

Estimation de la sensibilité variétale du pêcher à *Pseudomonas syringae* pv *persicae* sur vitroplants

JL Gaignard¹, F Brégeon², J Luisetti^{1,*}

¹ INRA, Station de pathologie végétale et phytobactériologie, Centre d'Angers, 42, rue G Morel, BP 57, 49071 Beaucouzé cedex;
² Université d'Angers, France

(Reçu le 2 octobre 1992; accepté le 28 décembre 1992)

Résumé — *Pseudomonas syringae* pv *persicae*, bactérie pathogène du pêcher, a détruit plus d'un million d'arbres dans la Vallée du Rhône depuis son apparition (1966). Aucune variété n'est résistante à cette bactérie, mais un gradient de sensibilité variétale existe et les variétés se répartissent en trois classes de sensibilité. Trois années d'expérimentation au champ sont au minimum nécessaires pour déterminer le comportement de chacune des nouvelles obtentions variétales vis-à-vis de ce *Pseudomonas*. L'utilisation du vitroplant, pour cribler les variétés vis-à-vis de *P s* pv *persicae*, a donc été envisagée. Le vitroplant en croissance réagit de la même manière face à des clones bactériens d'agressivités différentes. Sur un clone d'amandier x pêcher, hybride interspécifique, sensible à cette bactérie, un traitement thermique des vitroplants a permis d'obtenir des réponses différenciées après inoculation de 2 clones bactériens, l'un agressif et l'autre non agressif. Il s'agit soit d'une exposition d'une heure à -4 °C, soit d'un séjour des vitroplants à 6 °C avec une photopériode inversée (6/18 heures). Sur 3 variétés de pêcher, chacune appartenant à l'une des 3 classes de sensibilité à *Ps* pv *persicae*, le même type de traitement thermique a été appliqué après inoculation des 2 clones bactériens. Un gradient de sensibilité, conforme à celui constaté en verger, a été obtenu sur vitroplants entre les 3 variétés testées. Ce test permet de discriminer les variétés et porte-greffes très sensibles des variétés et porte-greffes peu sensibles. En revanche il est plus difficile de situer les variétés et porte-greffes de sensibilité intermédiaire. Ce test permettrait de repérer très tôt les variétés qu'il ne faut pas planter dans la région concernée par la maladie. Le vitroplant pourrait être également utilisé pour mesurer l'agressivité des souches.

***Pseudomonas syringae* pv *persicae* = pêcher / sensibilité variétale / pouvoir pathogène / vitroplant**

Summary — Monitoring the susceptibility of peach cultivars to *Pseudomonas syringae* pv *persicae* using *in vitro* plants. *Pseudomonas syringae* pv *persicae*, causal agent of a bacterial dieback has destroyed more than 1 million peach in the Rhône Valley since it occurred for the first time in 1966. There is no resistant variety and all the cultivated varieties are distributed in 3 classes of susceptibility according to the results of a 3-yr field trial. Carrying out inoculation tests on *in vitro* plants has been considered. Experiments were performed with either a hybrid almond x peach line or with 3 peach varieties corresponding to each previously defined susceptibility class. Two bacterial clones differing in aggressiveness were used for inoculation. The inoculation of rapidly growing almond x peach *in vitro* plants did not lead to any significant differentiation of the 2 bacterial clones. When treated by exposure either to negative temperature (-4 °C) for 1 hr or to low temperature (6 °C) for the duration of the experiment in addition with an inverted photoperiod (6/18) the *in vitro* plants reacted according to the aggressiveness of the inoculated clones. Moreover, the 3 peach varieties demonstrated a differential susceptibility to the bacterial clones similar to that observed in field. The test which has been developed on *in vitro* plants appeared to be useful in differentiating varieties with high susceptibility from those with low susceptibility but not accurate enough for varieties with intermediate susceptibility. It could be used as a preliminary test, either to discard the most susceptible varieties before introduction into orchard or before the field trial. It could also be performed to determine the aggressiveness of strains.

***Pseudomonas syringae* pv *persicae* / peach / susceptibility / pathogenicity / *in vitro* plant**

* Correspondance et tirés à part

INTRODUCTION

Une maladie bactérienne nouvelle et particulièrement grave a été signalée en France (vallée du Rhône) en 1966 (Vigouroux, 1968, 1970). Elle a détruit plus d'un million d'arbres en 25 ans. La bactérie responsable est *Pseudomonas syringae* pv *persicae* (*P s* pv *persicae*) (Prunier *et al*, 1970).

