

Importance du crown gall chez les hybrides *Populus tremula* L x *P alba* L en pépinière forestière

X Nesme ¹, T Beneddra ², E Collin ³

¹ CNRS, URA 697 écologie microbienne, INRA et Université Lyon 1, bât 741, 69622 Villeurbanne Cedex;

² INRA, Station de pathologie végétale et phytobactériologie, centre de recherche d'Angers, 49000 Beaucozoué;

³ CEMAGREF, domaine des Barres, 45290 Nogent-sur-Vernisson, France

(Reçu le 13 février 1990; accepté le 20 juin 1990)

Résumé — Une comparaison entre plants sains et plants spontanément atteints de crown gall a été effectuée dans un dispositif expérimental de comparaison de clones de peupliers grisards (obtenus par croisements contrôlés entre *Populus tremula* et *P alba*). Les arbres présentant des tumeurs au collet sont plus petits que les arbres sains (– 18%) alors que la présence de tumeurs limitées aux racines n'a pas d'effet significatif. La fréquence des plants atteints de crown gall a été notée chez 31 clones de grisards lors de plusieurs campagnes de production dans la même pépinière. En dépit d'importantes variations annuelles et clonales, certaines familles d'hybrides sont toujours moins atteintes que d'autres, suggérant l'existence d'une base génétique de résistance au crown gall exploitable en sélection. En outre, une étude épidémiologique a montré la présence de la même population caractéristique d'*Agrobacterium tumefaciens* pathogène dans plusieurs pépinières de grisards. Ceci indique que les agrobactéries à l'origine de la contagion du crown gall chez les peupliers *Leuce* sont probablement transportées de pépinière en pépinière par les plantes elles-mêmes. La diffusion de grisards porteurs de bactéries pathogènes latentes fait courir un grave risque épidémiologique aux pépinières forestières car les plasmides Ti en cause peuvent potentiellement infecter de nombreuses essences forestières. La sélection de clones résistant au crown gall doit, de ce fait, être accompagnée de mesures prophylactiques sévères visant à limiter la diffusion des plants porteurs sains.

crown gall / *Agrobacterium tumefaciens* / *Populus tremula* x *Populus alba* / test variétal / bouturage de racines / sensibilité au champ

Summary — Importance of crown gall in hybrids of *Populus tremula* x *P alba* in forest tree nursery. Crown-galled and crown-gall free plants of *Leuce poplar* (*Populus tremula* x *P alba*) were observed to be spontaneously contaminated by *Agrobacterium tumefaciens* in experimental plots primarily designed to compare agronomic properties of poplar clones. This offered a rare possibility for the survey of clonal responses to spontaneous attacks of crown gall in the field, with the aim of serving as basic reference for breeding purposes. This study took into account the vigour and aspect of the plant, the crown gall frequency of the clone and an estimation of the epidemiological risks in nurseries. Regarding the effect of crown gall on shoot size, 2-yr-old poplars harbouring crown galls were statistically shorter than apparently healthy plants growing in the same plot (table I). Regarding the effect of size and location of galls on shoot growth inhibition, even small galls (< 2 cm in diameter) reduced relative shoot lengths (– 8%), but the biggest growth inhibitions were recorded with the largest galls (– 19% with galls > 5 cm). The location of the galls at the crown instead of on the roots had a significant effect : trees with crown-located galls were 18% shorter than healthy trees, while root-located galls had no significant effect (table II). Regarding clonal and family effect of spontaneous crown gall frequencies, the frequencies of crown-galled plants of 31 clones belonging to 7 breeding families were recorded over a period of several years in a single nursery (table III). In spite of significant annual and clonal variations, some hybrid families were constantly less crown-galled than others, indicating a possible genetic basis for selection of resistant poplars. Regarding the epidemiological survey, the pathogenic population of *A tumefaciens*, already described in a single poplar tree nursery (Nesme et al, 1987) was looked for in galls originating from several other nurseries. This showed the constant occurrence of the same pathogenic population of agrobacteria in every *Leuce poplar* nursery. This indicates that agrobacteria, which mediates crown-gall contagion in *Leuce poplars* were mainly carried from nursery to nursery by poplar plants themselves. Therefore, selection of crown gall-resistant poplar clones must be combined with severe prophylactic measures to limit the diffusion of contaminated plants carrying latent pathogenic agrobacteria.

crown gall / *Agrobacterium tumefaciens* / *Populus tremula* x *Populus alba* / varietal tests / root cuttings / field susceptibility

