et l'inoculation n'excède pas 3 heures (même dans la glace). La souche de référence utilisée en France est la souche CFBP 1430.

Solution A (ml)	Solution B (ml)	Nombre de bactéries <i>Escherichia coli</i> /ml	Numéro du tube
0,1	9,9	$3,0 \cdot 10^8$	1
0,2	9,8	$6,0 \cdot 10^8$	2
0,3	9,7	$9,0 \cdot 10^8$	3
0,4	9,6	$1,2 \cdot 10^9$	4
0,5	9,5	$1,5 \cdot 10^9$	5
0,6	9,4	$1,8 \cdot 10^9$	6
0,7	9,3	$2,1 \cdot 10^9$	7
0,8	9,2	$2,4 \cdot 10^9$	8
0,9	9,1	$2,7 \cdot 10^9$	9
1	9	$3,0 \cdot 10^9$	10

Solution A : BaCl<sub>2</sub> 1% dans de l'eau distillée, solution B : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dans de l'eau distillée.

**Tableau 1 : Echelle d'opacité de Mc Farland**

## 1.3. Inoculation

### 1.3.a. *In vitro*

Trois piqûres de la plus jeune feuille développée, à l'aide d'une pince à griffes préalablement trempée dans la suspension bactérienne  $10^6$  u.f.c /ml (unité formant colonie).

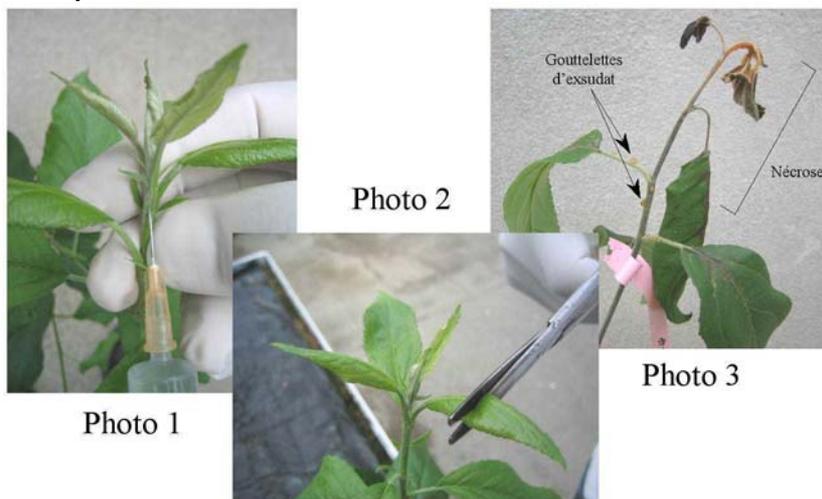
### 1.3.b. *En serre*

Sur jeunes pousses (en pleine croissance uniquement), coupure de la plus jeune feuille développée au 1/3 inférieur du limbe avec des ciseaux préalablement trempés dans la suspension bactérienne ( $10^7$  u.f.c/ml pour Poirier et  $10^8$  pour Pommier). On peut également couper la feuille en formation (photo 2).

### 1.3.c. *En verger*

Pour les inoculations sur pousses, on injecte la suspension bactérienne ( $10^7$  u.f.c /ml pour le Poirier, et  $10^8$  u.f.c /ml pour le Pommier) jusqu'à refus dans des pousses en croissance, à 1 cm en dessous de l'apex, à l'aide d'une seringue (photo 1).

Pour les inoculations sur fleurs, on dépose dans chaque fleur 30  $\mu$ l de suspension bactérienne à  $10^8$  u.f.c /ml ou on pulvérise à cette dernière concentration.



## 1.4. Incubation – Lecture

### 1.4.a. *In vitro*

Les vitro plants inoculés sont placés dans une étuve à température constante (22°C) à l'obscurité pendant 2 semaines. On note la fréquence des nécroses apparues, soit limitées au pétiole, soit étendues à la tige.

### 1.4.b. *En serre*

Les plants inoculés et placés en serre (18°C nuit et 22°C jour, sous éclairage naturel) font l'objet de 3 observations (1 par semaine pendant 3 semaines). Les symptômes (photo 3) sont notés selon le tableau 2.

0	Aucun symptôme
Nn	Nécrose nervure
Nnp	Nécrose nervure pétiole
Nt,x	Nécrose tige + longueur de la nécrose (x=cm)

**Tableau 2** : Echelle de notation des symptômes

### 1.4.c. *En verger*

Pour les inoculations sur pousses, on note 3 semaines après inoculation la présence de la nécrose obtenue et sa longueur. On obtient la fréquence d'infection (nombre de nécroses / nombre de pousses inoculées) et la sévérité (longueur de la nécrose / longueur de la pousse). Pour les inoculations sur fleurs, on note 3 semaines après inoculation le nombre de bouquets malades. On obtient une fréquence d'infection (nombre de bouquets malades / nombre de bouquets inoculés).

## 2. RESULTATS

Les résultats obtenus peuvent être soumis à différents tests statistiques (Le Lézec *et al*, 1997). Ce qui est essentiel, c'est la comparaison des résultats avec ceux obtenus avec les variétés standard inoculées dans les mêmes conditions.

En verger, la répartition en classes de la fréquence d'infection (F) et de la sévérité de l'attaque (S) permet d'établir un Indice de Sensibilité Variétale (ISV). Cet indice caractérise le comportement des génotypes vis à vis du feu bactérien ; exemple pour le poirier cf tableau 3 d'après Le Lezec *et al* 1997.

	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>ISV</b>	<b>SV</b>
<b>OLD HOME</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>1. TRES RESISTANT</b>
<b>HARROW SWEET</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>1. TRES RESISTANT</b>
<b>CONFERENCE</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>1. TRES RESISTANT</b>
<b>ELLIOT</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>23</b>	<b>2. RESISTANT</b>
<b>ROGUE RED</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>2. RESISTANT</b>
<b>LOMBACAD</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>3. INTERMEDIAIRE</b>
<b>HARTMAN</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>47</b>	<b>3. INTERMEDIAIRE</b>
<b>WILLIAM'S</b>	<b>4 - 5</b>	<b>2 - 5</b>	<b>57</b>	<b>4. SENSIBLE</b>
<b>RED ANJOU</b>	<b>4 - 5</b>	<b>3 - 5</b>	<b>59</b>	<b>4. SENSIBLE</b>
<b>BAUROUTARD</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>5. TRES SENSIBLE</b>
<b>D. DU COMICE</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>5. TRES SENSIBLE</b>

**Tableau 3** : Classe de sensibilité variétale chez le poirier (SV)

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces tests sont utilisés : pour la mesure de la sensibilité au feu bactérien de poiriers transgéniques (Malnoy *et al*, 2003), pour l'établissement de listes de sensibilité variétale de poiriers, pommiers, porte-greffes, et de plantes d'ornement (Le Lezec *et al*, 1997, Paulin *et al*, 1998), pour la sélection de plantes résistantes (Bellenot-Kapusta *et al*, 2002).

Il est préférable de réaliser 3 séries de tests indépendants (c'est à dire 3 années différentes pour les tests en verger), pour limiter les conséquences de la variabilité des résultats.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bellenot-Kapusta V, Chartier R, Brisset MN, Paulin JP (2002) Selection of genotype of *Cotoneaster* with a high level of resistance to fire blight. *Acta Horticulturae* 90:385-387.
- Brisset MN, Paulin J.P, Duron M (1988). Feasibility of rating fire blight susceptibility of pear (*Pyrus communis*) cultivars on in vitro microcuttings. *Agronomie* 8:707-710.
- Le Lezec M, Lecomte P, Laurens F, Michelesi JC (1997) Sensibilité variétale au feu bactérien. *L'Arboriculture Fruitière* 503:57- 62, 504:33-38, 505:31-40.
- Malnoy M, Venisse JS, Brisset MN, Chevreau E (2003) Expression of bovine lactoferrin DNA confers resistance to *Erwinia amylovora* in transgenic pear. *Molecular Breeding* 12:231-234.
- Paulin JP, Chartier R, Cadic A (1998) Sensibilité au feu bactérien de quelques représentants du genre *Sorbus*. *Phytoma – La défense des végétaux*, 521, 62 – 64.

## EVALUATION AU CHAMP DE LA RESISTANCE DE LA POMME DE TERRE AUX GALES COMMUNES

*Michel Bozec<sup>1</sup>, Jacques Soyer<sup>2</sup>, Daniel Ellissèche<sup>1</sup>*

Les gales communes sont des altérations superficielles provoquées par des bactéries appartenant au genre du genre *Streptomyces*. En France, deux types principaux de symptômes (en pustules d'une part, réticulé ou liégeux d'autre part) ont été décrits (Pasco et Jouan, 1996). Des études réalisées sur la connaissance des agents responsables de ces maladies ont montré qu'au moins trois espèces provoquent la gale pustuleuse (*Streptomyces scabies*, *S. stelliscabiei* et *S. europaeiscabiei*) et une autre espèce (*S. reticuliscabiei*) la gale réticulée (Bouчек-Mechiche *et al.*, 1999). Des sols légers, aérés et à pH alcalin sont favorables au développement des *Streptomyces*. Les différentes espèces ont des optima thermiques différents. La gale en pustules se caractérise par l'apparition de lésions sur les tubercules sous forme de chancres en dépression ou en relief qui peuvent affecter plus ou moins la chair des tubercules. Les symptômes de la gale réticulée ou liégeuse se présentent sous forme d'un épaissement du périoderme dessinant des réseaux plus ou moins réguliers à la surface des tubercules. Ces lésions n'altèrent pas la chair des tubercules en profondeur.

Ces maladies étaient jusqu'à récemment considérées comme secondaires, bien que l'agent pathogène responsable de la gale liégeuse puisse endommager les stolons, la base des tiges et les racines des variétés sensibles et donc affecter les potentialités de rendement des cultures (Pasco *et al.*, 1989). La pratique, quasi généralisée maintenant, du lavage des tubercules (environ 80% de la récolte) avant leur commercialisation sur le marché de consommation en frais met en évidence leurs défauts de présentation et accroît l'incidence économique de ces maladies.

Les possibilités de lutte sont très limitées : allongement des durées de rotation, utilisation de certains engrais, irrigation en particulier au moment de l'initiation et du début de grossissement des tubercules, encore que cette technique paraisse plus efficace pour réduire la gale en pustules que la gale liégeuse (Scholte et Labruyère, 1985) et surtout utilisation de variétés résistantes. Même si le déterminisme génétique des résistances n'est pas encore bien connu, on observe une certaine variabilité phénotypique et il est donc possible de sélectionner des variétés d'un certain niveau de résistance à l'une ou l'autre des deux formes de gale commune (Ellissèche et Bozec, 1997). Le mode opératoire décrit ici permet d'évaluer le niveau et le type de résistance des génotypes de pomme de terre.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Matériel végétal

Le matériel végétal nécessaire comprend 1) les génotypes et/ou les variétés à tester 2) des variétés témoins représentatives des différents types et niveaux de résistance.

