

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

Claudine Pasco¹

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. Étant 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 B² 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 % KH₂PO₄ ; 0,29 % Na₂PO₄, 12 H₂O ; 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

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

² 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. À 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^{ème} 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 (boursouffures). 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.

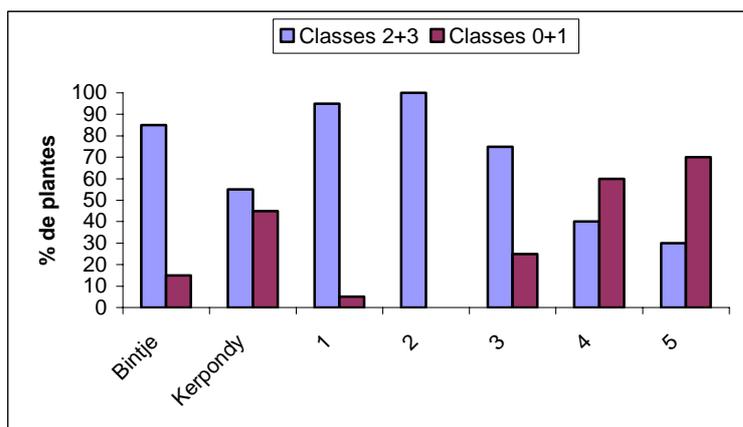


Figure 1 : Pourcentage de plantes obtenues dans les classes 0+1 et 2+3, après inoculation avec le cône de deux variétés témoin (*Bintje* sensible et *Kerpondy* peu sensible) et cinq génotypes à tester.



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.