INTRODUCTION

Le crown gall est une bactériose majeure causée par *Agrobacterium radiobacter* pathovar *tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn, bactérie qui peut potentiellement infecter la plupart des espèces forestières feuillues ou conifères (De Cleene et De Ley, 1976). La maladie se traduit par la présence de tumeurs globuleuses au collet ou sur les racines. Plus rarement, on peut observer également des tumeurs sur les parties aériennes de peupliers de la section *Leuce* (Dochinger, 1969). Le pouvoir pathogène d'*Agrobacterium* est presque entièrement porté par un plasmide d'environ 210 kb appelé plasmide-Ti, ou pTi, dont la présence détermine la forme pathogène d'*Agrobacterium radiobacter* (Van Larebecke *et al*, 1974). *Agrobacterium radiobacter* est, au demeurant, une bactérie sacrophyte du sol (Moore et Cooksey, 1981; Kersters et De Ley, 1984). Une littérature abondante et précise (synthèse par Ream, 1989) décrit la cascade des interactions entre la bactérie et la plante qui conduit au phénotype tumoral.

Le programme d'amélioration des peupliers de la section *Leuce*, développé par l'Institut national de la recherche agronomique, a pour but d'obtenir un matériel potentiellement adapté à la reforestation des sols hydromorphes (Lemoine, 1973). De nombreux clones ont ainsi été sélectionnés, issus de croisements entre *P tremula*, *P alba*, *P tremuloides* et *P grandidentata*. Les hybrides obtenus sont appelés «grisards», par analogie avec les hybrides spontanés *P x canescens* Sm. Le crown gall, qui est une maladie majeure des pépinières fruitières et ornementales et de la vigne (Moore et Cooksey, 1981), a récemment pris une extension considérable chez les peupliers appartenant à la section *Leuce* (Nesme *et al*, 1987). Les premières attaques de crown gall chez les grisards, en France, ont été observées dans la pépinière de l'INRA d'Orléans où sont effectuées les premières multiplications, puis, au fur et à mesure de la propagation des clones, dans les pépinières de l'INRA, du CEMAGREF et de l'État, où sont installés des dispositifs expérimentaux. Le problème est relativement nouveau dans les pépinières forestières. Il est probablement lié à la tendance actuelle à privilégier des stratégies d'amélioration fondées sur la sélection clonale pour certaines espèces comme les peupliers et les merisiers. La prise en compte de la sensibilité au crown gall des essences forestières en cours d'amélioration est une nécessité, particulièrement si leur multiplica-

tion se fait par voie végétative en pépinière. En effet, l'importance des problèmes causés par le crown gall dans les programmes californiens d'amélioration a pu conduire, par exemple, à l'abandon de *Juglans regia*, jugé trop sensible, au profit de *J californica* ou *J hindsii* (Wilson et Ogawa, 1979).

La littérature donne peu de renseignements exploitables sur l'importance des effets néfastes causés par le crown gall (baisse de vigueur, fréquence de la maladie, importance de la contagion) ni sur les différences variétales de sensibilité consécutives à des contaminations spontanées. Ce dernier point est cependant capital pour évaluer la qualité des tests de sensibilité par infection artificielle qui devront être ultérieurement proposés pour comparer les nouveaux hybrides. L'observation de l'effet des attaques spontanées de crown gall dans des dispositifs expérimentaux, destinés à l'origine à comparer les qualités agronomiques respectives des clones de grisards, offre l'avantage de permettre la mesure réelle des différences variétales au champ.

Dans le but de servir de référence aux travaux de sélection, une étude a été entreprise pour évaluer l'importance des attaques spontanées de crown gall chez les grisards. Ce travail prend en compte : la vigueur et l'aspect à l'échelle des plants, la fréquence des attaques à l'échelle des clones et l'estimation des risques épidémiologiques à l'échelle de la pépinière.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Matériel végétal

Les clones de peupliers grisards utilisés dans cette étude ont été obtenus par multiplication végétative des hybrides de *Populus alba* et de *P tremula* (familles 706, 708, 709, 710, 712, 717) ou de *P alba* et de *P tremuloides* (familles 808 et 812) obtenus par M Lemoine en 1958 et 1959 à l'INRA de Nancy (Lemoine, 1973).

Pépinières

L'étude de l'effet du crown gall a été réalisée à partir de l'observation d'attaques spontanées de crown gall dans la pépinière administrative de Peyrat-le-Château (Haute-Vienne). Cette pépinière n'a jamais connu d'antécédent de crown gall avant la plantation des grisards. L'étude des populations pathogènes, souches

d'*Agrobacterium* et type de plasmide-Ti, présentes dans les tumeurs de grisards a été conduite dans les pépinières de Peyrat-le-Château, du CEMAGREF à Nogent-sur-Vernisson (Loiret), de l'INRA à Nantes (Loire-Atlantique) et à Angers (Maine-et-Loire).