Les tubercules de tous ces génotypes auront été conservés et préparés de la même façon avant plantation (p. ex. : conservation hivernale à +2, +4°C suivie d'une pré-germination d'environ 4 semaines) afin de ne pas introduire un biais expérimental qui serait dû à une hétérogénéité de levée des plantes d'un génotype à l'autre.

<sup>1</sup> INRA, UMR INRA-Agrocampus Rennes APBV, Keraiber, F-29260 Ploudaniel, France

<sup>2</sup> GEVES, La Minière – 78285 Guyancourt Cedex, France



**Echelle photographique : Gravité des Symptômes de gale liégeuse**



**Echelle photographique : Gravité des Symptômes de Gale en Pustules**

### **1.2. Dispositif expérimental**

Le dispositif est un essai blocs de Fisher à 4 répétitions mis en place 2 années de suite, avec des parcelles élémentaires d'au moins 8 plantes. Il doit être implanté dans un champ dont le sol est infesté par la bactérie. Le degré d'infestation peut-être entretenu par un retour fréquent de variétés sensibles ainsi qu'un pH maintenu basique (de l'ordre de 8) et un milieu aéré.

### 1.3. Notation des symptômes sur les géotypes et utilisation des données

A la récolte, un échantillon de 100 tubercules est prélevé dans chaque parcelle élémentaire. Les tubercules sont lavés afin de faciliter l'observation visuelle des symptômes. Sont notées l'importance de la surface galeuse et la gravité des symptômes sur chaque tubercule.

Par référence à des échelles photographiques, les symptômes des tubercules sont répartis en classes de gravité comme suit: nuls (a), légers (b), moyens (c), graves (d) et très graves (e).

Sur les échelles photographiques : a=1, b=3, c=5, d=7 et e=9. L'indice de gravité (Ig) est calculé selon la formule suivante :

$$I_g = (0 \times a) + (2 \times b) + (4 \times c) + (6 \times d) + (8 \times e)$$

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les résultats présentés ici portent sur 5 variétés et illustrent l'existence de plusieurs niveaux et de deux types de résistance différents. La présence des 2 types de symptômes atteste la présence d'au moins 2 agents pathogènes (dans le cas du site de Ploudaniel où ces résultats ont été obtenus, une analyse du sol a bien confirmé la présence de *S. europaeiscabiei* et de *S. reticuliscabiei*). Ils montrent que la hiérarchie entre ces variétés se conserve d'une année sur l'autre (elles peuvent être utilisées comme témoins). Par conséquent, malgré la durée limitée (2 ans) proposée pour l'évaluation d'un géotype donnée, celle-ci peut être considérée comme fiable et elle autorise aussi la comparaison des niveaux de résistance entre variétés qui n'ont pas été expérimentées simultanément. On constate également que si les variétés présentent différents niveaux de gravité de symptômes et donc de résistance vis-à-vis de la gale en pustules, en revanche, vis-à-vis de la gale liégeuse, elles n'expriment pas toujours des symptômes. Ceci laisse supposer qu'il s'agit bien de 2 caractères, à déterminisme génétique différent. Statistiquement, on observe que beaucoup de variétés sont résistantes à la gale liégeuse et les variétés sensibles paraissent avoir une origine génétique commune. Certaines variétés, comme Bintje et Désirée, sont sensibles aux 2 types de gales. Ces résultats montrent également une certaine variation inter-annuelle de la gravité des attaques qui peut s'expliquer par les différences de conditions climatiques, en particulier au moment de la tubérisation de chacune des variétés.

variétés	années	Symptôme liégeux			Symptôme en pustules		
		2001	2002	2003	2001	2002	2003
Désirée	<b>Ig*</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>68</b>	<b>371</b>	<b>257</b>	<b>365</b>
	%(g+tg)**	0	0	3	13	3	28
Bintje	<b>Ig</b>	<b>55</b>	<b>48</b>	<b>92</b>	<b>304</b>	<b>274</b>	<b>312</b>
	%(g+tg)	1	0	2	4	3	16
Urgenta	<b>Ig</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>373</b>	<b>367</b>	<b>365</b>
	%(g+tg)	0	0	0	9	11	28
Bf 15	<b>Ig</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>135</b>	<b>177</b>	<b>210</b>
	%(g+tg)	0	0	0	0	0	4
Ackersegen	<b>Ig</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>130</b>	<b>37</b>	<b>147</b>
	%(g+tg)	0	0	0	0	0	0

\* Ig : Indice de gravité

\*\* %(g+tg) : pourcentage de tubercules gravement et très gravement atteints

**Tableau 1** : Comportement vis-à-vis des gales communes de 5 variétés à Ploudaniel pendant 3 ans

### 3. CONCLUSION

Le mode opératoire présenté ici nécessite d'avoir à disposition un terrain fortement contaminé, avec maintien des conditions agronomiques favorables à cette contamination et présence de pathotypes de *Streptomyces* responsables des 2 types de symptômes de gales : en pustules et liégeuse. La méthode indiquée permet alors de caractériser la résistance des variétés. La résistance à un seul type de gale peut sans doute être valorisée en terrain infesté par un pathotype ne pouvant pas contourner cette résistance, ce qui suppose une connaissance préalable du ou des pathotypes présents en un lieu de culture donné. Cependant, il n'est pas sûr que la culture répétée de variétés possédant ce seul type de résistance ne conduise pas à une évolution de la flore des *Streptomyces* à l'avantage de pathotypes plus agressifs.

### BIBLIOGRAPHIE

- Boucek-Mechiche K, Gardan L, Normand P, Jouan B, 1999. DNA relatedness among strains of *Streptomyces* pathogenic to potato in France : description of three new species, *S. europaeiscabiei* sp. nov. , *S. stelliscabiei* sp. nov. Associated with common scab, and *S. reticuliscabiei* sp. nov. Associated with netted scab. *Int. J. Syst. Bactériol.*
- Ellissèche D, Bozec M, 1997. Gale commune, incidence des variétés. *La pomme de terre française*. 499 : 41-42.
- Pasco C, Jouan B, Saily M, 1989. La gale commune de la pomme de terre. *La protection de la pomme de terre*. ITPT. pp 117-123.
- Pasco C., Jouan B., 1996. Gale commune de la pomme de terre. *In* : La Pomme de terre, INRA Editions, 265-269.
- Scholte K., Labruyère R.E., 1985. Netted scab : a new name for an old disease in Europe. *Potato Res.*, 28, 443-448.

### PHOTOGRAPHIES

Les échelles photographiques utilisées proviennent de :  
EUROPÄISCHE GESELLSCHAFT FÜR KARTOFFELFORSCHUNG  
Sektion Varieties – ( Prof. Dr. E. R. Keller; 29/10/1968)  
Institut für Pflanzenbau der ETH  
Universitätstrasse 2 - 8006 ZÜRICH - Schweiz

## COMPORTEMENT VARIÉTAL DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DES GALES COMMUNES : Test en conditions contrôlées

Claudine Pasco<sup>1</sup>

Le terme de gales communes de la pomme de terre regroupe plusieurs maladies différentes. Elles se distinguent par les agents pathogènes impliqués, les symptômes produits, la gamme d'hôtes, le comportement variétal et les conditions environnementales favorisant le développement de la maladie. **La gale pustuleuse** est due soit à *Streptomyces europaeiscabiei*, *S. stelliscabiei* ou *S. scabies* et **la gale liégeuse** est due à *S. reticuliscaliei*. De plus, certaines souches particulières de *S. europaeiscabiei* sont capables de donner soit des pustules, soit du liège en fonction des conditions environnementales et/ou de la variété.

En l'absence de lutte chimique, et étant donné que les pratiques culturales préconisées (rotations courtes, éviter le chaulage, utilisation d'engrais verts) ne sont pas toujours efficaces, l'utilisation de variétés résistantes ou peu sensibles reste le seul moyen pour lutter efficacement contre ces deux maladies. L'utilisation d'un outil de piégeage pour connaître les populations présentes dans le sol renforcera l'efficacité du choix variétal.

Pour pouvoir évaluer la sensibilité des variétés de pomme de terre aux différentes formes de gale commune, il est important de disposer d'une méthode standardisée et reproductible. En effet, le comportement des variétés et génotypes en cours d'inscription au catalogue officiel du Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS) est évalué dans une parcelle naturellement infestée par les deux types de gale (liège et pustule). Cependant, selon les conditions climatiques de l'année, l'un ou l'autre type de gale ne s'exprime pas ou peu. Le test présenté ici a été mis au point par C. Pasco (Pasco et al. Sous presse).

Il est réalisé en sol artificiellement contaminé par des souches de *Streptomyces* typées ; il est donc adapté aux deux maladies et peut-être mené en contre-saison (en hiver), permettant ainsi un gain de temps supplémentaire

**La gale pustuleuse** se présente sous forme de chancres en dépression ou en relief, de taille et d'aspect variables. Les lésions affectent plus ou moins profondément la chair du tubercule, et parfois la base des tiges des variétés sensibles. En dehors de la pomme de terre, diverses plantes peuvent extérioriser des symptômes de gale : c'est le cas de la carotte, du radis, de la betterave, de la patate douce et de l'arachide. **La gale réticulée ou liégeuse** se traduit par un simple épaissement du périoderme, formant en surface des réseaux plus ou moins réguliers. L'étendue de ce symptôme varie de quelques tâches à la totalité de la surface des tubercules, qui dans les cas extrêmes peuvent présenter des éclatements. Ce symptôme n'endommage pas les tubercules en profondeur, mais il altère leur présentation. De plus, cette maladie provoque des nécroses sur les stolons, la base des tiges et surtout les racines des variétés sensibles, ce qui peut avoir pour effet une diminution du rendement.

**Les *Streptomyces*** sont des bactéries filamenteuses et sporulantes à Gram positif, aérobies strictes.

<sup>1</sup> UMR BiO3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, pasco@rennes.inra.fr

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Matériel

- Tubercules des variétés à tester conservés à 10°C
- Tubercules de variétés témoin connues
- Anse de platine, étuve à 27°C, mortier, pilon
- Souches types de *Streptomyces*
- Bétonnière et plateaux en aluminium
- Allumettes, alcool à 90°, transplantoir
- Solution nutritive NPK 15/10/15
- Milieu Potato Dextrose Agar<sup>1</sup>(PDA) coulé en boîtes de Pétri
- Mélange 2/3 tourbe + 1/3 sable stérilisé en vapeur fluante
- Enceinte à 20°C munie d'un éclairage
- Pots (Ø 14 cm), plateaux, tuteurs
- Etiquettes, sac papier (récolte)
- Eau distillée stérile, erlenmeyer 500 mL
- Gouge à melon (oeilletons)
- Essuie tout, éponge
- Broyeur Warring avec bols de 100 mL

### 1.2. Préparation du matériel végétal

Différents types de matériel peuvent être utilisés, soit des mini tubercules de type B1 (matériel de sélection de 1<sup>ère</sup> année issu de culture in vitro), des boutures (mode de préparation décrit dans l'article concernant le test *Erwinia* sur tiges) ou des oeilletons préparés à partir des tubercules des variétés à tester. Les tubercules B1 sont soigneusement lavés à l'eau courante et triés pour éliminer les éventuels défauts.

