

# Induction de la résistance au flétrissement bactérien dû à *Pseudomonas solanacearum* E F Smith chez un cultivar de tomate réputé sensible

P Prior, M Bérarnis

INRA, station de pathologie végétale, de phytoécologie et de malherbologie, BP 1232, 97184, Pointe-à-Pitre Cedex, France

(Reçu le 22 novembre 1989; accepté le 27 février 1990)

**Résumé** — *Pseudomonas solanacearum* est apporté à un sol amendé (750 unités N ha<sup>-1</sup>) avec de l'urée ou de la matière organique (farine de soja, boues de station d'épuration). Le flétrissement d'un cultivar de tomate très sensible (Floradel) est noté au cours de 3 cultures successives. On constate que la mortalité due à *P solanacearum* augmente régulièrement (14, 24 et 43%) dans le sol témoin non amendé, alors qu'elle est stable après traitement à l'urée (22, 15 et 26%) et nulle dès la 2<sup>e</sup> culture après l'apport des amendements organiques. Cette résistance induite n'est pas liée à une mauvaise survie de *P solanacearum* dans le sol, ni à une perte durable de son pouvoir pathogène. Cette tolérance à *P solanacearum* se traduit par la nécrose des vaisseaux colonisés du xylème. L'évolution quantitative des microflore telluriques et des groupements fonctionnels du cycle de l'azote varie peu d'un traitement à l'autre. Elle ne semble donc pas directement associée à la résistance observée. Les mécanismes de tolérance au *P solanacearum* sont discutés en comparant la résistance au flétrissement induite (réponse nécrotique), avec celle, intrinsèque (réponse systémique), des tomates sélectionnées pour ce caractère.

***Pseudomonas solanacearum* / tomate / résistance induite / réaction hypersensible / amendement organique**

**Summary** — Bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* EF Smith) induced resistance in a well known susceptible tomato cultivar. A ferrallitic soil (table II) was contaminated with *Pseudomonas solanacearum* and amended (750 Units N ha<sup>-1</sup>) with urea or organic matter (soya flour, sewage sludges). Three successive tomato crops of a highly susceptible cultivar (Floradel) were observed for bacterial wilt. Mortality due to bacterial wilt regularly increased (14, 24 and 43%) in reference soil, and remained stable in soil amended with urea (22, 15 and 26%) (table IV). When the soil was amended with organic matter, and particularly with sewage sludges (table I), no plant died from the 2nd crop. Induced resistance was not accompanied by rapid decline of *P solanacearum* in soil (table V), nor by lasting breakdown of its pathogenicity. Tolerance to *P solanacearum* present in stem vessels resulted into necrotization. No significant differences could be observed between treatments with regard to quantitative development of soil-born microflora (figs 1 and 2) and micro-organisms involved in the nitrogen cycle (fig 3). These populations may not be directly associated with induced resistance. Bacterial wilt induced resistance (necrotizing response) is compared to intrinsic resistance (systemic response) of improved tomatoes, in order to explain *P solanacearum* tolerance mechanisms.

***Pseudomonas solanacearum* / tomato / induced resistance / hypersensitive reaction / organic improvement**

## INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien dû à *Pseudomonas solanacearum* est une maladie vasculaire d'origine tellurique qui sévit dans la plupart des pays tropicaux et subtropicaux (Kelman, 1953). *P solanacearum* admet un très large spectre d'hôtes et peut provoquer des dégâts considérables, notamment sur les Solanées maraîchères. Comme pour les autres bactérioses vasculaires, la lutte chimique est inopérante et l'incorporation de bio-

cides dans le sol (Overman et Jones, 1977; El-Goorani *et al*, 1978; Enfinger *et al*, 1979) semble être une technique mal adaptée car onéreuse, peu efficace et accompagnée d'effets non intentionnels importants sur la biocénose du sol.

Un moyen d'intervention efficace consiste à sélectionner et à cultiver des variétés résistantes au flétrissement bactérien (Messiaen, 1981; Buddenhagen, 1986). Cependant les propriétés de résistance des variétés peuvent varier localement et dans le temps (Krausz et Thurston,

1975; Mew et Ho, 1977; Desnoyes, 1988). Il convient donc de préserver et-ou de renforcer ces qualités par des pratiques culturales raisonnées (Messiaen, 1989a).

Parmi celles-ci, la nutrition azotée de la plante est essentielle, car elle conditionne fortement la résistance ou la sensibilité aux agressions parasitaires (Good et Carter, 1965; Maynard *et al*, 1966; Dommergues et Mangenot, 1970; Huber et Watson, 1974). Une lutte de type agronomique est appliquée dans de nombreux pays (Lee *et al*, 1984; Hoitink et Fahy, 1986; Lizuka *et al*, 1988; Messiaen, 1989b). Les expérimentations menées en Guadeloupe (Clairon, 1984; Clairon *et al*, 1989) ont montré que l'apport de fortes doses d'azote dans le sol (750 unités ha<sup>-1</sup>), sous forme d'urée ou d'amendements organiques, était susceptible de diminuer, voire d'empêcher, la manifestation de *P solanacearum*. En référence à ces travaux, nous avons cherché à préciser l'origine de ce phénomène. Différents traitements azotés ont été appliqués au sol. La survie de *P solanacearum* a été contrôlée, ainsi que la microflore d'accompagnement sujette à variations lors d'amendements de ce type (Chandra *et al*, 1981; Rattink, 1983; Singh *et al*, 1983; Prakash *et al*, 1985). Le but de ce travail est de contribuer à améliorer nos connaissances sur les mécanismes de résistance au flétrissement bactérien chez la tomate.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Obtention de souches bactériennes marquées

Le suivi de la population de *P solanacearum* introduite dans le sol a nécessité l'utilisation d'une souche possédant un marqueur épidémiologique puissant, constitué par une double résistance à l'acide nalidixique (Nal) et à la rifampicine (Rif).

La souche parentale GT4 (Race 1, biovar III) a été isolée à partir d'un plant de tomate flétri (Prior et Steva, 1990; Prior *et al*, 1989a). Les colonies muqueuses, virulentes, ont été purifiées sur le milieu de Kelman avec du chlorure de tétrazolium (TTC) (Kelman, 1954) complémenté de 1 g d'extrait de levure (milieu KY+). Les mutants sont obtenus par cultures successives sur le même milieu complémenté en Nal (100 µg.ml<sup>-1</sup>), puis en Rif (100 µg.ml<sup>-1</sup>), et ensemencé en nappes denses. Seules les colonies présentant à chaque étape une morphologie et une vitesse de croissance proches de GT4 sont retenues. Deux répétitions ont été effectuées aboutissant à la sélection de 2 mutants Nal-Rif résistants (GT4-RN1 et GT4-RN2).