Méthodes

Bouturage de racines

La propagation des clones est assurée par bouturage de racines selon la méthode de Janson (1967) adaptée par Lemoine (1979) et améliorée par le CEMAGREF. Les plants utilisés pour la confection des boutures sont arrachés au printemps, leur système racinaire est scrupuleusement inspecté et tout plant porteur de tumeur est éliminé. Les racines des plants sains sont habillées à 20 cm du collet et les chutes sont sectionnées en morceaux d'environ 8 cm de long et 7 mm de diamètre, et installées dans des mottes «Fertiss» (Chaperon, 1985). Les boutures sont élevées en serre jusqu'à l'apparition de racines, puis repiquées en pépinière au cours de l'été, après une phase d'acclimatation sous ombrière. Les plants sont repesés à la fin de l'hiver et arrachés après une nouvelle année de végétation. Les plants apparemment sains sont utilisés dans des reboisements expérimentaux et leurs racines fournissent de nouvelles boutures.

Étude morphométrique des plants

Cette étude a été effectuée dans un dispositif expérimental portant sur une partie des boutures racinées obtenues en 1985 et repiquées dans un essai permettant de comparer 12 clones dans 4 blocs complets équilibrés. On a choisi de mesurer les paramètres suivants : la longueur des tiges des plants sains et des plants atteints, la taille et la localisation des tumeurs chez les plants malades, et la fréquence des plants atteints par clone et par famille. Les tumeurs ont été mesurées dans leur plus grand diamètre, puis excisées et plongées dans une éprouvette d'eau pour mesurer leur volume. Ceci a permis d'établir une péréquation entre diamètre et volume des tumeurs, et de disposer d'une mesure dans les cas de tumeurs fortement nécrosées ou très déformées. Trois classes de taille de tumeur ont été arbitrairement distinguées : petite tumeur : diamètre < 2 cm, volume < 8 cm³; tumeur moyenne : diamètre de 2 à 5 cm, volume de 8 à 50 cm³; grosse tumeur : diamètre > 5 cm, volume > 50 cm³ (remarque : il n'y avait pas de tumeur ayant une taille entre 50 et 70 cm³). Les analyses de variance ont été effectuées après normalisation des pourcentages (p) par la formule $\arcsin \sqrt{p}$. Les moyennes ont été reconverties en pourcentage par la formule inverse.

Étude bactériologique des tumeurs

L'isolement et l'identification des bactéries présentes dans les tumeurs ont été réalisés avec les milieux sé-

lectifs et les tests biochimiques précédemment décrits (Nesme *et al*, 1987). Le sérotypage des isolats a été réalisé par immunofluorescence sur des cultures pures avec la méthode et les sérums élaborés contre les souches 2177, 2516, 2517, 2519 précédemment décrits (Nesme *et al*, 1987). La détection des cellules d'*Agrobacterium* a été également réalisée par immunofluorescence sur des fragments de tumeurs. Ceux-ci ont été broyés dans une suspension de polyvinylpyrrolidone, PVPP (Sigma) à 1% (p/v) pour éliminer l'autofluorescence sous UV des composés phénoliques contenus dans les tissus végétaux.

Type opinique des plasmides-Ti

Le type opinique des isolats a été déterminé par croissance des isolats sur le milieu salin minimum de Monod, additionné d'octopine, de nopaline, de manopine ou d'acide mannopinique (Sigma) à 1 g/l comme seule source de carbone et d'azote (Petit *et al*, 1978). Nous avons vérifié que les croissances observées sur milieux enrichis en opine sont nettement différentes des croissances résiduelles sur un milieu témoin dépourvu d'opine. La détection des opines dans les tumeurs a été aimablement réalisée par A Petit, à l'Université d'Orsay, par électrophorèse sur papier à haute tension (pH 1,9; 4 000 V; 10 min; papier Watman 3M) (Petit *et al*, 1986).

Pouvoir pathogène des isolats

Le pouvoir pathogène des isolats a été testé par inoculation de la partie subterminale non-lignifiée de tiges de jeunes plants de tomate, kalanchoë et tabac, au stade 4 à 6 feuilles, avec un cure-dent préalablement trempé dans une colonie âgée de 24 à 48 h (3 à 4 inoculations par plante et 3 plantes par souche).

RÉSULTATS

Effet du crown gall sur la taille des tiges

Après 2 ans de culture en pépinière, les plants de grisards du dispositif de 1985 ont été arrachés et examinés. Près de 12,5% (144/1 156) portaient des tumeurs dont seulement 1/4 (36/144) était visible avant l'arrachage. Les tumeurs étaient situées sur les racines ou au collet. Dans ce dernier cas, la tumeur provoquait fréquemment une croissance plagiotrope des tiges (données non montrées).