**Préparation des oeilletons :** Les tubercules des variétés à tester sont soigneusement lavés à l'eau courante, triés afin d'éliminer les tubercules atteints de gale commune, de rhizoctone brun ou d'autres symptômes apparents, puis mis à germer en clayettes pendant 15 jours dans la pénombre. Les oeilletons (20 mm de Ø) sont prélevés à l'aide d'une gouge à melon. Ils sont ensuite déposés sur du papier filtre puis sont laissés cicatriser pendant 24 heures avant d'être plantés.

### 1.3. Préparation de l'inoculum

A partir de la souche type de *Streptomyces* conservée à 4°C, la bactérie est ensemencée par stries avec une anse de platine sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA. Les boîtes sont incubées à 27°C pendant 15 jours. Si le nombre de boîtes à ensemencer est important, il vaut mieux préparer un broyat bactérien concentré et en déposer 50 µL par boîte de Pétri à l'aide d'une pipette de précision et de cônes stériles. L'ensemencement se fait alors soit par stries avec une anse de platine, soit avec une pipette Pasteur recourbée à la flamme en forme de râteau.

**Préparation du broyat bactérien :** Prélever quelques colonies de *Streptomyces* et les broyer dans un mortier stérile à l'aide d'un pilon. Ajouter 1 à 2 mL d'eau stérile pour obtenir une suspension bactérienne très concentrée.

La suspension bactérienne servant à inoculer le mélange tourbe/sable est préparée par broyage du contenu de 2 boîtes de culture dans 200 mL d'eau stérile à l'aide d'un broyeur de type Warring. Commencer le broyage dans très peu d'eau (20 mL) jusqu'à obtenir une suspension lisse et homogène. Rajouter ensuite le volume d'eau restant et stocker à 4°C jusqu'à utilisation.

### 1.4. Inoculation du mélange tourbe/sable

La suspension bactérienne bien homogénéisée est directement incorporée au contenu de 6 pots de mélange tourbe/sable dans un plateau en aluminium auparavant flambé à l'alcool. L'homogénéisation

Pour des besoins très importants en mélange inoculé avec une même souche, il est possible d'utiliser une bétonnière pour effectuer le mélange. L'homogénéisation dure alors 5 minutes et la bétonnière est lavée et désinfectée à l'alcool entre chaque souche.

<sup>1</sup> Composition type (g/litre) : Infusate de pomme de terre 4,0 ; D(+)-Glucose 20,0 ; Agar-agar 15,0.

s'effectue manuellement ou avec un transplantoir. Le mélange ainsi obtenu est ensuite réparti en pots sans le tasser. Il est recouvert d'une bâche plastique pour éviter le dessèchement et est laissé au repos pendant 8 à 15 jours à température ambiante, de manière à ce que la bactérie puisse s'installer. Le dispositif comporte également des pots témoins contenant du mélange tourbe/sable stérile inoculé avec de l'eau. Veillez à laver et flamber à l'alcool le plateau en aluminium et le transplantoir entre chaque souche.

### 1.5. Plantation et culture

La plantation s'effectue à raison d'un tubercule de type B1, de deux boutures ou de deux œilletons par pot. Le nombre de répétitions (pots) peut varier mais il est préférable d'en prévoir un minimum de trois par variété et par souche de *Streptomyces*. Prévoir également d'incorporer au dispositif des variétés dont le comportement vis-à-vis des gales communes est connu, par exemple :

	Gale pustuleuse	Gale liégeuse
<b>Bintje ou Désirée</b>	Très sensibles	Très sensibles
<b>Urgenta</b>	Très sensible	Résistante
<b>Saturna</b>	Peu sensible	Résistante

Il n'existe pas actuellement de variétés entièrement résistantes aux deux types de gale.

Les plantes sont cultivées en enceinte à 15-20°C avec une photopériode de 16 heures et sont arrosées suivant leurs besoins avec de l'eau.

Une solution d'engrais (NPK) est apportée tous les deux arrosages à une concentration finale de 2g/L. Des traitements insecticides sont effectués si besoin pour lutter contre les aleurodes et les pucerons.

**Expression des symptômes :** L'optimum thermique de la gale pustuleuse est situé aux environs de 20-22°C alors que celui de la gale liégeuse n'est que de 17-18°C. Il est donc préférable, si c'est possible d'utiliser deux enceintes à des températures différentes.

### 1.6. Récolte et notation des tubercules et du chevelu racinaire

1.6.a. les tubercules : Lorsque les plantes sont arrivées à maturité, c'est-à-dire au bout de trois à quatre mois de culture, les tiges sont coupées et les tubercules sont récoltés puis lavés à l'eau courante. Ils sont ensuite notés individuellement suivant le pourcentage de surface recouverte par la gale et la profondeur des lésions observées à l'aide des échelles suivantes :

Pourcentage de surface recouverte par la gale	Type de lésions (profondeur)
0 aucune lésion	0 aucune lésion
1 0 à 10 %	1 lésions superficielles = liège
2 10 à 25 %	2 pustules superficielles
3 25 à 50 %	3 pustules profondes
4 50 à 75 %	
5 75 à 100 %	

Un indice de gale (IG) est calculé pour chaque tubercule suivant la formule suivante (Cetas et Jones, 1962).

$$\text{IG} = \frac{\text{Classe correspondant au \% de surface recouverte} \times \text{Classe correspondant au type de lésions}}{100/15}$$

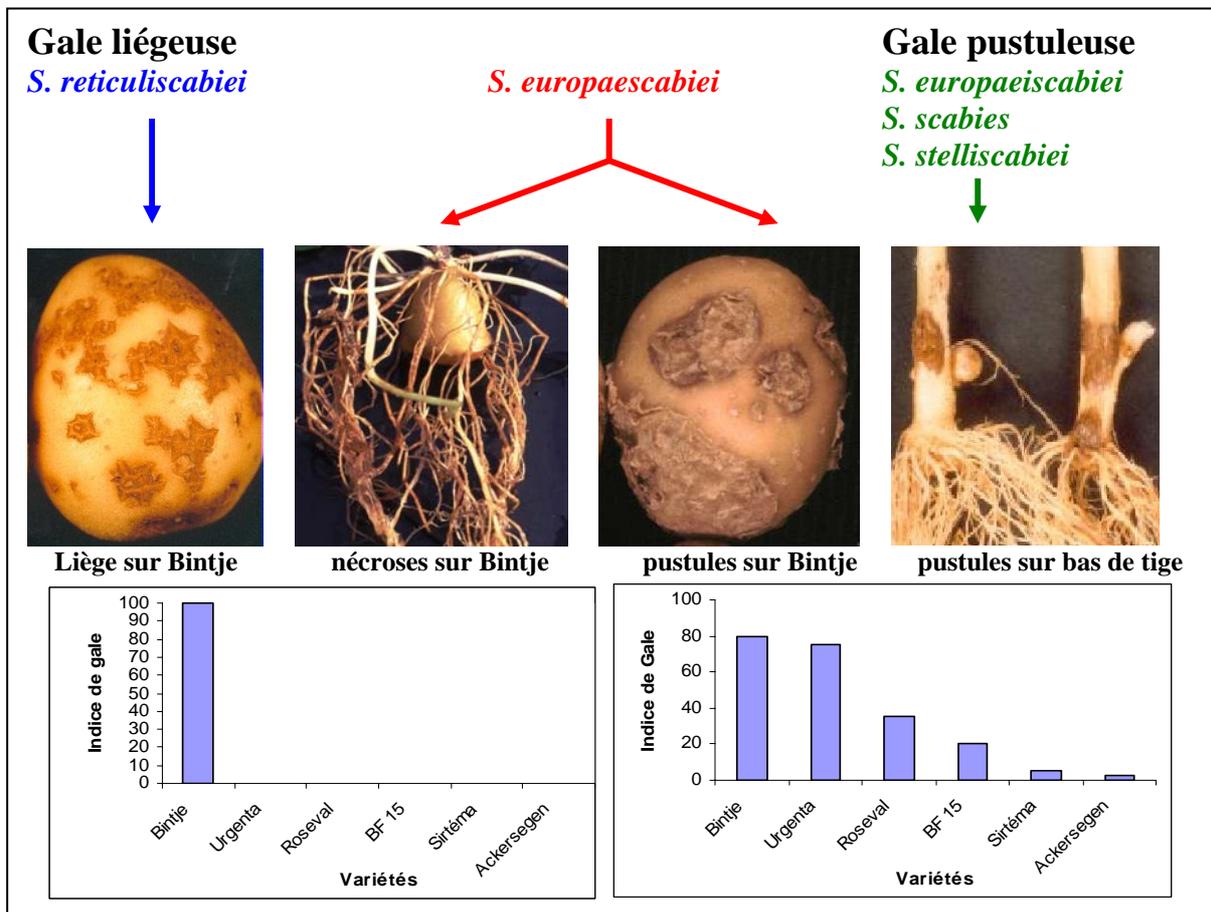
Un indice de gale moyen par pot est ensuite calculé.

Après séchage, le poids des tubercules fils est mesuré pour chaque pot.

1.6.b. les racines : A la récolte, l'ensemble du système racinaire est lavé à l'eau courante. La présence de symptômes sur les racines et les stolons (nécroses marron à brunes dues à *S. reticuliscabiei* responsable de la gale liégeuse) et sur la base des tiges (sortes de pustules dues aux espèces de *Streptomyces* responsables de la gale pustuleuse) est notée sur chaque plante. La notation s'effectue soit en présence/absence, soit par une répartition en classes en fonction de l'étendue des nécroses sur le chevelu racinaire.

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

La figure ci-dessous illustre le comportement de six variétés de pomme de terre vis-à-vis des deux types de gale rencontrés en France. Concernant la gale en pustule, nous observons un gradient de sensibilité ( Bintje et Urgenta sont très sensibles alors que Sirtéma et Ackersegen le sont très peu, Roseval et BF 15 ont un comportement intermédiaire). Pour la gale liégeuse, seule Bintje y est très sensible, les cinq autres variétés sont complètement résistantes.



**Figure 1** : Différentes espèces de *Streptomyces* rencontrées en France et description des types de symptômes qu'elles occasionnent sur une gamme de variétés de pomme de terre et de leur sévérité (indice de gale ou IG).

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette technique d'évaluation en sol contaminé artificiellement par différentes espèces de *Streptomyces* est utilisée depuis plusieurs années (au cours desquelles elle a subi des améliorations) pour évaluer le comportement de variétés et génotypes de pomme de terre en cours d'inscription au catalogue du CTPS. Elle a été transférée aux sélectionneurs qui l'utilisent pour tester leur matériel en cours de sélection. Par ailleurs, elle nous a permis d'obtenir des données d'analyse de la résistance de la descendance de 3 diallèles complets impliquant des variétés sensibles, moyennement résistantes ou fortement résistantes aux deux types de gales. Enfin, elle a servi à caractériser les espèces de *Streptomyces* présentes dans diverses régions Françaises en utilisant une variété sensible au type pustule (Urgenta) et une variété sensible au type liège (Bintje). Cette technique peut être étendue à l'évaluation du comportement d'autres plantes à racines tubérisées comme la carotte, le radis ou la betterave vis-à-vis de la gale commune en pustule. Une méthode de piégeage direct des *Streptomyces* dans les sols naturels a été mise au point à partir de cette technique.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pasco C, Jouan B, Andrivon D (sous presse) Resistance of potato cultivars to common and netted scabs. Plant Pathology.

