

## 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).

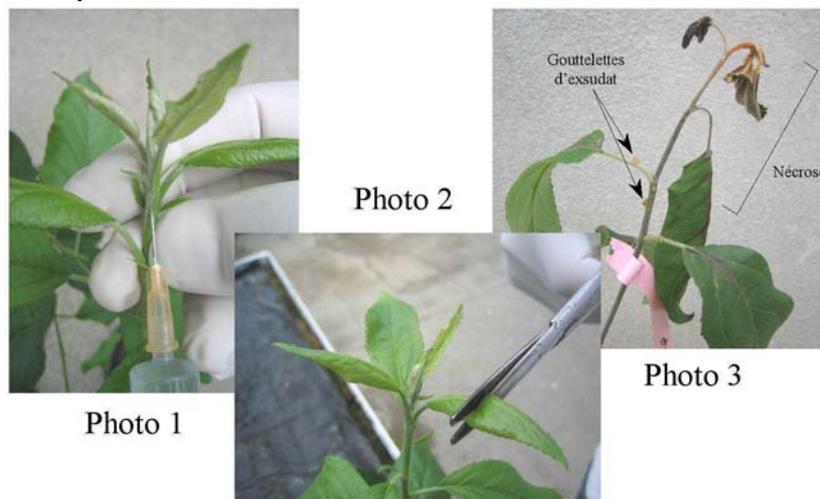
### 1.3.b. *En serre*

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 µl 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 géotypes 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. Très résistant</b>
<b>Harrow Sweet</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>1. Très résistant</b>
<b>Conférence</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>1. Très résistant</b>
<b>Elliot</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>23</b>	<b>2. Résistant</b>
<b>Rogue Red</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>2. Résistant</b>
<b>Lombacad</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>45</b>	<b>3. Intermédiaire</b>
<b>Hartman</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>47</b>	<b>3. Intermédiaire</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. Très sensible</b>
<b>D. du Comice</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>5. Très 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*. *Phytopoma – La défense des végétaux*, 521, 62 – 64.