L'analyse de variance a montré que les 2 facteurs contrôlés – le clone et la présence ou non de tumeur – avaient tous 2 un effet très significatif sur la longueur moyenne des tiges ($P = 10^{-4}$). L'interaction des 2 facteurs n'était pas significa-

tive ($P = 0,1$). La taille moyenne des plants atteints de crown gall était toujours inférieure à celle des plants sains, variant de -1% à -40% suivant le clone considéré (tableau I).

En pondérant la variable longueur de la tige des individus d'un clone donné par la longueur moyenne des plants sains du même clone (ie taille relative), il a été possible de s'affranchir des différences de taille entre clones. La réduction relative de taille des plants atteints de crown gall, tous clones confondus, a été observée en fonction de deux facteurs contrôlés : 1) la taille des tumeurs : petites, moyennes ou grosses; 2) la localisation des tumeurs soit au collet (et éventuellement sur les racines), soit uniquement sur les racines (tableau II). Les petites tumeurs ont diminué significativement la taille des plantes (-8%) mais moins que les tumeurs moyennes ou grosses (respectivement -15% et -19%). La présence d'une tumeur au collet a significativement inhibé la croissance des tiges, mais si les tumeurs étaient situées uniquement sur les racines, la longueur des tiges n'était pas significativement affectée.

Fréquence du crown gall par clone

Le pourcentage de plants de grisards atteints de crown gall a été noté chaque année, pour cha-

Tableau I. Longueurs moyennes des tiges de grisards sains ou atteints de crown gall.

a : longueur moyenne en cm suivi du nombre de plants entre parenthèses; b : longueur moyenne des plants malades significativement plus faible que celle des plants sains; NS : non significatif; * $P = 0,05$; ** $P = 0,01$; *** $P = 0,0001$.

Clone de peuplier grisard	Longueur moyenne des tiges des plants		Longueur moyenne relative des plants malades	
	sains	malades		
712-1	1,71 (91) a	1,02 (3) a	-40,4	NS b
812-1-6	1,97 (91)	1,28 (1)	-35,0	NS
712-8	1,86 (88)	1,42 (6)	-23,5	*
717-1-B4	1,89 (71)	1,55 (24)	-18,0	**
717-1-2	1,65 (89)	1,36 (9)	-17,8	NS
706-10	1,55 (64)	1,32 (32)	-15,3	*
712-7	1,82 (54)	1,56 (44)	-14,3	**
712-4	1,91 (97)	1,77 (1)	-7,3	NS
710-25	1,65 (91)	1,60 (8)	-7,3	NS
709-27	1,77 (91)	1,72 (7)	-2,8	NS
808-111-6	1,62 (93)	1,60 (4)	-1,5	NS
717-1-1	1,49 (92)	1,47 (5)	-1,2	NS
Moyenne	1,74 (1012)	1,47 (144)	-15,5	***

que clone, dans la production normale de la pépinière de Peyrat-le-Château. Lorsque l'on compare les 2 campagnes de production qui comportaient la totalité des 31 clones de *P tremula x P alba* en expérimentation, on constate (tableau III) que le pourcentage de crown gall global (tous clones confondus) a varié significativement ($P = 0,001$) de 20% à 8,2% d'une campagne de bouturage à l'autre.

À l'échelle du clone, il y avait une importante variation, comme le montre par exemple le clone 709-27 et le clone 712-7. Le pourcentage de plants atteints de crown gall chez le clone 709-27 était de 44% lors de la campagne 1982-84 et 3,3% lors de celle de 1984-86 (tableau III). Le clone 712-7 était relativement peu affecté en 1982-84 et 1984-86 (respectivement 0% et 3%, tableau III) mais fut atteint à 47% dans le dispositif de pépinière de 1985-87 (à partir des données présentées dans le tableau I).

À l'échelle de la famille qui groupe des clones frères, issus des mêmes parents, l'analyse de variance n'a pas révélé d'interaction significative ($P = 0,09$) entre famille et campagne de bouturage, alors que l'effet du regroupement par famille est fortement significatif ($P = 10^{-4}$). Ainsi, les familles 710 et 712 étaient systématiquement moins affectées par le crown gall que les familles 706, 708 ou 709. Ce comportement global des familles 710 et 712, comparativement aux familles 706, 708 et 709, a été vérifié lors d'autres campagnes de bouturages non présentées ici, portant sur un nombre plus restreint de clones.

Tableau II. Inhibition relative de la longueur des tiges chez les grisards atteints de crown gall en fonction de la taille et de la position des tumeurs. Tumeur : petite < 2 cm; moyenne entre 2 cm et 5 cm; grosse > 5 cm. a : tumeurs situées au collet ou au collet et sur les racines; b : tumeurs situées uniquement sur les racines; c : pourcentage d'inhibition de longueur des tiges chez les plants malades par rapport aux plants sains, significativement plus faible; * $P = 0,05$; *** $P = 0,001$; NS : non significatif.