Le pouvoir pathogène de ces souches a été contrôlé sur 18 plants de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) par scarification du système racinaire et dépôt de 2 ml d'une suspension aqueuse titrant 2 x 10<sup>7</sup> colonies formant unité (CFU) par ml. Les essais sont conduits en chambre climatique. La souche GT4-RN2 a été retenue pour son pouvoir pathogène analogue à celui de la souche sauvage. La stabilité de son type morphologique a été contrôlée par isolement à partir des plants flétris, sur le milieu KY+ Nal-Rif.

### Préparation et incorporation de l'inoculum

Les souches GT4 et GT4-RN2 sont cultivées 48 h à 28 °C sur le milieu KY sans TTC. Vingt-cinq boîtes de Petri sont ensemencées par souche. Les cultures sont récupérées dans de l'eau distillée stérile (EDS) et la quantité de bactéries est déterminée par spectrophotométrie (0,01 de densité optique à 650 nm correspond à 10<sup>7</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>). L'absence de variants avirulents est contrôlée sur KY+. Pour chaque traitement du sol, on apporte séparément les 2 souches de *P solanacearum* à 27 kg de sol à la concentration de 5 x 10<sup>6</sup> CFU.g<sup>-1</sup> de sol masse sèche (MS), ce qui est proche de la concentration de la flore bactérienne en place (2,1 x 10<sup>7</sup> CFU.g<sup>-1</sup> de MS). Le volume des suspensions est de 200 ml.

Le dénombrement de GT4-RN2 dans le sol est réalisé à partir de 40 g de sol masse humide (MH) par la technique classique des suspensions-dilutions dans EDS et comptage sur le milieu KY+ Nal-Rif en boîtes de Petri. La sélectivité de ce milieu est renforcée en y apportant 150 µg.ml<sup>-1</sup> de cycloheximide (Actidione) et 100 µg.ml<sup>-1</sup> de Benlate.

### Préparation du sol et apports des amendements

Pour l'apport d'azote, 1 forme minérale et 2 formes organiques ont été choisies. La forme minérale est l'urée (CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O; 46,65%). Les matières organiques sont la farine de soja (4,5% de N total Kjeldahl) et des boues (5,1% de N total Kjeldahl) de la station d'épuration de Pointe-à-Pitre. Les caractéristiques générales des boues sont consignées dans le tableau I. Elles sont utilisées finement broyées, telles quelles ou après avoir été stérilisées à l'autoclave (3 passages de 20 min à 115 °C), ceci afin d'évaluer l'incidence de la flore apportée par ces boues dans le sol.

Les amendements sont calculés sur la base de 700 kg/ha de N pour l'urée, et de 1 400 kg/ha de N pour les matières organiques, dont seule la moitié de l'azote est directement utilisable. Nous avons tablé sur l'équivalent au champ d'un enfouissement sur 20 cm, soit sur 2 000 t de terre.

Le sol ferrallitique est prélevé à Fondor (commune de Petit-Bourg) sur le domaine expérimental de l'INRA. Ses caractéristiques sont consignées dans le

**Tableau I.** Principales caractéristiques des boues de station d'épuration utilisées pour les amendements. <sup>1</sup> Analyses réalisées par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe; <sup>2</sup> Exprimée en % de matière sèche. Analyses fournies par la station d'agronomie du CRAAG.

<i>Flore bactérienne</i> <sup>1</sup>	
<i>Présente</i>	<i>Absente</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Shigella</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S epidermidis</i>	
<i>Micococcus</i>	
<i>Bacillus</i> du groupe 1	
<i>Clostridium</i> sulfito-réducteur	

<i>Composition minérale</i> <sup>2</sup>	
C	35
N	5,1
C/N	6,88
K	0,2
Ca	9,4
Mg	0,66

tableau II. Seul l'horizon A est prélevé (1 100 kg). Il est tamisé à 10 mm, chaulé à équivalent de 1 t/ha de CaO, homogénéisé, puis réparti en 10 lots de 110 kg de MH (18 pots). Ces lots correspondent à 10 traitements : 4 amendements azotés et le témoin, contaminés ou non avec *P solanacearum*.

**Tableau II.** Principales caractéristiques physicochimiques du sol ferrallitique de Guadeloupe. Comparaison de la microflore présente dans le sol et dans les boues de station d'épuration. <sup>(1)</sup> W(%) : taux d'humidité pondérale au moment de l'analyse; Bact : flore bactérienne; Chp : flore fongique; Act : actinomycètes; Ammo : ammonificateurs; Nitx : ferments nitreux; Nitq : ferments nitriques; Dénit : dénitrificateurs; Protéo : protéolytiques; \* : non décelable; ND : non déterminé. Ces résultats sont exprimés en nombre de germes par gramme de matière sèche. <sup>(2)</sup> Capacité d'échanges en cations.

<i>Caractéristiques du sol</i>		<i>Microflore</i> <sup>(1)</sup>	
		<i>Sol</i>	<i>Boues sèches</i>
Situé en Basse-Terre	W(%)	37	18,5
Pluviométrie : 1 700 à 4 500 mm	Bact	2,1.10 <sup>7</sup>	3,7.10 <sup>9</sup>
Quantité d'argiles : 80-90%	Chp	1,3.10 <sup>6</sup>	2,8.10 <sup>7</sup>
Types d'argile : 1:1	Act	3,2.10 <sup>7</sup>	9,7.10 <sup>7</sup>
CEC <sup>(2)</sup> : 5-10 meq/100 g	Ammo	1,2.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>
Surface développée : 10 m <sup>2</sup> /g	Nitx	traces	8.10 <sup>2</sup>
Non saturé en base	Nitq	*	*
pH 5 à 5,5	Dénit	4 .10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>7</sup>
2,7% de matière organique	Protéo	4,6.10 <sup>4</sup>	ND

L'humidité pondérale du sol, W(%) =  $[MH - MS] / MS \times 100$ , est déterminée par séchage à l'étuve ventilée (105 °C) jusqu'à poids constant. Le mélange du sol avec les apports azotés et l'inoculum est réalisé à la bétonnière (20 min d'agitation en alternant le sens de rotation toutes les 5 min). La quantité de sol contaminée par souche et par traitement est de 27 kg de MH, soit 20 kg de MS (W = 37%) ou 9 pots.