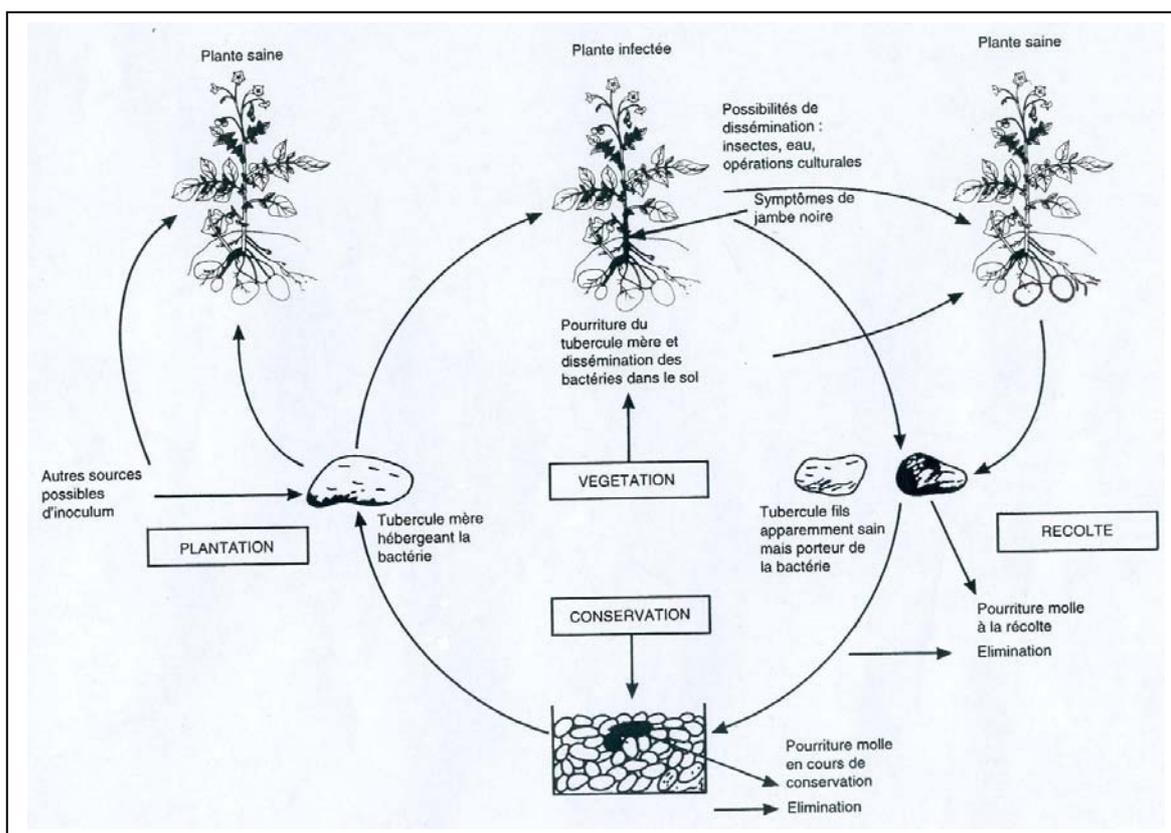
Cetas RC, Jones ED, 1962. New soil fungicides for potato scab and *Rhizoctonia* control. Plant Disease 46 : 601-605.



## COMPORTEMENT VARIÉTAL DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DES POURRITURES MOLLES ET DE LA JAMBE NOIRE : Test au champ et en conditions contrôlées

Claudine Pasco<sup>1</sup>

Les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* provoquent sur pomme de terre des dommages à la fois en végétation (jambe noire) et en conservation (pourritures molles). Le symptôme de **jambe noire** a pour origine la macération du tubercule de semence après levée de la plante. Il est caractérisé par une pourriture brune foncée à noire de la base de la tige. Il est associé ou non à un flétrissement, un enroulement et un jaunissement du feuillage, voire même à un manque à la levée. La pourriture molle se caractérise par une pourriture humide granuleuse de couleur blanche à crème. Des pigments bruns à noirs se développent souvent en périphérie du tissu malade. En conservation, **les pourritures molles** peuvent entraîner la contamination rapide des tubercules avoisinants. Etant donné les pertes importantes que peuvent occasionner ces maladies et en l'absence de lutte chimique, il est important de disposer d'un outil pour évaluer le comportement des variétés vis à vis de ces deux maladies.



**Figure 1 :** Différentes phases de l'infection de la pomme de terre par *Erwinia carotovora atroseptica* (Extrait de Mieux comprendre la pomme de terre Ed. INRA, Novembre 1996).

<sup>1</sup> UMR BiO3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, pasco@rennes.inra.fr

L'apparition et la nature des symptômes dépendent essentiellement de l'environnement (température et humidité du sol). La figure 1 illustre les différentes phases du cycle d'infection. Le tubercule assure pour une bonne part la conservation et la transmission des bactéries. La contamination s'effectue soit par le stolon de la plante mère malade, les bactéries se logent alors au niveau du talon ; soit par le sol en contaminant les lenticelles des tubercules fils. Les tubercules contaminés vont pourrir en conservation ou transmettre la maladie aux plantes filles après plantation, si les conditions environnementales sont satisfaisantes. Le test proposé ici permet d'évaluer le comportement de variétés de pomme de terre vis-à-vis de la jambe noire et des pourritures molles à la fois au champ et en conditions contrôlées.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Matériel

- Tubercules de variétés témoin connues
  - Tubercules à tester 35-45 mm conservés à 10°C
  - Parcelle en périmètre irrigué (sprinkler)
  - Clayettes, piquets + étiquettes (champ)
  - Milieu King B coulé en boîte de Pétri
  - Divers contenants pour la suspension
  - Souche type d'*Erwinia carotovora atroseptica*
  - Enceinte à 20°C munie d'un éclairage
  - Pots (Ø 18 cm), plateaux, (serre)
  - Etiquettes, tuteurs (serre)
  - Produits insecticides pour la serre + pulvérisateur
  - Mélange 1/3 tourbe + 1/3 sable + 1/3 terre, stérilisé en vapeur fluante pendant une heure.
  - Tampon PBS (0,8 % NaCl ; 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,29 % Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O ; 0,02 % KCl ; pH 7,2).
- Spectrophotomètre
  - Anse de platine
  - Sable + sacs plastiques épais
  - Enceinte raccordée au vide\* + seau
  - Sacs en papier (récolte)
  - Solution nutritive (NPK 15/10/15)
  - Etuve à 27°C
  - Produits de traitement pour le champ

**\*Enceinte raccordée au vide** : il s'agit ici d'un ancien autoclave que l'on a raccordé à une pompe à vide. Compte tenu du grand volume de tubercules à inoculer, il faut un grand contenant.

### 1.2. Préparation du matériel végétal

Les tubercules sont lavés soigneusement à l'eau courante, puis triés afin d'éliminer les tubercules atteints de gale commune, de rhizoctone ou autres pourritures apparentes. Ils sont ensuite mis à germer en clayettes pendant 2 à 3 semaines à 20°C dans la pénombre.

### 1.3. Préparation de l'inoculum

Les bactéries sont ensemencées par stries sur milieu King B gélosé\*\*, puis incubées à 27°C pendant 24 heures. La suspension bactérienne est préparée par inondation et grattage de la surface des cultures dans du tampon PBS puis ajustée à  $2 \cdot 10^7$ ,  $2 \cdot 10^8$  et  $2 \cdot 10^9$  bactéries par mL après mesure de la densité optique au

**\*\*Composition type (g/litre)** :  
Peptone de viande 10,0 ; Magnésium sulfate 1,5 ; di-hydrogenophosphate 1,5 ; Agar-agar 12,0. Ou alors utiliser le milieu sous forme déshydratée prêt à l'emploi (réf. MERK 1.10989).

#### Conservation des bactéries :

- soit en tubes de milieu gélosé coulé en pente (0,3 % extrait de levure, 0,5 % peptone, 1,5 % agar) et maintenus à température ambiante.
- soit mises en suspension dans de l'eau stérile diluée au demi avec du glycérol puis conservées à 4°C.

spectrophotomètre (longueur d'onde de 350 nm). La concentration exacte en Colony Forming Units (CFU) est déterminée par comptage visuel des colonies après étalement de séries de dilution sur milieu King B et incubation à 27°C pendant 24 heures.

#### **1.4. Inoculation**

Il existe 2 modes d'inoculation utilisables indifféremment en conditions contrôlées ou au champ : brassage avec du sable ou infiltration sous vide (Hélias *et al.* 2000).

1.4.a. Inoculation par brassage des tubercules : des échantillons de 50 tubercules sont placés dans un sac plastique avec 250 g de sable stérilisé et 1 litre de suspension bactérienne (remplacée par du tampon PBS pour les témoins). Les sacs sont secoués manuellement pendant 5 minutes pour permettre aux tubercules d'être blessés par le sable infecté (micro blessures permettant la pénétration des bactéries). Après brassage, les tubercules sont maintenus dans les sacs pendant 15 min, puis mis à sécher pendant trois à quatre heures à l'air libre avant plantation.

1.4.b. Inoculation par infiltration sous vide : Avant inoculation, les tubercules sont placés toute une nuit à 15-20°C, dans des sacs plastiques fermés contenant 1 litre d'eau stérile. Ce procédé permet aux lenticelles de s'ouvrir et facilite ainsi l'entrée des bactéries. 50 tubercules (ou plus selon la taille des tubercules) sont ensuite placés dans un seau, qui est lui-même situé à l'intérieur d'une enceinte raccordée au vide. Les tubercules sont recouverts de la suspension bactérienne (remplacée par du PBS pour les témoins). Un vide de 1 bar est appliqué pendant 20 minutes. Les tubercules sont ensuite mis à sécher pendant trois à quatre heures à l'air libre.

#### **1.5. Dispositif expérimental et culture des plantes**

##### 1.5.a. Plantation au champ

Les tubercules sont plantés courant Avril suivant un dispositif en Split-plot, avec les doses d'inoculum comme blocs principaux (Témoin non inoculé, Dose 1 et Dose 2) et les variétés comme sous blocs. Chaque parcelle élémentaire est constituée de 2 rangs de 10 tubercules inoculés, séparés par 1 rang de Charlotte (ou autre variété) non inoculée. Chaque variété est représentée par trois parcelles élémentaires dans chaque sous bloc. Une irrigation par sprinkler est appliquée 2 fois par semaine de mi-Mai à mi-Août (mais ajustée suivant la pluviométrie). La quantité d'eau apportée à chaque arrosage est de 12 à 13 litres par m<sup>2</sup>. La culture est menée suivant les conditions habituelles d'une production de pomme de terre de consommation : buttage environ un mois après plantation, désherbages chimiques et traitements anti-mildiou. Un défanage chimique est effectué début Août pour stopper la végétation.

