

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

Claudine Pasco¹

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 % KH₂PO₄ ; 0,29 % Na₂PO₄, 12 H₂O ; 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.

¹ 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

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 (référence MERK 1.10989).
--

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.

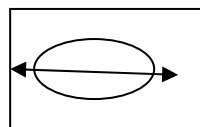
distillée stérile (ou du tampon PBS) puis sa concentration est ajustée à 2.10^7 , 2.10^8 et 2.10^9 bactéries par mL après mesure de la densité optique au spectrophotomètre (longueur d'onde de 350 nm). La concentration exacte en Colony Forming Units (CFU) est déterminée par comptage visuel des colonies, 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 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^{ère} année au champ (4 tubercules)

TEST D'IDENTIFICATION

Année 4 : 2nd année au champ (4 tubercules)

TEST DE CONFIRMATION

Année 5 : Multiplication (10 tubercules)

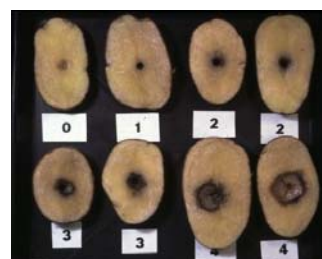
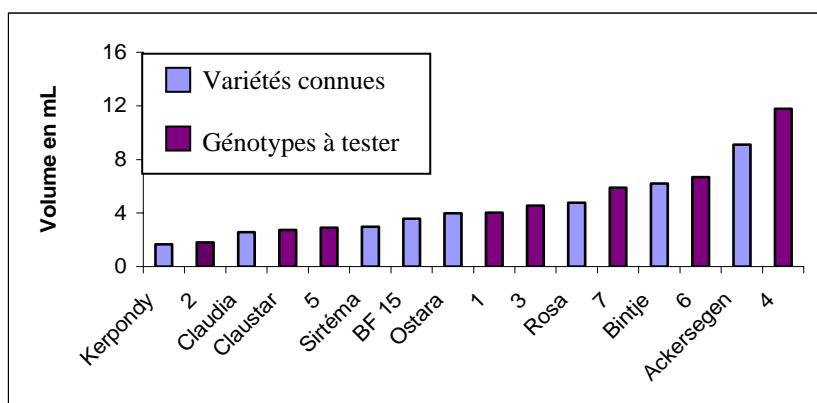
Etude de la valeur agronomique et technologique VAT (25 tubercules)

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

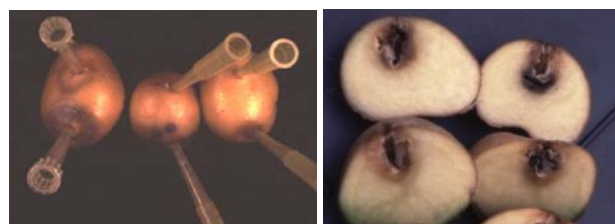
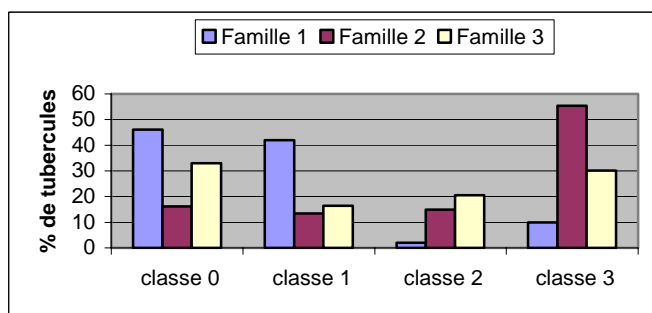


Pourritures molles obtenues avec des doses croissantes de bactéries *Eca* sur Bintje.

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.