### **Analyses microbiologiques**

Les principaux microorganismes de la microflore du sol – bactéries, actinomycètes, champignons –, et les groupements fonctionnels du cycle de l'azote – ammonifiants, ferments nitreux et nitriques, dénitrifiants, protéolytiques – ont été dénombrés. Les analyses sont effectuées en début d'expérimentation, puis tous les 15 j (10 analyses successives).

Pour chaque traitement, la terre est échantillonnée en grappe dans les 18 pots en prélevant 20 g de MH de sol par pot. Après homogénéisation, 100 g sont utilisés pour déterminer les taux d'hydratation et une fraction équivalente est destinée à l'analyse microbiologique. La quantité de germes par unité de poids de sol (MH) est appréciée par la méthode du nombre le plus probable selon les techniques décrites par Pochon et Tardieux (1962). Les milieux LPGA de Martin (1950) et de Lingappa et Lockwood (1962) ont été utilisés respectivement pour les dénombrements sélectifs des bactéries, des champignons et des actinomycètes du sol.

### **Matériel végétal et notations**

Trois cycles culturaux sont mis en place. La variété de tomate Floradel a été choisie pour sa sensibilité au

flétrissement bactérien. Les semis sont réalisés dans du terreau désinfecté à la vapeur et les plantes sont élevées en chambre climatique ( $28 \pm 3$  °C, 75-100% HR, 8 000 lx, photopériode de 12 h) pour être utilisées au stade 3-4 feuilles, soit 20-25 cm de hauteur. Trois plantes par pot sont repiquées 12 j après le traitement du sol. Les cultures sont conduites pendant 7 semaines sous abri à l'épreuve des insectes. Les plants sont observés régulièrement et la mortalité due à *P solanacearum* est notée en fin de culture. Les plantes survivantes sont alors récupérées, le sol est à nouveau homogénéisé et redistribué dans les pots pour chaque traitement. Le collet des plants sans symptôme apparent est sectionné pour observer l'état du système vasculaire. *P solanacearum* est recherché par isolement sur le milieu KY+ à partir des stèles de xylème nécrosées et des organes présentant des symptômes atypiques. Le pouvoir pathogène de ces souches est contrôlé selon la méthode décrite précédemment.

### Analyses statistiques

L'évolution de la population de *P solanacearum* marquée et les variations de l'humidité du sol sont traitées par l'analyse de variance. Deux tableaux (non présentés) constitués de 8 colonnes (les populations analysées) et de 50 lignes (les 10 résultats d'analyses aux 5 traitements) ont été établis. Ces tableaux correspondent aux résultats obtenus après avoir introduit ou non *P solanacearum* dans le sol. Le test du signe (Siegel, 1959) a été appliqué aux résultats des analyses microbiologiques afin d'apprécier l'incidence de *P solanacearum* sur les différentes flores étudiées (tableau III). Le tableau des données concernant les lots contaminés (non différent du témoin) est analysé. Les structures contenues dans ce tableau de 10 colonnes (9 populations et une variable descriptive) et 50 lignes sont décrites au moyen d'une analyse discriminante (logiciel Stat Itcf; ITCF, 1988) qui amplifie les différences (Cuany et Rodolphe, 1980). Deux variables descriptives ont été testées séparément : le traitement et le temps (cycle de culture).

**Tableau III.** Comparaison par le test du signe des résultats d'analyses microbiologiques entre les lots contaminés ou non avec *P solanacearum*.

	Populations non affectées		Populations affectées	
	0	+	+	-
Signe * analyses :	176	122	122	102

\* Après avoir inoculé *P solanacearum*, la population dénombrée est équivalente (0), plus importante (+) ou moins importante (-).  $Z = 1,27$  avec  $N = 224$  et  $x > N/2$ . La probabilité  $P$  d'obtenir  $Z > 1,27$  est de 0,204.  $P > 0,01$  l'hypothèse  $H_0$  ne peut être rejetée. ( $H_0 = P solanacearum$  n'a pas d'effet significatif).

## RÉSULTATS

### Incidence des amendements sur la mortalité due au flétrissement bactérien

L'incidence des traitements du sol sur l'expression de *P solanacearum* est présentée au tableau IV. Nous constatons que, lorsque le sol n'est pas amendé, le flétrissement bactérien s'intensifie à chaque nouvelle culture (14, 24 et 43%). La fertilisation minérale a peu d'incidence sur l'évolution de la maladie (22, 15 et 26%), alors que les amendements à base de matière organique ont un effet marqué. Pour ces traitements, aucun cas de flétrissement n'est observé lors des 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> cultures.

### Évolution de la population de *P solanacearum* dans le sol

Les données relatives aux dénombrements réalisés pour chaque traitement s'ajustent à des droites de régression dont les caractéristiques sont consignées dans le tableau V. La comparaison de ces droites montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre le sol témoin et les traitements avec l'urée ou les boues. Seul le traitement à la farine de soja présente une pente plus forte. Cependant, les très faibles valeurs des pentes ( $6 \times 10^{-3}$  à  $-1 \times 10^{-2}$ ) indiquent que *P solanacearum* s'adapte bien aux différents apports d'azote.

**Tableau IV.** Incidence de la fertilisation azotée sur le taux de mortalité dû au flétrissement bactérien lors de cultures successives de tomates cv Floradel. <sup>(1)</sup> Les fumures et l'inoculum à *P solanacearum* sont apportés au sol 12 j (J), avant la plantation; <sup>(2)</sup>BS : boues séchées; BSS : Boues séchées stérilisées à l'autoclave; <sup>(3)</sup> Pourcentages de plants flétris calculés sur des effectifs de 54 plantes par traitement et arrondis à l'unité supérieure.

Cultures <sup>(1)</sup>	I	II	III
	(J 12 à J 60)	(J62 à J109)	(J 112 à J 155)
Témoin	14 <sup>(3)</sup>	24	43
Urée	22	15	26
Soja	23	0	0
BS <sup>(2)</sup>	41	0	0
BSS <sup>(2)</sup>	30	0	0

**Tableau V.** Incidence des fertilisations azotées sur la survie de *P solanacearum* GT4-RN2 dans le sol. Analyse statistique. (1) BS : Boues séchées; BSS : Boues séchées stérilisées; (2) Tests d'homogénéité des variances (test de Bartlett); (3) Comparaison des pentes, analyse des covariances (test de Fischer). \*\*\* les pentes sont significativement différentes au seuil de 5%. NS: les pentes ne sont pas significativement différentes. A : Analyse réalisée sur l'ensemble des traitements. B : Analyse réalisée sans le traitement Soja.