##### 1.5.b. Plantation en enceinte à 20°C

En parallèle, 10 tubercules de chaque modalité sont plantés en enceinte régulée à 20 à 22°C (conditions optimales pour le développement des deux types de symptômes : jambe noire et pourritures molles). En effet, si les conditions de température sont trop élevées au champ, *Eca* ne s'exprimera pas ou peu. Les tubercules sont plantés à raison d'un tubercule par pot dans du mélange terreux, selon le même dispositif qu'au champ (blocs + variétés témoins). Les plantes reçoivent 16 heures de lumière par jour et sont arrosées suivant leur besoin avec de l'eau. Une solution d'engrais (NPK) est apportée tous les 2 arrosages à une concentration finale de 2 g/L. Des traitements insecticides sont effectués si besoin pour lutter contre les aleurodes et les pucerons. En serre, les plantes sont maintenues jusqu'à sénescence.

#### **1.6. Notation des symptômes**

1.6.a. En végétation : en cours de végétation, l'évolution des symptômes (non-levée, chlorose, flétrissement/décoloration, jambe noire et mort) est observée entre mi-Mai et fin Juillet, par une notation sur chaque plante à 4 dates échelonnées. En serre, il est possible de suivre la progression des symptômes de jambe noire en mesurant l'extension des nécroses sur les tiges et d'ouvrir celles-ci en fin de culture afin de noter la présence de jambe noire interne.

1.6.b. Sur les tubercules fils : en Septembre, les tubercules fils sont récoltés pied par pied dans des sacs en papier. Après lavage, ils sont triés pour la présence de pourritures molles puis pesés. Le pourcentage de tubercules pourris est noté ou pour plus de précision, suivant des classes de contamination en fonction de l'étendue de la pourriture observée (0 %, 1-20 %, 21-40 %, 41-60 % de la surface du tubercule pourris...) pour chaque pied.

### 1.7. Interprétation des résultats

Les fréquences de plantes dans les différentes classes de symptômes sont calculées à chaque date de notation, pour chaque cultivar, chaque dose de bactéries et chaque mode d'inoculation. Les fréquences de plantes dans chaque classe de tubercules fils sont calculées, ainsi que la moyenne du nombre de tubercule par plante et le poids moyen des tubercules dans chaque classe. L'effet de la date de notation, du mode d'inoculation et de la concentration d'inoculum est analysé par une analyse statistique (ANOVA). Les pertes de rendement pour chaque classe de symptômes sont calculées par comparaison avec le rendement obtenu avec les plantes témoins non inoculées.

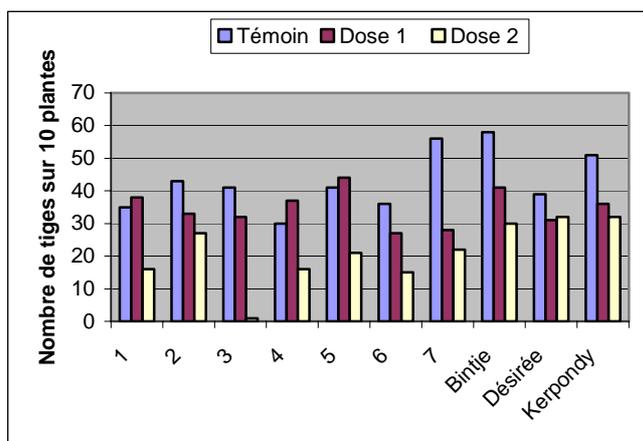
## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Les notations des symptômes plante à plante montrent que la progression de la maladie se traduit par un passage de chlorose et/ou flétrissement à un dessèchement partiel ou total de la plante. Cependant, on observe souvent un rétablissement des plantes dont une partie des tiges avait été précocement attaquée. En fait, les parties mortes disparaissent et de nouvelles tiges apparemment saines se forment mais le rendement de ces plantes reste très souvent faible. Le rendement varie en fonction des types de symptômes et des dates de notations.



*Pourritures molles sur Bintje*

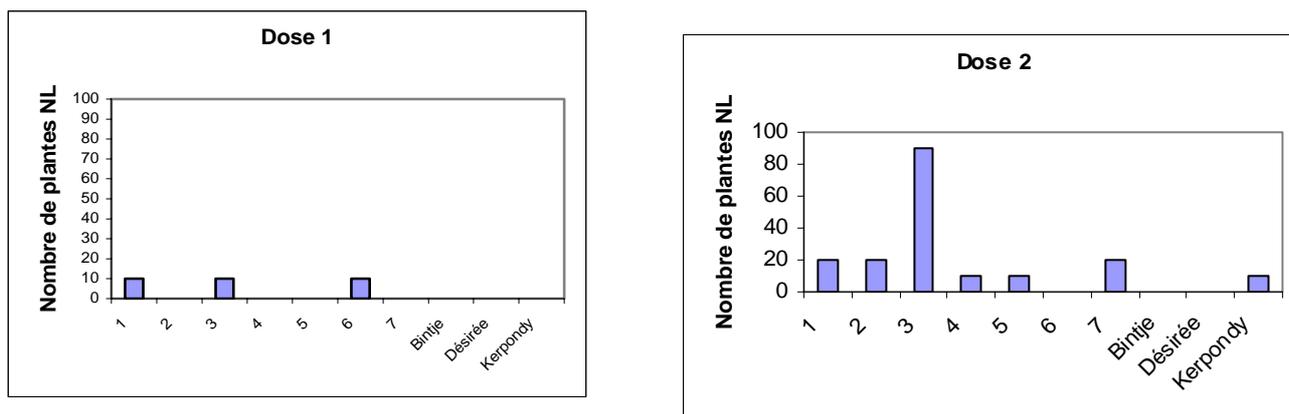
Voici quelques résultats obtenus au champ (figure 2) qui montrent l'effet de l'inoculation sous vide sur le nombre de tiges par plante et le taux de non levée (figure 3) chez trois variétés de pomme de terre témoins et sept génotypes.



**Figure 1 :** Effet de l'inoculation sur le nombre de tiges total de 10 plantes



*Jambe noire sur Bintje obtenu au champ*



**Figure 2 :** Effet de la dose de bactéries sur le nombre de plantes non levées (NL)

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La technique d'inoculation par brassage avec du sable a été utilisée pendant plusieurs années avec et sans apport d'irrigation afin de montrer l'importance des conditions environnementales (température et humidité) dans l'expression de ces deux maladies. La seconde technique a été utilisée pour mieux apprécier les voies de contamination du tubercule mère vers les tubercules fils, mais aussi pour voir s'il y avait une relation entre le type de symptôme observé en végétation et le rendement, en vue de réaliser des études épidémiologiques plus approfondies. Elle a aussi permis d'évaluer sur deux années, le comportement d'une gamme de génotypes dont la sensibilité sur tubercules avait été évaluée par la technique d'inoculation sur tubercule entier (cf autre article).

En conditions favorables à l'expression des symptômes, la première technique d'inoculation s'avère plus sévère que la seconde, car elle blesse les tubercules en surface ainsi que les germes s'ils sont déjà sortis. La seconde correspond davantage à une contamination naturelle car les bactéries se trouvent à l'état latent dans les lenticelles et elle a l'avantage de ne pas blesser les germes déjà formés. Elle est aussi plus facile à mettre en œuvre mais elle demande un équipement spécifique raccordé au vide. D'autre part, en conditions météorologiques sèches peu favorables à la maladie, elle sera sans doute plus efficace que l'inoculation avec le sable. Les bactéries restent alors à l'abri dans les lenticelles.

Ces deux techniques peuvent être transposées aux autres espèces d'*Erwinia* (*Erwinia carotovora carotovora* et *Erwinia chrysanthemi*), mais aussi à d'autres bactéries responsables de pourritures.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hélias V, Andrivon D, Jouan B (2000) Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants. *Plant pathology* 49: 23-32.



## COMPORTEMENT VARIÉTAL DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DES POURRITURES MOLLES : Test sur tubercules en conditions contrôlées

Claudine Pasco<sup>1</sup>

Les pourritures molles de la pomme de terre, dues à *Erwinia carotovora atroseptica* (*Eca*) qui est l'espèce la plus répandue en France, occasionnent d'importantes pertes en conservation. Il

D'autres bactéries du genre *Erwinia* sont aussi associées à ces symptômes : *Erwinia carotovora carotovora* (*Ecc*) et *Erwinia chrysanthemi* (*Ech*).

n'existe pas de lutte chimique et la certification des semences associée à de bonnes pratiques culturales est insuffisante. L'utilisation de variétés résistantes reste donc la seule voie possible. C'est pourquoi il faut disposer d'un outil rapide, miniaturisé et reproductible pour évaluer le comportement des variétés présentes sur le marché, des génotypes en cours d'inscription au catalogue officiel ou

encore des familles et clones issus de programmes de croisements avec des origines génétiques diverses. Le but étant de produire des géniteurs résistants aux *Erwinia*.

Voici deux méthodes d'évaluation qui sont adaptées à des tubercules de calibres différents. Celle sur demi tubercules, plus précise, requiert des tubercules assez gros (calibre 35-45 mm) mais elle a l'inconvénient d'être longue et fastidieuse à mettre en œuvre (surtout au moment de la notation des symptômes). L'autre méthode, sur tubercules entiers, a été développée lorsque nous avons dû évaluer le comportement de familles issues de croisements. Elle s'applique aisément sur des tubercules plus petits (1 à 2 cm de diamètre) et elle permet aussi un gros gain de temps, que ce soit au moment de l'inoculation ou de la notation des symptômes.

### 1. MATERIEL ET METHODE

#### 1.1. Matériel

- Terrines 30 x 30 x 10 cm
- Plateaux 30 x 30 cm
- Papier filtre ou éponge (30 x 30)
- Fiole de Erlenmeyer 100 mL, tubes 20 mL
- Milieu de King B coulé en boîtes de Pétri
- Tubercules à tester conservés à 10°C.
- Gamme de variétés de pomme de terre témoins de sensibilité connue (au minimum cinq).
- Eau distillée stérile ou tampon PBS (0,8 % NaCl ; 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,29 % Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O ; 0,02 % KCl ; pH 7,2) permettant d'éviter l'éclatement des cellules.
- Ethanol 90 %
- Etuve à 27°C
- Spectrophotomètre
- Souche type d'*Eca*
- Agitateur magnétique
- Barreau aimanté
- Enceinte à 20°C sans lumière
- Anse de platine

**Pour la méthode sur demi tubercules :** Combitips 2,5 mL, couteau, emporte pièce (0,5 cm de diamètre), spatule pour retirer les pourritures, burette graduée à remplissage automatique.

**Pour la méthode sur tubercules entiers :** Pipette de précision de 10 µL + cônes stériles adaptés.

<sup>1</sup> UMR BiO3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, pasco@rennes.inra.fr

## 1.2. Préparation du matériel végétal

Les tubercules sont lavés soigneusement à l'eau courante, désinfectés dans l'éthanol (90 %) pendant 5 minutes, puis déposés sur du papier filtre dans des terrines. Le papier filtre peut être remplacé par des carrés d'éponge préalablement stérilisés à l'autoclave.