Position des tumeurs	Taille des tumeurs (en %)			Inhibition moyenne de la longueur (en %)
	Petite	Moyenne	Grosse	
Collet a	-13,0 *	-19,2 ***	-18,7 ***	-17,9 ***
Racines b	-3,3 NS	-5,6 NS	-18,2 NS	-6,0 NS
Inhibition moyenne de la longueur	-8,2 *	-15,0 ***	-18,6 ***	-14,1 ***

Tableau III. Fréquence des attaques de crown gall chez 31 clones de grisards appartenant à 6 familles d'hybrides lors de 2 campagnes de bouturage successives dans une même pépinière forestière. * numéros respectifs de la mère et du père de la famille; ** en %; *** les moyennes familiales situées dans une même colonne sont significativement différentes ($P = 0,05$) si elles sont suivies de lettres différentes.

Familles d'hybrides	Clones	Campagne de bouturage	
		1982-1984	1984-1986
706 (5820 x 5872)*	706-1	70**	13
	706-2	57	39
	706-3	6,5	13
	706-6	35	13
	706-8	26	18
	706-9	27	5,2
	706-10	19	8,8
Moyenne familiale		33 a***	15 a
708 (5821 x 5872)	708-1	43	7,1
	708-2	75	43
	Moyenne familiale	60 a	22 a
709 (5813 x 5872)	709-1	16	11
	709-2	33	14
	709-3	94	50
	709-4	34	3,5
	709-21	70	10
	709-26	10	1,5
	709-27	44	3,3
Moyenne familiale		43 a	11 ab
710 (5814 x 5872)	710-21	3,8	6,2
	710-23	5,3	6,6
	710-24	1,1	0,7
	710-25	4,4	3
	710-26	0	3,7
	710-27	1,9	4,8
Moyenne familiale		2,1 b	3,8 bc
712 (5815 x 5872)	712-1	1,1	1,9
	712-2	26	13
	712-3	4,1	3,3
	712-4	0,5	0,2
	712-7	0	3
	712-8	8,9	0,6
Moyenne familiale		4,1 b	1,7 c
717 (5903 x 6072)	717-1-1	15	8,7
	717-1-2	26	17
	717-1-B4	16	6,2
Moyenne familiale		19 ab	10 abc
Moyenne par campagne		20,4	8,2

On a noté que la disposition des plantes dans les dispositifs expérimentaux n'avait pas d'effet significatif sur les fréquences de crown gall.

Identification de l'agent pathogène

Les tumeurs de grisards en provenance des pépinières de Peyrat-le-Château, Nogent-sur-Vernisson, Nantes et Angers contenaient de la nopaline et la majorité présentait une réaction sérologique positive à un ou plusieurs des sérums anti-2177, anti-2516, anti-2517 et, plus rarement, anti-2519, montrant la présence probable dans toutes les pépinières de bactéries appartenant aux sérogroupes 1a, 1b, 1c ou 2ac hébergeant un plasmide-Ti à nopaline. Pour confirmer ce résultat, 50 isolats d'*Agrobacterium* ont été réalisés à partir de tumeurs de grisards cultivés dans le dispositif étudié dans le tableau I, et dans les pépinières de Nogent-sur-Vernisson, Nantes et Angers. Tous ces isolats étaient pathogènes, donnant des tumeurs à la fois chez la tomate, le tabac ou le Kalanchoë. Les isolats pathogènes étaient tous capables d'utiliser la nopaline comme seule source de carbone et d'azote. Des mutants capables de cataboliser l'octopine de façon constitutive ont été obtenus à partir des isolats pathogènes. Aucun isolat n'était capable de croître aux dépens de la mannopine ou de l'acide mannopinique. Les isolats pathogènes appartenaient majoritairement (80%) à un des sérogroupes d'*Agrobacterium* 1a ou 1b (biotype 1), les autres isolats se répartissant en bactéries appartenant au séro groupe 1c (biotypes 1) ou à des sérogroupes indéfinis. Les isolats pathogènes non sérotypés appartenaient tous au biotype 2.

DISCUSSION

Dans la littérature, les pertes économiques causées par le crown gall sont en général le résultat de bilans globaux basés sur le manque à gagner des exploitations agricoles. Ces pertes sont souvent très importantes (138 milliards de dollars en 1974 dans le monde, pour les seuls arbres fruitiers à noyaux; El-Fiki et Giles, 1981) et justifient pleinement les mesures prophylactiques mises en œuvre. En revanche, peu de données sont disponibles permettant de préciser en termes biologiques l'effet néfaste du crown gall. Ces données biologiques, telles que les pertes de vigueur ou la fréquence de la maladie chez une variété donnée, permettraient d'établir un classement relatif des plantes vis-à-vis de leur sensibilité au champ, préliminaire indispensable à la mise au point d'un test de comparaison des sensibilités variétales par une méthode de contami-

nation artificielle contrôlée. L'absence de données biologiques est en grande partie due au fait que l'observation de plantes spontanément attaquées par une maladie peut rarement être comparée à des témoins sains, et que la population pathogène en cause n'est pas connue précisément. L'existence d'attaques de crown gall dans des dispositifs expérimentaux destinés à comparer les qualités agronomiques de nombreux clones d'une espèce a permis d'une part de comparer statistiquement plants sains et plants porteurs de tumeur, et, d'autre part, de classer les différents clones testés dans les dispositifs en fonction de leur réaction à des attaques naturelles de crown gall.