Traitement	Témoin	Urée	BS <sup>(1)</sup>	BSS	Soja	Total
n	10	10	10	10	10	10
Pente	-6.10 <sup>-3</sup>	-1.10 <sup>-2</sup>	-8.10 <sup>-3</sup>	-1.10 <sup>-2</sup>	-1,6.10 <sup>-2</sup>	-1.10 <sup>-2</sup>
ET pente	5.10 <sup>-4</sup>	1,8.10 <sup>-3</sup>	6.10 <sup>-4</sup>	6.10 <sup>-4</sup>	1,2.10 <sup>-3</sup>	8.10 <sup>-4</sup>
r	-0,97	-0,88	-0,98	-0,94	-0,98	-0,85
r <sup>2</sup>	0,95	0,78	0,96	0,90	0,95	0,72
A	(2) $\chi^2_{\text{obs}} : 19,55; 4 \text{ ddl}; \chi^2_{\text{obs}} : 9,48 \text{ pour } P = 0,05$ (3) $F^4_{44} = 6,14 > F^4_{45\text{th}} : 4,29$ ***					
B	$\chi^2_{\text{théor}} = 19,14; 3 \text{ ddl}; \chi^2_{\text{théor}} = 7,81$ $F^3_{35} = 1,82 < F^3_{35\text{th}} = 5,09$ NS					

L'analyse de variance appliquée aux variations du taux d'humidité du sol au cours de l'expérimentation montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre les traitements (tableau VI).

### Observations et isolements

Les plants de tomate, cultivés dans le sol témoin ou le sol amendé avec de l'urée, qui ne présentent pas de symptôme apparent de flétrissement, possèdent aussi un système vasculaire sain (ab-

sence de brunissement). Par contre, à partir de la 2<sup>e</sup> culture dans les sols amendés avec de la matière organique, on observe des symptômes atypiques chez les plantes qui ne présentent pas le syndrome de flétrissement. Les stèles du xylème colonisées sont nécrosées et le pétiole correspondant présente une reprise d'activité du cambium, accompagnée d'un brunissement. L'évolution est lente mais fait éclater localement le pétiole. Généralement, une feuille portée par ce pétiole jaunit de part et d'autre de la nervure principale. *P solanacearum* est isolé de façon régulière et abondante à partir de ces différents organes. Il a conservé son type morphologique et son pouvoir pathogène (100% des tomates flétrissent 7 j après avoir été contaminées), et ce quel que soit l'organe (tige, pétiole ou feuille) d'où est isolée la souche.

**Tableau VI.** Analyse statistique des variations de l'humidité du sol au cours de l'expérimentation. T : témoin; U : urée; SO : farine de soja; BS : boues séchées; BSS : boues séchées stérilisées; NI et I : non contaminé et contaminé avec *P solanacearum*.

Traitement	n	Moyenne	Écart type
TNI	10	0,39	0,06
TI	10	0,35	0,09
UNI	10	0,42	0,04
UI	10	0,38	0,05
SONI	10	0,41	0,07
SOI	10	0,38	0,07
BSNI	10	0,39	0,06
BSI	10	0,38	0,07
BSSNI	10	0,37	0,06
BSSI	10	0,39	0,08

$\chi^2_{\text{obs}} = 6,51; 9 \text{ ddl}; \chi^2_{\text{théor}} = 16,9 \text{ pour } P = 0,05$   
 $F^9_{90} = 0,83; F^9_{200 \text{ th}} = 2,73; \text{NS à } P = 0,005$

### Évolution de la microflore tellurique

L'examen de la dynamique des populations totales de bactéries, actinomycètes et champignons, présentée aux figures 1 et 2, montre que les traitements du sol n'ont pas d'incidence marquée sur les populations analysées, excepté sur les ferments nitreux (*Nitrosomonas*) qui sont 10 à 100 fois plus abondants que dans le sol témoin (figs 2 et 3). On remarque également que ces ferments, ainsi que les organismes protéolytiques (figs 2 et 5), subissent une succession de stimulations et de dépressions. La population ni-