## 1.3. Préparation de l'inoculum

<p><b>Composition type (g/litre) :</b>                  Peptone de viande 10,0 ; Magnésium sulfate 1,5 ; di-hydrogenophosphate 1,5 ; Agar-agar 12,0. Ou alors utiliser le milieu sous forme déshydratée prêt à l'emploi (référence MERK 1.10989).</p>
---

Les bactéries sont ensemencées par stries avec une anse de platine sur milieu King B gélosé, puis incubées à 27°C pendant 24 heures. La suspension bactérienne est préparée par inondation et grattage de la surface des cultures dans de l'eau

### Conservation des bactéries :

- soit en tubes de milieu gélosé coulé en pente (0,3 % extrait de levure, 0,5 % peptone, 1,5 % agar) et maintenus à température ambiante.
- soit mises en suspension dans de l'eau stérile diluée au demi avec du glycérol puis conservées à 4°C.

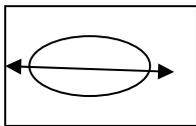
distillée stérile (ou du tampon PBS) puis sa concentration est ajustée à  $2 \cdot 10^7$ ,  $2 \cdot 10^8$  et  $2 \cdot 10^9$  bactéries par mL après mesure de la densité optique au spectrophotomètre (longueur d'onde de 350 nm). La concentration exacte en Colony Forming Units (CFU) est déterminée par comptage visuel des colonies, après étalement de séries de dilutions sur milieu King B et incubation à 27°C pendant 24 heures.

## 1.4. Inoculation et incubation

Pour les deux méthodes, la suspension bactérienne est maintenue sous agitation magnétique pendant toute la durée de l'inoculation. Utilisez un agitateur magnétique qui ne chauffe pas la suspension bactérienne ! Une dizaine de variétés témoin de sensibilité connue à *Eca* est ajoutée au dispositif. Il est préférable que ces variétés témoin aient été produites dans les mêmes conditions que les variétés à tester et qu'elles soient du même âge physiologique.

### 1.4.a. Inoculation sur demi tubercules (Lapwood et al. 1984)

Après avoir coupé longitudinalement les tubercules en deux moitiés égales (en passant par le talon et en respectant la position du tubercule parallèle à la surface de travail), un puits de 0,5 cm de diamètre et de 0,5 cm de profondeur est réalisé au centre de chaque demi tubercule à l'aide d'un emporte-pièce. Veillez à désinfecter régulièrement la lame du couteau et l'emporte pièce à l'alcool à 90 %.



Après une période de cicatrisation de 2 heures à température ambiante, 50 µL de suspension bactérienne sont ajoutés dans chaque puits à l'aide d'un combitip (ce dernier permet de gagner du temps par rapport à l'utilisation d'une pipette traditionnelle, en distribuant un même volume plusieurs fois de suite). 20 demi tubercules par variété et par dose de bactérie sont inoculés. Actionner doucement le combitip afin d'éviter les éclaboussures sur la tranche du tubercule au moment de l'inoculation.

### 1.4.b. Inoculation sur tubercules entiers (Rousselle-bourgeois F., Priou S. 1995)

A l'aide d'une pipette de précision et de cônes stériles, 10 µL de suspension bactérienne sont prélevés. Le cône est ensuite enfoncé directement dans la chair du tubercule sur 1 cm de profondeur (c'est-à-dire jusqu'au niveau de la suspension bactérienne dans le cône) et est laissé en place pendant toute la durée de l'incubation (deux cônes par concentration). Lorsque la taille du tubercule le permet, deux inoculations avec deux doses de bactéries sont réalisées

( $2.10^8$  et  $2.10^9$  bactéries par mL) en plaçant les cônes correspondants à la même dose à la même extrémité du tubercule. Veuillez à bien repérer le positionnement des tubercules dans la terrine ou alors à faire un trait au marqueur sur les cônes de la dose  $2.10^8$  bactéries par mL.

Concernant le matériel végétal à tester, s'il s'agit de familles, chacun des tubercules est inoculé. S'il s'agit de clones, 4 à 8 tubercules par clone sont inoculés.

**Une famille** est constituée d'un ensemble de tubercules génétiquement différents résultant d'un croisement.

**Un clone** est constitué de tubercules génétiquement identiques.

#### 1.4.c. Incubation pour les deux méthodes

Les tubercules inoculés sont déposés sur 4 épaisseurs de papier filtre placées au fond des terrines. Le papier filtre est humidifié uniformément avec 100 mL d'eau distillée stérile et les terrines sont recouvertes avec un plateau afin de maintenir une humidité saturante. L'incubation a lieu dans une enceinte à 20°C pendant 6 jours à l'obscurité.

### 1.5. Système de notation

#### 1.5.a. Méthode sur demi tubercules

Après incubation, les parties nécrosées sont soigneusement éliminées avec une spatule étroite à bout rond. La cavité formée est remplie jusqu'à affleurement avec de l'eau à l'aide de la burette graduée. Ce volume permet de déduire le volume de pourriture en  $\text{cm}^3$  pour chaque demi tubercule. D'autres systèmes de notation peuvent être utilisés comme la pesée de la pourriture ou encore la mesure de la longueur, la largeur et la profondeur de la cavité permettant ensuite de calculer son volume.

#### 1.5.b. Méthode sur tubercules entiers

Après incubation, chaque tubercule est coupé au niveau du site d'inoculation avec un couteau bien affûté afin de mesurer l'étendue de la pourriture formée. Les notations sont effectuées visuellement suivant l'échelle suivante :

**0** : aucune pourriture ou réaction de cicatrisation sèche ;

**1** : légère nécrose humide au point d'inoculation ;

**2** : pourriture étendue à moins de 1 cm ;

**3** : pourriture étendue à plus de 1 cm.

### 1.6. Interprétation des résultats

1.6.a. Méthode sur demi tubercules : La moyenne des volumes de pourritures obtenus pour chaque variété et chaque dose de bactérie est calculée sur les 20 répétitions. Une comparaison des moyennes obtenues est réalisée avec un test statistique ANOVA. Les variétés sont ensuite classées suivant leur sensibilité aux pourritures molles en comparaison avec des variétés témoin connues.

1.6.b. Méthode sur tubercules entiers : Cette méthode a été mise au point pour tester le comportement de familles (petits tubercules) et de clones issus de croisements entre parents

#### **Processus de production des géniteurs**

**Année 1** : Croisement

**Année 2** : Semis

TEST FAMILLE → réponse globale de la famille

**Année 3** : 1<sup>ère</sup> année au champ (4 tubercules)

TEST D'IDENTIFICATION

**Année 4** : 2<sup>nd</sup> année au champ (4 tubercules)

TEST DE CONFIRMATION

**Année 5** : Multiplication (10 tubercules)

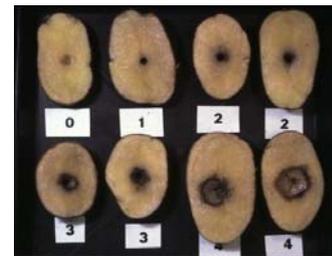
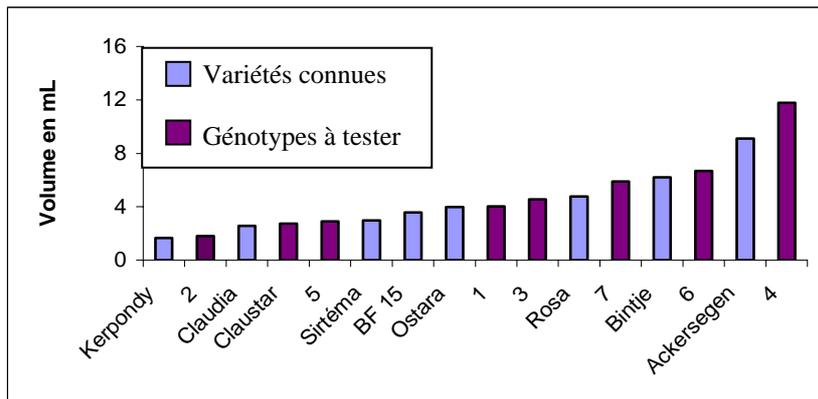
Etude de la valeur agronomique et technologique VAT (25 tubercules)

**Année 6** : Croisements et distribution aux sélectionneurs.

d'origine différente. Ce programme avait pour but la création de géniteurs résistants aux *Erwinia* (collaboration avec l'INRA de Ploudaniel). Quand il s'agit de familles, le pourcentage de tubercules dans chacune des 4 classes de symptômes renseigne sur le comportement global de la famille. Suivant ce résultat, les familles ayant le meilleur comportement sont conservées puis replantées au champ l'année suivante. Les clones issus de ces familles sont évalués à raison de 4 tubercules par clones (test d'identification), ce résultat est ensuite confirmé la troisième année (test de confirmation).

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

### 2.1. Méthode sur demi tubercules

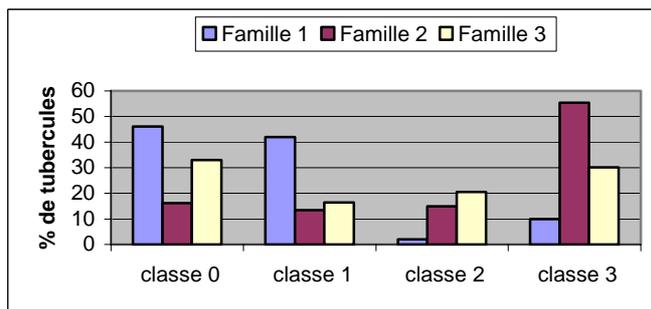


Pourritures molles obtenues avec des doses croissantes de bactéries *Eca* sur Bintje.

**Figure 1 :** Volume moyen des nécroses en mL à  $2.10^9$  bactéries par mL.

La représentation graphique du volume moyen des nécroses en mL permet d'avoir un classement des génotypes par rapport à des variétés connues (la variété Kerpondy est peu sensible alors que la variété Ackersegen est très sensible aux pourritures molles). En utilisant chaque année les mêmes variétés témoin, il est plus facile de conclure quant au classement des génotypes à tester.

### 2.2. Méthode sur tubercules entiers



Inoculation (technique des cônes) et symptômes obtenus avec une famille sensible.

**Figure 2 :** Comportement de trois familles vis-à-vis d'*Erwinia carotovora atroseptica*.

Le graphique ci-dessus représente le pourcentage de tubercules obtenus dans chacune des 4 classes de symptômes avec la dose  $2.10^9$  bactéries par mL. La famille 1 semble très intéressante puisque plus de 80 % des tubercules se situent dans les classes 0 et 1, alors que 70 % des tubercules de la famille 3 se situent dans les classes 2 et 3. La famille 2 a un comportement intermédiaire.

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode sur demi tubercules a été utilisée de 1986 à 1997 pour tester les variétés et génotypes de pomme de terre en cours d'inscription au catalogue officiel du CTPS (Comité Technique Permanent de la Sélection). Elle nous a permis de suivre chaque année l'évolution du comportement des variétés en cours d'inscription au catalogue et de fournir une information importante aux sélectionneurs Français. Elle a l'avantage de fournir des résultats de volume (quantitatifs) mais elle a l'inconvénient d'être assez longue à mettre en œuvre, notamment au moment de la notation des résultats. Cette technique a été transférée aux sélectionneurs qui l'utilisent dans leurs programmes de sélection avec un système de notation simplifié.