Effet du crown gall au niveau des plants de grisard

Comparé à des plants ne présentant pas de tumeur, l'effet inhibiteur du crown gall sur la croissance des tiges est maximal et significatif uniquement lorsque les tumeurs se sont développées au niveau du collet (tableau II). Ceci suggère que l'inhibition de croissance est due à une perturbation du système vasculaire au niveau du collet qui limite les échanges trophiques entre parties aériennes et racinaires. De plus, le port plagiotrope est en lui-même un défaut technologique important et les plants atteints de crown gall au collet ne peuvent être ni plantés ni commercialisés. La perturbation des échanges trophiques a moins de conséquences lorsque la tumeur se développe sur une racine, et la vigueur des plants est alors moins affectée (tableau II). Ceci n'implique pas que les plants présentant du crown gall exclusivement sur les racines puissent être utilisés sans risque. En effet, chez les peupliers, comme chez les autres espèces, les tumeurs évoluent dans le temps, se nécrosent, et sont le lieu de pénétration et de multiplication de nombreux parasites secondaires entraînant la détérioration du bois. Les arbres atteints de crown gall au niveau du système racinaire sont alors beaucoup plus sujets au chablis lors des tempêtes (Moore et Cooksey, 1981).

Fréquence des attaques de crown gall au niveau de l'hybride ou de la famille d'hybrides

Bien que les observations conduites dans la présente étude soient causées par des attaques

spontanées, nous avons pu contrôler la plupart des paramètres comme dans un plan d'expérience classique. En effet, les observations ont permis de dégager les effets propres aux plantes des effets de terrain, et l'étude épidémiologique a permis de déterminer *a posteriori* le génotype du pathogène. Cependant, la dose d'inoculum apportée à chaque arbre par ce moyen n'est pas contrôlée. Il est probable, toutefois, que l'élimination systématique des tumeurs, principaux réservoirs d'agrobactéries pathogènes, explique en partie la diminution des attaques de crown gall entre les 2 campagnes de bouturage présentées dans le tableau III. En effet, à la suite de la fréquence catastrophique du crown gall observée à l'issue de la campagne 1982-84, le tri des plants destinés à fournir les boutures de la campagne 1984-86 a été beaucoup plus sévère. La présence de tumeurs, même de très petite taille, conduisit systématiquement à l'élimination des plantes atteintes. Le pourcentage est alors passé de 20% en 1982-84 à 8% en 1984-86. On peut également supposer que c'est l'hétérogénéité de la contamination des racines qui cause les différences d'attaques de crown gall, parfois importantes, observées chez un même clone d'une campagne de bouturage à l'autre (cf 712-7 entre les tableaux I et III).

Malgré l'importante variabilité du pourcentage parfois enregistré chez un clone donné, il existe un net effet familial. Les clones des familles 710 et 712 sont, en moyenne, moins atteints par le crown gall que les clones appartenant aux familles 706, 708 ou 709 (tableau III). Ceci confirme des observations précédentes chez d'autres familles de grisards (Nesme *et al*, 1987). Le classement relatif des familles en fonction de leur sensibilité au crown gall reste pratiquement inchangé d'une campagne de bouturage à l'autre. Ceci suggère que la fréquence des attaques de crown gall est en partie contrôlée génétiquement par la plante. Comme les familles 706, 708, 709, 710 et 712 correspondent à la fécondation de 5 clones femelles (respectivement 5820, 5821, 5813, 5814 et 5815) par le pollen d'un unique clone mâle (5872), les clones femelles 5814 et 5815 de *P. alba* montrent des potentialités de transmission de la résistance au crown gall plus importantes que les clones 5820, 5821 et 5813. La nature et le niveau d'action des propriétés de résistance au crown gall ne peuvent pas être précisées dans cette étude. En effet, les conditions de l'étude ne permettent pas de distinguer si la résistance opère au stade de la phase de latence des bactéries dans la rhizos-

phère, au stade de la contamination (blessure) ou, plus tardivement, lors du développement de la tumeur après l'infection. Néanmoins, l'existence d'une base génétique de résistance au crown gall est une voie qui devrait permettre de s'acheminer vers la sélection de grisards résistants ou tolérants au crown gall.