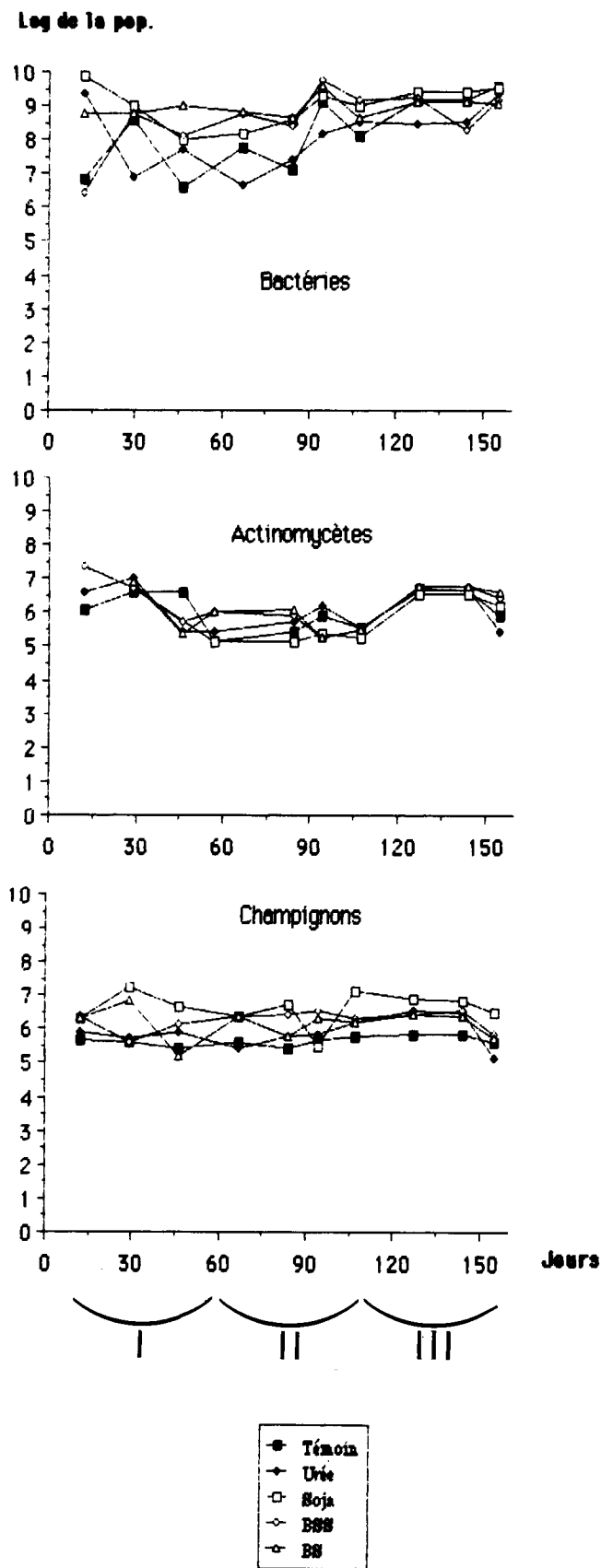


Fig 1. Incidence des traitements azotés et des cultures successives de tomate (I, II et III) sur l'évolution de la microflore tellurique. En ordonnée figure le logarithme de base 10 de la population dénombrée par g de sol sec.

tratante se maintient à un niveau élevé tandis que celle de la dénitrification tend à diminuer.

Lorsque le traitement est utilisé comme variable descriptive, aucune structure n'apparaît après l'analyse discriminante du tableau. Ce n'est pas le cas lorsque le cycle de cultures est utilisé comme variable descriptive. Le plan factoriel F1 x F2 présenté en figure 3 exprime la totalité de la variabilité des analyses (respectivement 57,8 et 42,2% pour les axes 1 et 2). On peut y distinguer 3 ensembles, dont chacun regroupe les points correspondant aux mesures réalisées pendant l'un des 3 cycles de culture de tomate, pour tous les traitements. Les variables (microflore) dont la corrélation avec l'un ou l'autre des axes discriminants est élevée expliquent la formation des ensembles. Il s'agit, pour l'axe 1, des ferments nitriques, de la flore dénitrifiante et protéolytique. L'axe 2 est corrélé négativement avec les ferments nitreux. On déduit, de la comparaison simultanée de la position des ensembles et des corrélations (positives ou négatives) des variables avec les axes, que l'effet temps efface l'effet traitement, que les ferments nitreux sont favorisés aux cultures I et II et que les ferments nitriques sont favorisés à chaque nouvelle culture, contrairement aux flores dénitrifiantes et protéolytiques.

## DISCUSSION

Les résultats obtenus confirment les observations de Clairon (1984) Clairon *et al* (1989) selon lesquelles l'apport de matières organiques dans le sol permet de lutter contre le flétrissement bactérien de la tomate. Une opération qui se justifie économiquement, car elle augmente de façon durable la fertilité du sol. Cependant, la matière organique est généralement rare dans les pays tropicaux et ceci constitue l'inconvénient majeur de cette technique culturale. En Guadeloupe, les amendements à base de boues actives ont tendance à se généraliser. Ces boues possèdent des qualités intéressantes : teneur élevée en azote, absence de métaux lourds et des principaux germes nuisibles à l'homme.

Les mécanismes qui permettent au cultivar sensible Floradel de résister au flétrissement sont lents à se mettre en place, puisque cette résistance n'apparaît qu'à la 2<sup>e</sup> culture. Ceci suggère qu'une activité biologique est à la base du processus, 1 activité qui se produit lors d'un apport de matière organique riche en azote. Les expériences de réinoculation des germes isolés de