La méthode sur tubercules entiers a été utilisée dans le cadre d'un programme de sélection de géniteurs résistants aux *Erwinia* de 1990 à 2003. Plusieurs origines génétiques ont été testées mettant en évidence plusieurs géniteurs résistants aux *Erwinia*, qui ont été distribués aux sélectionneurs français. Cette technique est beaucoup plus rapide que la précédente, que ce soit au moment de l'inoculation ou au moment des notations des résultats. Le résultat en classes est suffisant compte tenu de son utilisation. Elle permet de tester un grand nombre de tubercules en peu de temps. Elle convient donc particulièrement à l'étude du comportement du matériel en cours de sélection car elle permet d'avoir un résultat rapide. En conséquence, les individus sensibles peuvent être éliminés très tôt dans le schéma de sélection.

Une étude menée dans les années 80 a montré une bonne corrélation entre ces deux techniques. Elles peuvent aussi être transposées à d'autres espèces d'*Erwinia*, voire d'autres bactéries responsables de pourritures.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lapwood DH, Read PJ and Spokes J (1984) Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathology* 33 : 13-20.

Rousselle-Bourgeois F, Priou S, (1995) Screening tuber-bearing *Solanum* spp. For resistance to soft rot caused by *Erwinia carotovora* ssp. *Atroseptica* (Van Hall) Dye. *Potato Research* 38: 111-118.



## COMPORTEMENT VARIETAL DE POMME DE TERRE VIS-A-VIS DE LA JAMBE NOIRE - Test sur tiges en conditions contrôlées

Claudine Pasco<sup>1</sup>

Sur pomme de terre, les bactéries pectinolytiques du genre *Erwinia* provoquent des dommages à la fois en conservation (pourritures molles) et en végétation (jambe noire). Sur tige, la maladie se manifeste par des pourritures désignées différemment selon l'origine de contamination. **Le symptôme de jambe noire**, a pour origine la macération du tubercule de semence après levée de la plante. Il est caractérisé par une pourriture brune foncée à noire de la base de la tige, associée ou non à un flétrissement, un enroulement et un jaunissement du feuillage. Ces symptômes résultent de l'invasion de la plante par les *Erwinia* pectinolytiques à partir du tubercule de semence. L'apparition du symptôme typique de pourriture de la tige dépend fortement des conditions climatiques et notamment de l'humidité. Par opposition, la **pourriture aérienne de la tige** n'ayant pas pour origine le point d'attache au tubercule mère, correspond à toutes lésions brunes ou noires de la tige. Elle peut être due à des contaminations par les eaux de pluie ou d'irrigation, le sol, les insectes, ou les opérations culturales. Etant donné que ces symptômes sont très souvent associés à d'importantes pertes de rendement, il est important d'avoir une méthode simple, rapide et miniaturisée pour évaluer la sensibilité des variétés de pomme de terre à ces symptômes. Les deux méthodes présentées ici évaluent la sensibilité des variétés à la pourriture aérienne de la tige.

La macération des tissus découle essentiellement de l'action combinée de quatre pectinases. Ces enzymes vont entraîner la déstructuration de la paroi en dégradant les pectines de la lamelle moyenne.

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Matériel

- Milieu King B<sup>2</sup> coulé en boîtes de Pétri,
  - Souche type d'*Erwinia carotovora atroseptica*
  - Etuve à 27°C
  - Pots jetables 9 x 9 cm, plateaux et tuteurs
  - Enceinte à 20°C munie d'un éclairage
  - Bâche plastique et arceaux
  - Gouge à melon
  - Hormone de bouturage
  - Tubes de 10 mL d'eau stérile
  - Cure-dents stériles
  - Mélange 1/3 tourbe + 1/3 sable + 1/3 terre stérilisé en vapeur fluante pendant 1 heure
  - Tubercules des variétés à tester et variétés témoins de sensibilité connue, conservés à 10°C.
  - Tampon PBS (0,8 % NaCl ; 0,02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,29 % Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O; 0,02 % KCl; pH 7,2).
- Contenants pour la suspension
  - Ethanol à 90 %
  - Anse de platine
  - Spectrophotomètre,
  - Pipette de précision + cônes
  - Agitateur magnétique
  - Barreau aimanté
  - Engrais NPK (15/10/15)
  - Couteau
  - Scalpel

<sup>1</sup> UMR BiO3P, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, pasco@rennes.inra.fr

<sup>2</sup> Composition citée dans l'article précédent.

## 1.2. Préparation du matériel végétal

Les tiges peuvent être produites soit à partir d'œilletons, soit à partir de boutures. Veillez à produire de la même manière les tiges des variétés que vous souhaitez comparer. Il est important aussi d'utiliser des tubercules de même âge physiologique.

1.2.a. tiges issues d'œilletons prélevés sur des tubercules apparemment sains. Pour ce faire, les tubercules des variétés à tester sont mis à germer pendant deux à trois semaines à température ambiante à la pénombre. A l'aide d'une gouge à melon, des œilletons avec un seul germe sont prélevés puis laissés cicatriser à l'air libre pendant 24 heures. Ils sont ensuite plantés dans des pots contenant du mélange terreux.

1.2.b. tiges provenant de boutures préparées à partir de plantes mères produites en serre. Des tronçons de tige sont prélevés à l'aide d'un scalpel, trempés dans l'hormone de bouturage puis plantés dans le mélange terreux préalablement humidifié. Veillez à éliminer l'excès d'hormone de bouturage en tapotant doucement les boutures et à désinfecter régulièrement la lame du scalpel à l'alcool.

Quel que soit le mode de production des tiges, les plantes sont cultivées dans une enceinte à 20°C, avec une photopériode de 16 heures et sont arrosées suivant leurs besoins en eau. Une solution d'engrais est ajoutée une fois par semaine à une concentration finale de 2g/L.

## 1.3. Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum dépend de la méthode d'inoculation choisie : pour la méthode du cure-dents, la culture bactérienne sur milieu King B est utilisée telle quelle alors qu'une suspension bactérienne doit être préparée pour la méthode du cône.

Les bactéries sontensemencées par stries sur milieu King B gélosé, puis incubées à 27°C pendant 24 heures. Si nécessaire, une suspension bactérienne est préparée par grattage de la surface des cultures dans du tampon PBS puis ajustée à  $2.10^7$  et  $2.10^9$  bactéries par mL après mesure de la densité optique au spectrophotomètre (longueur d'onde de 350 nm). La concentration exacte de la suspension en Colony Forming Units (CFU) est déterminée par comptage visuel des colonies après étalement de séries de dilutions sur milieu King B et incubation à 27°C pendant 24 heures.

## 1.4. Inoculation

Les boutures sont inoculées après 20 à 25 jours de culture. Deux méthodes d'inoculation peuvent être utilisées : le cure-dents (Hossain M. and Logan C., 1983) ou le cône (technique développée par nous même). Vingt plantes par variété sont inoculées, auxquelles sont ajoutées des plantes témoins inoculées avec de l'eau et des variétés témoins de sensibilité connue. Deux doses de bactéries peuvent être utilisées dans le cas de l'inoculation avec le cône.

1.4.a. le cure-dents : Après avoir prélevé un peu de bactéries sur le cure-dents stérile en le roulant dans une colonie d'*Eca*, celui-ci est enfoncé directement à l'aisselle de la 3<sup>ème</sup> feuille (sans la traverser) en partant du sommet de la tige, puis laissé en place.

1.4.b. le cône : Après avoir prélevé 50 µL de suspension bactérienne à l'aide d'un cône, l'inoculation se fait de la même manière que pour le cure-dents. Le cône reste en place durant l'incubation et son contenu diffuse dans la tige.

Pour évaluer la quantité de bactéries prélevée sur le cure-dents, une dizaine de cure-dents sont plongés individuellement dans des tubes contenant 10 mL d'eau stérile. Après homogénéisation, la concentration bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre (350 nm). En moyenne, la concentration obtenue sur dix prélèvements est de  $1.10^8$  bactéries par mL, soit  $1.10^9$  bactéries sur le cure-dents.

**Deux autres techniques** ont été testées sans succès : l'une consiste en l'arrosage des racines sur la surface du sol (avec 10 mL de suspension bactérienne) après avoir blessé les racines avec un couteau à raison de 10 blessures par pot. L'autre consiste à couper l'extrémité des racines (après avoir arraché puis lavé les boutures à l'eau courante), puis à les laisser tremper pendant 5 min dans la suspension bactérienne avant de les replanter.

### 1.5. Conditions de culture

Après inoculation, les plantes restent dans l'enceinte à 20°C mais elles sont placées sous une bâche en plastique fermée, maintenue par des arceaux, de façon à créer une humidité saturante. Ne pas laisser les plantes en contact avec la bâche pour éviter l'éclatement des stomates sur les feuilles (boursouflures). Elles sont arrosées comme précédemment.

### 1.6. Notations

Six notations sont réalisées à 4, 7, 11, 18, 22 et 27 jours après inoculation de manière à suivre la progression des symptômes. L'échelle de notation est la suivante :

**0** : aucune réaction,

**1** : nécrose marron de moins de un cm au niveau du site d'inoculation (lésion sèche),

**2** : extension de la nécrose au-delà de plusieurs cm à partir du site d'inoculation, nécrose humide marron clair à noire, flétrissement de quelques feuilles.

**3** : pourriture étendue au-delà de plusieurs cm à partir du site d'inoculation, flétrissement et chlorose des feuilles.

**4** : extension de la nécrose à toute la tige, plante entièrement flétrie, voire morte.

Lors de la dernière notation, il est possible de couper la tige sur toute la longueur avec un couteau pour déceler la présence d'éventuels symptômes internes.

### 1.7. Interprétation des résultats

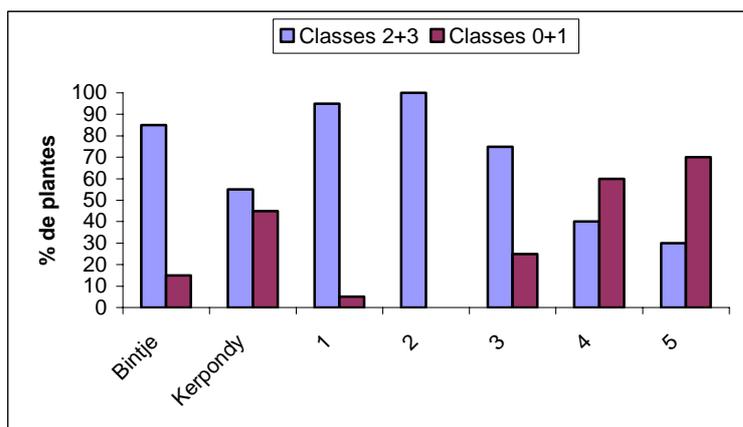
Les fréquences de plantes dans les différentes classes de symptômes sont calculées à chaque date de notation, pour chaque cultivar, chaque dose de bactéries et chaque mode d'inoculation (s'il y a lieu). L'effet de la date de notation, du mode d'inoculation et de la concentration d'inoculum est calculé par une analyse statistique ANOVA. Le comportement des variétés à tester est déterminé sur la base d'une comparaison de moyennes avec les variétés témoins de sensibilité connue.