Risque épidémiologique au niveau de la pépinière

Le risque le plus important lié à l'utilisation de plants atteints de crown gall est surtout d'ordre épidémiologique. En effet, à chaque campagne de bouturage, environ 14% des plants de grisards sont atteints (tableaux I et III, de même que Nesme *et al*, 1987) malgré le tri et l'élimination de tous les plants portant des tumeurs. Ceci indique qu'il y a, outre les tumeurs, un autre réservoir d'*Agrobacterium* pathogènes, le sol ou la plante, qui est à la base des manifestations récurrentes de crown gall chez les peupliers *Leuce*. L'identification des réservoirs d'inoculum réellement à la source des contagions doit prendre en compte des marqueurs propres aux bactéries, le sérotype par exemple, mais aussi des marqueurs propres aux plasmides pathogènes, comme leur type opinique. En effet, les sérums utilisés ne permettent pas de détecter la présence d'un plasmide-Ti dans une souche d'*Agrobacterium* (Nesme *et al*, 1990), et le plasmide Ti étant conjugatif (Kerr, 1971; Genetello *et al*, 1977), il peut potentiellement être transmis à tout *Agrobacterium* saprophyte du sol de sérotype indéfini. Nous avons alors cherché simultanément des critères de caractérisation des souches et des plasmides dans les populations pathogènes présentes dans les tumeurs. La population pathogène présente dans la pépinière d'origine des hybrides, INRA d'Orléans, était constituée de 4 souches dominantes 2177, 2516, 2517 et 2519, correspondant respectivement aux 4 sérogroupes 1a, 1b, 1c et 2ac. Toutes hébergeaient un plasmide-Ti à nopaline (Nesme *et al*, 1987). Dans les différentes pépinières de multiplication des grisards, les pathogènes sont aussi majoritairement du type 1a, 1b, 1c ou, plus rarement, 2ac, et les propriétés de catabolisme des opines de tous les isolats pathogènes sont typiques d'*Agrobacterium* hébergeant un plasmide-Ti à nopaline (Petit et Tempé, 1975, 1978). Ces propriétés sérologiques et opiniques des isolats confirment l'analyse du contenu opinique et sérologique des tumeurs. Les attaques spontanées de crown gall

chez les grisards sont donc causées dans toutes les pépinières par la même population pathogène composée des souches 2177, 2516, 2517 et 2519. L'identité sérologique et plasmidique des pathogènes entre la pépinière d'origine et les pépinières de multiplication montre que la population pathogène est unique (bien que complexe) et a probablement accompagné les plantes lors de leur dissémination de pépinière en pépinière. Le mode de multiplication des grisards, par bouturage de racines, est un facteur favorable à ce type de contagion, puisque *Agrobacterium* est un bactérie tellurique et même rhizosphérique (Starkey, 1931, cité par Moore et Cooksey, 1981) qui peut vivre et être véhiculée dans les particules de sol adhérant aux racines.

Notre étude a montré que le crown gall des grisards est essentiellement dû à la présence d'*Agrobacterium* pathogènes latents à la surface des racines de plants apparemment sains utilisés pour le bouturage. De ce fait, le tri et l'élimination des plants présentant des tumeurs n'ont qu'une portée prophylactique limitée, même s'ils permettent de diminuer une grande partie de la source d'inoculum représentée par les tumeurs elles-mêmes. Le risque épidémiologique est très élevé car dans les pépinières forestières autrefois indemnes de crown gall, on a observé, après introduction de grisards malades, des cas de contamination chez d'autres espèces. Dans sa pépinière de Nogent-sur-Vernisson, le CEMAGREF a constaté en particulier la présence de crown gall sur radis fourrager (culture d'assolement), sur merisier et sur un clone de peuplier (*P x euramericana* cv «C.56.50.53») appartenant à une autre section que la section *Leuce*, pourtant réputée résistante au crown gall (résultats non publiés). De plus, en testant des souches en provenances de peuplier *Leuce* d'Orléans, Morris *et al* (1989) ont montré que ces souches étaient pathogènes chez divers conifères. Il n'est donc pas exclu que la contagion s'étende à d'autres essences forestières feuillues ou conifères. C'est pourquoi, face à ce risque, le CEMAGREF a mis fin à la production de plants de grisards dans les pépinières administratives.

La prophylaxie du crown gall des grisards doit prendre la voie de la sélection de clones suffisamment résistants pour éviter l'explosion du phénomène contagieux. Mais il faudrait surtout ne plus utiliser de matériel végétal provenant de pépinières atteintes de crown gall. La culture *in vitro*, bien adaptée à la multiplication des grisards, permettrait de garantir la qualité sanitaire

des plants ainsi produits. Pour éviter le phénomène de recontamination au stade de la pépinière, une méthode efficace d'indexation des sols et des substrats de culture se révèle maintenant indispensable.