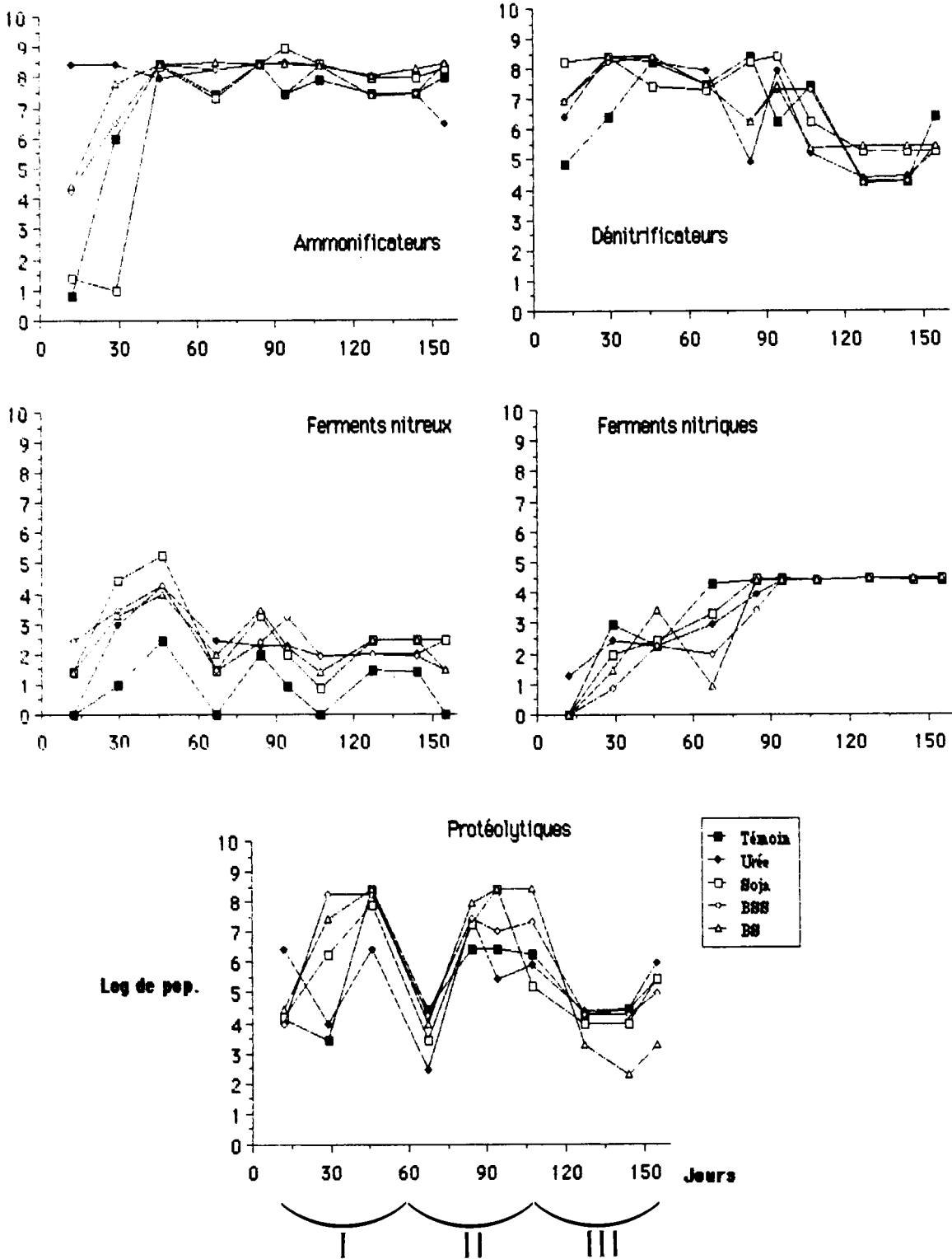


Fig 2. Évolution des microflore associées aux groupements fonctionnels du cycle de l'azote.

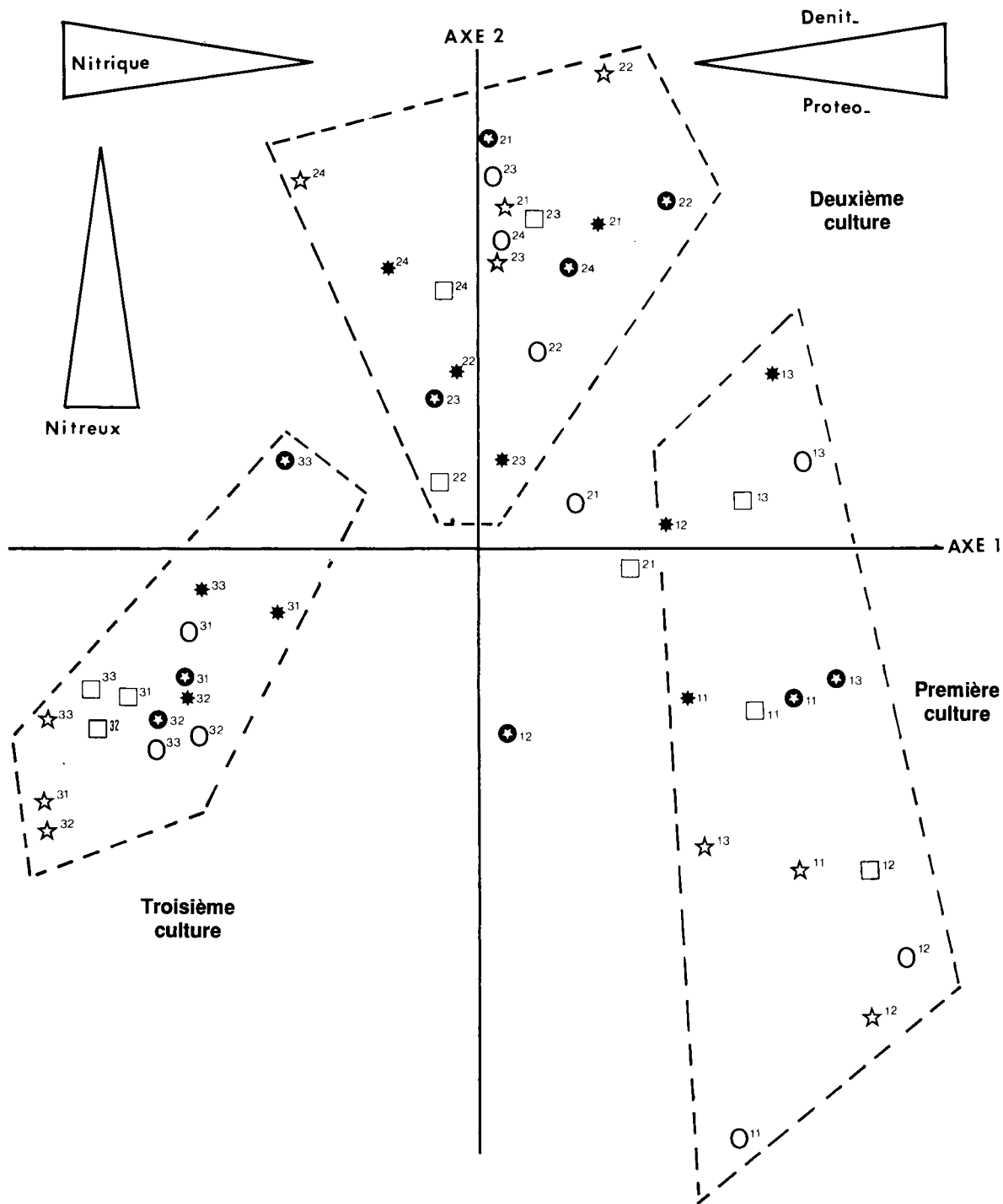


Fig 3. Analyse discriminante : carte factorielle F1 x F2 qui positionne, les uns par rapport aux autres, chaque résultat d'analyses pour les différents traitements (● : témoin; ★ : urée; ☆ : farine de soja; ○ : boues séchées; □ : boues séchées stérilisées), pour chaque culture (indexée par le 1<sup>er</sup> chiffre) aux différentes dates de prélèvement (l'ordre est indexé par le 2<sup>e</sup> chiffre). Les flèches représentent les tendances des variables qui sont à l'origine de la séparation des 3 ensembles matérialisés.



plantes vivantes nous autorisent à écarter l'hypothèse d'une action rapide et durable du traitement azoté, ou de sa microflore associée (notamment pour les boues de station d'épuration), sur la survie et le pouvoir pathogène de *P solanacearum*. Enfin, nous observons des plants porteurs sains dont une partie des vaisseaux du xylème est colonisée par la bactérie. Celle-ci semble confinée dans les tissus vasculaires nécrosés, dont l'aspect diffère du brunissement vasculaire habituellement observé lorsque *P solanacearum* colonise librement les tissus et provoque le flétrissement. L'occlusion des vaisseaux du xylème, qui est une réaction de défense assez répandue chez des plantes confrontées aux pathogènes vasculaires (Baker et Cook, 1974), intervient vraisemblablement dans ce syndrome atypique. L'ensemble du phénomène devrait être étudié histologiquement, mais, macroscopiquement, tout se passe comme si les conditions expérimentales appliquées ici au système sol-plante-bactérie rendaient le cultivar Floradel résistant au flétrissement.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette résistance phénotypique. L'activation d'un mécanisme de défense de l'hôte en relation avec l'amélioration de la nutrition (Cameron, 1972). La modification *in planta* du comportement de *P solanacearum*, ce qui permettrait à la plante de développer son système de lutte.