## 2. RESULTATS ET INTERPRETATION

Avec la technique du cône, les premiers symptômes apparaissent très tôt (quelques jours après inoculation) et évoluent rapidement au fur et à mesure des notations. Avec la technique du cure-dents, les premiers symptômes apparaissent légèrement plus tard et on assiste parfois, de façon aléatoire, à une cicatrisation au niveau du site d'inoculation sur certaines plantes.

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus avec la technique du cône appliquée sur deux variétés témoin (Bintje sensible et Kerpondy peu sensible à la jambe noire) et cinq génotypes à tester. Le graphique représente le pourcentage de plantes obtenues dans les classes 0+1 et 2+3.

Bintje qui est une variété sensible à la jambe noire présente plus de 85 % de plantes dans les classes les plus contaminées alors que Kerpondy qui est une variété peu sensible n'en présente que 55 %. Les génotypes 1 et 2 s'avèrent encore plus sensibles que Bintje, alors que les génotypes 4 et 5 apparaissent moins sensibles que Kerpondy.



**Figure 1 :** Pourcentage de plantes obtenues dans les classes 0+1 et 2+3, après inoculation avec le cône de deux variétés témoin (Bintje sensible et Kerpondy peu sensible) et cinq génotypes à tester.



Inoculation sur Bintje avec la technique du cône

### 3. CONCLUSION

Il n'existe pas actuellement sur le marché de variétés résistantes à la jambe noire mais seulement des différences de sensibilité entre variétés. Plusieurs auteurs ont montré qu'il n'y avait pas systématiquement de corrélation entre la sensibilité sur tiges et sur tubercules. Ils suggèrent donc que les mécanismes qui contrôlent la résistance des tubercules sont différents de ceux qui contrôlent la résistance des parties aériennes de la plante.

Les deux techniques présentées dans cet article sont très intéressantes car elles sont faciles à mettre en oeuvre et permettent en quelques mois d'avoir une idée de la sensibilité de variétés de pommes de terre à la jambe noire. De plus, elles peuvent être réalisées en contre saison (durant l'hiver), ce qui permet un gain de temps non négligeable.

Ces deux techniques ont été utilisées pour tester le comportement d'espèces apparentées dans le but de créer des géniteurs résistants à la jambe noire mais aussi dans le cadre d'un programme visant à mettre en évidence une éventuelle relation entre la sensibilité sur tubercules (pourritures molles) et la sensibilité sur tige (jambes noires). Elles peuvent aussi être utilisées pour évaluer le comportement de variétés ou génotypes en cours d'inscription au catalogue officiel du Comité Technique Permanent pour la Sélection (CTPS) ou plus en amont dans un programme de création variétale.

Ces méthodes peuvent également être transposées aux autres espèces de bactéries du genre *Erwinia*, voire même à d'autres bactéries responsables de symptômes sur pommes de terre.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hossain M and Logan C (1983) A comparison of inoculation methods for determining potato cultivar reaction to blackleg. *Ann Appl Biol* 103 : 63-70.

## EVALUATION DE RESISTANCES PARTIELLES DU POIVRON A *Ralstonia solanacearum*

Denis Lafortune<sup>1</sup>

Chez le poivron, une introduction PM 687 (USDA PI 233719 accession) montre une résistance stable au flétrissement bactérien dans diverses localités et a servi de géniteur pour des programmes d'amélioration. Des croisements ont été réalisés entre ce parent à petits fruits et 'Yolo Wonder', un géniteur à fruits plus gonflés, sensible au flétrissement et résistant à d'autres bioagresseurs tropicaux tels que Nématodes à galles, *Phytophthora capsici*, oïdium et tarsonèmes. Le test décrit ici vise à évaluer au champ la descendance obtenue en terme de résistance au flétrissement, et à conduire l'analyse génétique des résistances observées.



**Photo 1 :** Incidence naturelle du *Ralstonia* sur géotypes de poivrons sensibles

### 1. MATERIEL ET METHODES

Une descendance d'haploïdes doublés (HD) a été obtenue à partir de la F1 entre PM 687 et une lignée de piment à gros fruit 'Yolo Wonder' en provenance de l'Université de Californie (USA). Les haploïdes doublés, les deux parents et la F1 ont été semés en terrines de terreau désinfecté à la vapeur. L'élevage des plants a été conduit sous serre tunnel. Quinze jours après, les plants ont été repiqués sur plaque de 54 alvéoles de 63 cm<sup>3</sup> pour élevage jusqu'à plantation.

---

<sup>1</sup> INRA URPV, Centre Antilles Guyane, Domaine Duclos, 97170 Petit-Bourg

A quarante jours, soit un à 2 jours avant plantation, chaque plant a reçu une pré inoculation pour synchroniser l'infection primaire et ainsi éviter les hétérogénéités d'inoculum.

La souche de *Ralstonia solanacearum* utilisée a été isolée sur poivron dans les parcelles de l'unité expérimentale de Duclos en Guadeloupe. Elle appartient au biovar 1, race 1 en accord avec la nomenclature de Hayward (1964) et au pathotype II.

Dans chaque alvéole, on a injecté 2 ml d'une suspension bactérienne de *R. solanacearum* à concentration  $10^7$  à  $10^8$  bactéries/ml (Thaveechai and Kositratana, 1999). Les plants ont ensuite été mis en place sur un terrain recevant régulièrement des Solanacées afin de conserver un taux élevé d'inoculum en *R. solanacearum* (Granada and Sequeira, 1983). En plus des parents et de la F1, 81 lignées HD ont été plantées en 1999 et 82 en 2001.

### 1.1. Le dispositif

Le dispositif est un essai bloc randomisé. Cinq répétitions (blocs) de parcelles élémentaires de 10 plantes ont été réalisées, avec un écartement de 0,3 m entre plantes et un interligne de 0,9 m ; chaque bloc comportait une parcelle élémentaire de chaque parent et de la F1, et 81 (en 1999) ou 82 (en 2001) parcelles élémentaires d'haploïdes doublés. L'essai est entouré par des lignes de bordure.

### 1.2. Observations

Chaque semaine après plantation (SAP), pendant 20 semaines, nous avons observé les symptômes de tous les plants et établi le nombre de plantes non flétries. Les données ont été recueillies de manière linéaire avec un appareil de saisie portable et les fichiers ont ensuite été transférés sur un micro-ordinateur.

### 1.3. Traitement des données

L'incidence globale annuelle a été calculée chaque semaine à partir des 4250 plants de chaque essai, pour l'ensemble des géotypes. Dans ce cas, nous avons utilisé l'abaque de la loi binomiale pour le calcul de l'intervalle de confiance à 95%.

Les incidences (pourcentages de plants malades) ont été calculées chaque semaine pour chaque géotype, sur 50 plants (5 répétitions de 10 plants), ce qui a permis de tracer les courbes de progression de la maladie correspondantes. L'aire sous la courbe des symptômes (Area Under Symptom Progression Curve : AUSPC) a été calculée pour chaque parcelle élémentaire et une analyse de variance conduite sur ce paramètre afin d'évaluer les effets géotype et bloc pour chaque année, ainsi que pour comparer les deux années.

### 1.4. Analyse génétique

Nous avons analysé des moyennes et variances des lignées HD. P1 et P2 sont les parents, F1 la première génération issue de leur croisement et les descendances haploïdes doubles notées par un numéro pour les HD produites à Avignon (France) ou notées MI plus un numéro pour les HD produites à Milan (Italie).

## 2. RESULTATS

Les courbes d'incidence de la maladie dans le temps pour les deux années d'expérimentation sont présentées en figure 1. Les symptômes de flétrissement sont apparus entre la 3<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine après plantation pour quelques plantes chez les parents sensibles et la progression a été suivie jusqu'à la 20<sup>ème</sup> semaine.

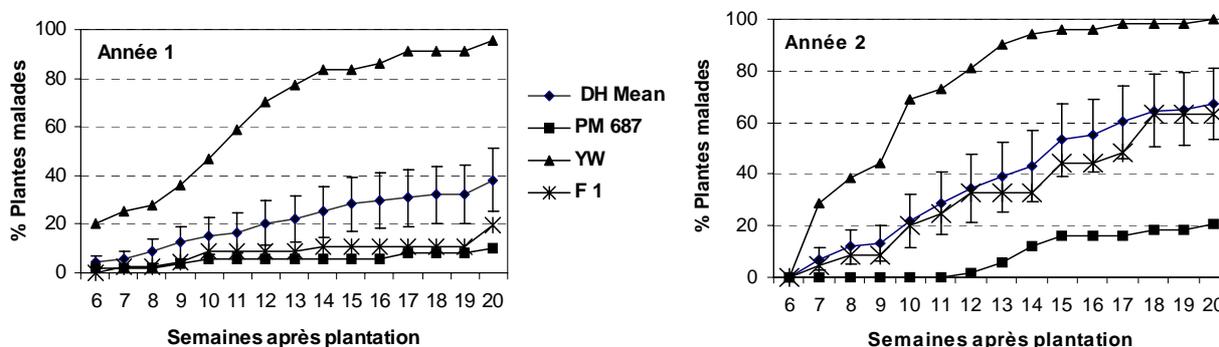


**Photo 2 :** Progression de la bactérie *Ralstonia blots* au cœur du plant de poivron

En année 1, l'incidence de la F1 reste faible et proche de celle du parent résistant pendant les 20 semaines, le parent sensible marque une progression allant jusqu'à 95 % et la moyenne de HD reste intermédiaire jusqu'à 40 % en fin de cycle.

En année 2, avec des conditions d'expérimentation identiques, on note une progression globale plus rapide et une incidence finale plus élevée jusqu'à 100% pour le sensible, 20% pour le résistant et 60% pour les HD. La F1 se comporte comme la moyenne des HD.

L'analyse de la variance de l'AUSPC montre un effet année significatif et une interaction année-génotype significatif ce qui conduit à analyser les deux années séparément. L'égalité des variances a été vérifiée. L'analyse des variances pour les années 1 et 2 montre que les sources de variation des génotypes et des blocs sont toutes deux significatives. La répartition de l'infection dans les champs n'est pas uniforme malgré l'inoculation artificielle avant plantation.



**Figure 1 :** évolution de l'incidence du flétrissement bactérien sur des populations en ségrégation (HD : moyenne et écart-type sur les 81 et 82 haploïdes doublés) obtenues à partir de la F1 du croisement d'un parent sensible (Yolo Wonder) et d'un parent résistant (PM 687)

### 3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette méthode de phénotypage au champ permet de discriminer le niveau de résistance des parents, de la F1 et de la population en ségrégation issue du croisement sensible par résistant et de les classer.

Des méthodes statistiques non développées ici ont permis de calculer l'héritabilité des caractères et le nombre de gènes intervenant dans le contrôle des résistances.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Granada GA, Sequeira L (1983). Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29(4): 433-440
- Thaveechai N., Kositratana W (1999). *Ralstonia solanacearum* resistance reaction of pepper and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in plant. The 37th Kasetsart University Annual Conference, (290-294), 3-5 February (1999). Text and Journal Publication Co Ltd.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277
- Snape JW, Wright AJ, Simpson E (1984). Methods for estimating the gene numbers for quantitative characters using doubled haploid lines. *Theor. Appl. Genet.* 67:143-148