REMERCIEMENTS

Nous remercions D Terrasson (CEMAGREF Nogent) qui nous a facilité l'accès et l'étude des pépinières du CEMAGREF et de Peyrat-le-Château, M Ridé (INRA Angers) qui nous a aidés de ses conseils sur l'épidémiologie du crown gall, M Lemoine (INRA Orléans) pour les renseignements concernant la généalogie des grisards, et A Petit (Université d'Orsay) pour les analyses d'opine et pour ses judicieuses critiques. Ce travail a été soutenu financièrement par la Communauté économique européenne (Contrat MA1B0006C: «Le bois comme matière première renouvelable»).

RÉFÉRENCES

- Chaperon H (1985) La motte Fertiss. *Afocel Informations-Forêt* 2, 193-203
- De Cleene M, De Ley J (1976) The host range of crown gall. *Bot Rev* 42, 389-466
- Dochinger LS (1969) *Agrobacterium* galls of hybrid poplar trees in Iowa. *Phytopathology* 59, 1024
- El-Fiki F, Giles KL (1981) *Agrobacterium tumefaciens* in agriculture and research. Biology of the Rhizobiaceae. (KL Giles, AG Atherly, eds). *Int Rev Cytol suppl* 13. Academic Press, New York, 47-58
- Genetello C, Van Larebeke N, Holster M, De Picker A, Van Montagu M, Schell J (1977) Ti plasmids of *Agrobacterium* as conjugative plasmids. *Nature* 265, 561-563
- Janson L (1967) Die vegetative Vermehrung von Pappeln der *Sektion Leuce* Duby. XIV^e Cong IUFRO, sec 22, Munich 205-223
- Kerr A (1971) Acquisition of virulence by non-pathogenic isolates of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiol Plant Pathol* 1, 241-246
- Kerstens K, De Ley J (1984) *Agrobacterium*, Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1 (NR Krieg, JG Holt, eds) Williams & Wilkins, Baltimore, 244-254
- Lemoine M (1973) Amélioration des peupliers de la section *Leuce* sur sols hydromorphes. Thèse de docteur-ingénieur, Université Nancy
- Lemoine M (1979) Multiplication des peupliers de la section *Leuce* par bouturage de racines. CR des séminaires du groupe d'étude des racines, Grenoble, nov 1979 (J Gagnaire Michard, A Riedacker, eds) 7, 164-166
- Moore LW, Cooksey DA (1981) Biology of *Agrobacterium tumefaciens* : plant interactions. Biology of the Rhizobiaceae. (KL Giles, AG Atherly, eds). *Int Rev Cytol suppl* 13. Acad Press, New York, 15-46
- Morris JW, Castle LA, Morris RO (1989) Efficacy of different *Agrobacterium tumefaciens* strains in transformation of pinaceous gymnosperms. *Physiol Mol Plant Pathol* 34, 451-461
- Nesme X, Michel MF, Digat B (1987) Population heterogeneity of *Agrobacterium tumefaciens* in galls of *Populus* L from a single nursery. *Appl Environ Microbiol* 53, 655-659
- Nesme X, Leclerc MC, Bardin R (1990) PCR detection of an original endosymbiont : the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. (P Nardon, V Gianinazzi-Pearson, AM Grenier, L Margulis, DC Smith, eds). Endocytobiology IV, Villeurbanne, July 4-8, 1989. INRA, Versailles, 47-50
- Petit A, Tempé J (1975) Étude du métabolisme des guanidines des tissus de crown gall par la souche T37 d'*Agrobacterium tumefaciens*. *CR Acad Sci Sér III. Sci Vie, Paris* 281, 467-469
- Petit A, Tempé J (1978) Isolation of *Agrobacterium* Ti-plasmid regulatory mutants. *Mol Gen Genet* 167, 147-155
- Petit A, Desseaux, Tempé J (1978) The biological significance of opines. I. A study of opine catabolism by *Agrobacterium tumefaciens*. Proc 4th Int Conf Plant Path Bact Angers, 1978, 143-152
- Petit A, Berkalo A, Tempé J (1986) Multiple transformation of plant cell by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organization of T-DNA in crown gall and hairy root. *Mol Gen Genet* 202, 388-393
- Ream W (1989) *Agrobacterium tumefaciens* and inter-kingdom genetic exchanges. *Ann Rev Phytopathol* 27, 583-618
- Van Larebecke N, Engler G, Holters M, Van den El-sacker S, Zaenen I (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* is essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252, 169-170
- Wilson EE, Ogawa JM (1979) Fungal, bacterial, and certain nonparasitic diseases of fruit and nut crops in California. Agric Sci Publ Univ Calif, Berkeley, California