A l'appui de la 1<sup>re</sup> hypothèse, on constate que la nitrification est activée par l'apport de matière organique, la nutrition nitrique de la plante est donc favorisée. L'effet des amendements sur l'activité des autres populations microbiennes n'apparaît pas, mais nous n'avons pas recherché d'informations sur les variations qualitatives des différentes microflores. Par ailleurs, la qualité de l'apport peut aussi agir en modifiant la composition chimique de la plante. Ce qui irait dans le sens des travaux de Castagnone-Sereno *et al* (1988), montrant que le potentiel reproducteur de *Meloidogyne incognita* est réduit quand les tomates sont cultivées en présence de boues résiduelles. Alam *et al* (1980) et Singh *et al* (1983) associent ce phénomène à l'augmentation des teneurs en composés phénoliques, en acides aminés et en sucres dans les racines.

A l'appui de la 2<sup>e</sup> hypothèse, certaines fonctions bactériennes associées au processus infectieux (composants polysaccharidiques des parois, hydrolases...) peuvent être altérées ou défectueuses *in planta*. L'isolement de *P solanacearum* sur un milieu de culture riche peut avoir réactivé ces fonctions.

Bien que l'origine biologique de cette résistance soit difficile à établir, les altérations métaboliques qui se produisent chez la plante suggèrent l'existence d'un mécanisme de défense du type hypersensibilité (HR). Cependant, nos observations diffèrent de celles décrites lors de la réponse HR provoquée par *P solanacearum*. En effet, il est admis que l'absence de flétrissement implique la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) bactériens par un produit du métabolisme de l'hôte (lectines, par exemple). Lorsque les LPS sont reconnus, *P solanacearum* relargue un inducteur de réponse HR qui va déclencher chez l'hôte le mécanisme de compartimentation (Sequiera *et al*, 1977). Seuls les variants spontanés rugueux, non producteurs d'exopolysaccharides (EPS), sont identifiés par la plante. Le flétrissement est l'ultime manifestation de la libre multiplication des souches muqueuses, productrices d'EPS, dans les espaces intercellulaires (Wallis et Truter, 1978; Lin et Stevenson, 1979). Or, nous constatons ici que la résistance induite de Floradel est associée à la souche muqueuse, en principe virulente. L'hypothèse d'une modification des composants de surface de *P solanacearum* pourrait être à l'origine de la réaction HR.

Il est intéressant de comparer cette forme de résistance avec celle, intrinsèque, que l'on observe chez les variétés de tomate sélectionnées pour ce caractère. En effet, bien que le déterminisme polygénique de certaines des résistances observées soit démontré depuis longtemps (Singh, 1961; Messiaen, 1981), la littérature ne fait pas état des mécanismes biologiques mis en jeu.

Une étude récente (Prior *et al*, 1989b) a montré que *P solanacearum* était présent à l'état latent dans des vaisseaux de cultivars résistants au flétrissement (Caraïbo et Hawaï 7996). Autrement dit, ces cultivars sont tolérants à *P solanacearum*. Le syndrome de flétrissement ne se manifeste pas, excepté si la plante subit un stress (Cadet *et al*, 1989). Il semble alors qu'elle ne soit plus capable de maintenir efficacement ses défenses, probablement parce qu'un ou plusieurs produits du métabolisme sont mobilisés ailleurs. Cette réponse systémique de l'hôte avait déjà été soupçonnée par les améliorateurs qui ont pu mettre en évidence «un mécanisme génétique commun à déterminisme plurifactoriel et à effet pléiotropique» (Kaan et Laterrot, 1977) conférant une résistance à *P solanacearum* et à la Fusariose pathotype 2 (*F oxysporum* f sp *lycopersici* (Sacc) Snyder et Hans). Les 2 types de ré-

sistance, induite ou intrinsèque, pourraient avoir une origine biologique commune si l'on se réfère aux récents travaux de Antoniw et White (1987) et de Fritig *et al* (1987) concernant l'accumulation de protéines PR (pathogenis-related protein) et-ou d'enzymes de défense (chitinases, glucanases...) chez les Solanacées, en réponse à un stress ou à une agression virale.

Nous disposons aujourd'hui d'un modèle original pour étudier les mécanismes de résistance au flétrissement bactérien. Ce modèle pourrait être avantageusement utilisé pour rechercher les déterminismes physiologiques de la résistance à cette grave maladie.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions A Bardin, P Cadet, M Clairon et J Fournet pour l'appui qu'ils ont apporté dans la réalisation de ce travail.

## RÉFÉRENCES

- Alam MM, Ahmad M, Khan AM (1980) Effect of organic amendments on the growth and chemical composition of tomato, eggplant and chili and their susceptibility to attack of *Meloidogyne incognita*. *Plant Soil* 57, 231-236
- Antoniw JF, White RF (1987) *Plant resistance to virus*. Ciba Foundation Symposium. John Wiley & Sons, 57-71
- Baker KF, Cook RJ (1974) *Biological control of plant pathogens*. WH Freeman, San Francisco
- Buddenhagen IW (1986) Bacterial wilt revisited. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific* (GJ Persley, ed) Proc Int workshop held at PCAARD, 8-10 October 1985, Los Baños, Philippines, ACIAR n° 13, 126-143
- Cadet P, Prior P, Steva H (1989) Influence de *Meloidogyne arenaria* sur la sensibilité de deux cultivars de tomate à *Pseudomonas solanacearum* (EF Smith, ed) dans les Antilles françaises. *Agron Trop* 4 (sous presse)
- Cameron HR (1972) Relationship of host metabolism to bacterial infection. 3rd Int Conf Plant Pathol Bacteria Proc, Wageningen, 1971 (Maas Geesteranus). *Centre Agr Publ Document*, 59-61
- Castagnone-Sereno P, Kermarrec A, Clairon M, Anaïs A (1988) Effets dépressifs d'un apport de boue résiduaire sur le parasitisme de *Meloidogyne incognita*. *Med Fac Landbouww, Rijksuniv Gent* 53, 979-983
- Chandra S, Raizada M, Khanna KK (1981) Effect of organic soil amendments on the rhizosphere microflora of tomato. *Proc Indian Acad Sci Plant Sci* 90, 189-197
- Clairon M (1984) Possibilités de réduction de l'incidence du flétrissement bactérien (*Pseudomonas solanacearum*) chez l'aubergine (*Solanum melongena*) par modification de la fertilisation azotée. *Bull Agron Antilles Guyane* 3, 4-5
- Clairon M, Rat B, Nagou D, Bérakis M (1989) Réaction de la tomate au flétrissement bactérien sur sol ferrallitique en présence de fortes doses d'azote. *Caribbean Food Crops Soc Proc XXV ann Meet*, Pointe-à-Pitre Guadeloupe, 3-7 juillet 1989
- Cuany A, Rodolphe F (1980) Data of field experiments with nematicides. *Rev Nématol* 3, 37-50
- Denoyes B (1988) Recherche de géniteurs de tomate résistants à *Pseudomonas solanacearum* EF Smith. *Agron Trop* 43, 133-137
- Dommergues Y, Manganot F (1970) *Écologie microbienne du sol*. Masson, Paris
- El-Goorani MA, Abo-El-Dahab MK, Wagih EE (1978) Tests *in vitro* and in pots with certain chemicals for inhibition of *Pseudomonas solanacearum*. *Zentralbl Bakteriol, Parasitenk, Infektionskr Hyg Abc I Orig*, 133, 235-239
- Enfinger JM, McCarter SM, Jaworski CA (1979) Evaluation of chemicals and application methods for control of bacterial wilt of tomato transplants. *Phytopathology* 59, 637-640
- Fritig, Kauffman S, Dumas B, Geoffroy P, Kopp M, Legrand M (1987) *Plant resistance to virus*. Ciba Foundation Symposium, John Wiley & Sons, 92-108
- Good JM, Carter RL (1965) Nitrification lag following soil fumigation. *Phytopathology* 55, 1147-1150
- Hoitink HA, Fahy PC (1986) Basis for the control of soil-borne plant pathogens with composts. *Annu Rev Phytopathol* 24, 93-114
- Huber DM, Watson RD (1974) Nitrogen form and plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 12, 139-165
- Iizuka H, Tataka H, Kurihara K, Suda T, Hoshino F (1988) The integrated control for soil-borne diseases of forced tomato. *Gunma Agric Res Cent Egi-machi, Maebashi-shi, Gunma-Ken, Jpn* 5, 55-58
- ITCF (1988) *STAT-ITCF Manuel d'utilisation*. Institut Techn Céréales Fourrages, Paris
- Kaan F, Laterrot H (1977) Mise en évidence de la relation entre des résistances de la tomate à deux maladies vasculaires : le flétrissement bactérien (*Pseudomonas solanacearum* EF Sm) et la Fusariose pathotype 2 (*F oxysporum* f sp *Lycopersici* (Sacc) Snyder et Hans). *Ann Amélior Plant* 27, 25-34
- Kelman A (1953) The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: a literature review and bibliography. *NC Agric Exp Stn Tech Bull* 99, 194 pp
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693-695
- Krausz JP, Thurston HD (1975) Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato. *Phytopathology* 65, 1272-1274

- Lee JD, Han CS, Yu IS, Kang SK (1984) Study on control system of bacterial wilt in flue-cured tobacco. I. Control effect of bacterial wilt in tobacco line NC82 by the cultural practice and fumigation. *Korean J Plant Prot* 23, 96-101
- Lin CV, Stevenson WR (1979) The multiplication and interaction of virulent strain and avirulent mutant of *Pseudomonas solanacearum* in tomato plants. *Plant Prot Bull* 21, 351-357
- Lingappa Y, Lockwood JL (1962) Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* 52, 317-323
- Martin JP (1950) Use of acid, rosebengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci* 69, 215-233
- Maynard DN, Baerker AV, Lachman WH (1966) Ammonium induced stem and leaf lesions of tomato plants. *Proc Am Soc Hortic Sci* 88, 516-520
- Messiaen CM (1981) *Les variétés résistantes. Méthodes de lutte contre les maladies et ennemis des plantes*. INRA, Paris
- Messiaen CM (1989a) *Le potager tropical*. Collection technique vivante 2<sup>e</sup> ed, PUF, Paris
- Messiaen CM (1989b) Peut-on imaginer donner des bases scientifiques à l'agriculture biologique ? Actes 1<sup>er</sup> Cong Soc Franc Phytopathol, Rennes, 19-20 novembre 1987, 71
- Mew TW, Ho WC (1977) Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67, 909-911
- Overman AJ, Jones JP (1977) Efficacy of one stream versus three of a soil fumigant for production of tomato. *Proc Florida Sta Hortic Soc* 90, 407-409
- Pochon J, Tardieux P (1962) *Techniques d'analyse en microbiologie du sol*. Éditions de la Tourelle, Saint-Mandé
- Prakash D, Alam MM, Ashraf S (1985) Studies of the rhizosphere mycoflora of tomato in relation to soil amendements. *Natl Acad Sci Lett (India)* 8, 133-134
- Prior P, Steva H (1990) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Dis* 74, 13-17
- Prior P, Cadet P, Steva H (1989a) Variabilité du pouvoir pathogène de *Pseudomonas solanacearum* aux Antilles françaises (Martinique et Guadeloupe). *Acta Œcol, Œcol Appl* 10, 135-142
- Prior P, Béramis M, Schmit J, Chillet M (1989b) Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) resistance mechanisms. *Symbiosis*. (sous presse)
- Rattink H (1983) The influence of bark and some soil amendment on soil-fungi. *Meded Fac Landbouwwet, Rijksuniv Gent* 48, 699-703
- Sequeira L, Gaard G, De Zoeten GA (1977) Interaction of bacteria and host cell wall: its relation to mechanisms of induced resistance. *Physiol Plant Pathol* 10, 43-50
- Siegel S (1959) Non parametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd, Tokyo, 68-75
- Singh K (1961) Inheritance of North Carolina type of bacterial wilt resistance in tomato, *Lycopersicon esculentum* L. Master's Thesis, Univ Hawai
- Singh SP, Pant V, Khan A, Saxena SK (1983) Effect of sawdust with different nitrogen sources on the growth of tomato and on rhizosphere population of nematodes and fungi. *Indian Phytopathol* 36, 417-421
- Wallis FM, Truter SJ (1978) Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Physiol Plant Pathol* 13, 307-317