Cette bactérie se caractérise par une phase épiphyte pendant la période végétative (Gardan *et al*, 1972). L'infection se développe essentiellement durant la période de repos hivernal (Prunier *et al*, 1973). La réussite de l'infection est fonction de la qualité et de la quantité de l'inoculum (Luisetti *et al*, 1973; Luisetti, 1983), du niveau de sensibilité de la plante au moment de la pénétration (Gardan *et al*, 1971; Prunier *et al*, 1973) et des conditions d'environnement (Vigouroux, 1979; Vigouroux et Huguet, 1980; Vigouroux *et al*, 1987).

Les méthodes de lutte et les techniques culturales proposées jusqu'à présent permettent de limiter l'extension de la maladie mais restent insuffisantes (Luisetti *et al*, 1992). Aucune variété n'est résistante (Luisetti *et al*, 1992). Parmi la gamme de variétés cultivées on constate cependant un large gradient de sensibilité (Gardan *et al*, 1971; Luisetti *et al*, 1984, 1992) et les variétés peuvent être réparties en 3 classes de sensibilité. Les arbres de variétés très sensibles ont une forte probabilité de mort rapide. Les arbres de variétés peu sensibles ou tolérantes peuvent développer quelques symptômes qui restent, en règle générale, peu graves et sans conséquence significative. Les arbres de variétés moyennement sensibles, de comportement intermédiaire, peuvent être parfois sévèrement touchés. Une lutte efficace contre cette maladie implique nécessairement l'implantation de variétés peu sensibles. La connaissance du comportement du matériel végétal vis-à-vis de *P s* pv *persicae* est donc un objectif essentiel chez cette espèce fruitière où existe un constant renouvellement variétal. C'est aussi un préalable à tout programme de création de variétés résistantes.

Trois années d'expérimentation en plein champ sont nécessaires pour connaître la sensibilité de pêcheurs à cette bactérie (Gardan *et al*, 1971). C'est long mais c'est un préalable indispensable à la mise sur le marché d'une nouvelle obtention variétale. Comme cela a été fait antérieurement sur plusieurs modèles conduits *in vitro* : agrumes – *Xanthomonas campestris* pv

citri (Lopez et Navarro, 1981) et poirier – *Erwinia amylovora* (Brisset *et al*, 1988), l'utilisation du vitroplant de pêcher a été envisagée pour réaliser un premier criblage de sensibilité des variétés de pêcher à *P s* pv *persicae*.

La culture *in vitro* des *Prunus*, en particulier la micropropagation du pêcher et de ses porte-greffes, est maintenant maîtrisée (Boxus et Quoirin, 1974; Carré *et al*, 1979; Zuccherelli, 1979; Navatel, 1980). La multiplication végétative *in vitro* des porte-greffes difficiles à multiplier par les techniques classiques, en particulier de l'amandier x pêcher (INRA GF 677), est actuellement généralisée par microbouturage (Martin, 1980; Navatel, 1982).

Par ailleurs, au cours de recherches antérieures, Luisetti (1983) a sélectionné, à partir d'une souche agressive de *P s* pv *persicae*, des clones agressifs et non agressifs sur la base de leur capacité à produire ou non une toxine. Nous avons utilisé ce matériel microbiologique de pouvoir pathogène différencié pour étudier la réponse des vitroplants d'amandier x pêcher et de pêcher à l'inoculation de cette bactérie et pour mettre en place un test de sensibilité bactérienne sur ce matériel végétal. Les conditions de culture appliquées aux vitroplants ont été modulées afin d'obtenir des réponses rapides et reproductibles mais surtout différenciées selon la sensibilité variétale et l'agressivité de la souche utilisée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les travaux ont été menés sur 2 types de matériel :

- des vitroplants d'un hybride interspécifique naturel, l'amandier x pêcher, clone INRA GF 677; le clone *in vitro* nous a été fourni par le laboratoire de recherche de physiologie végétale d'Angers; c'est un hybride de première génération, utilisé comme porte-greffe, d'une grande vigueur et très bien adapté aux terrains calcaires irrigables. Il est multiplié par voie végétative (Navatel, 1982). Il s'est révélé très sensible à *P s* pv *persicae* (Gardan *et al*, 1971) et donc intéressant pour notre étude;
- des vitroplants de 3 variétés de pêcher de sensibilité à *P s* pv *persicae* parfaitement connue : Redwing (très sensible), July Lady (moyennement sensible) et Redskin (peu sensible). Ces trois variétés ont été clonées selon la méthode suivante : les explants ont été prélevés à partir de rameaux cueillis durant une période de croissance des tiges; après désinfection, des segments de tige de 2 cm comportant un bourgeon, sont

mis en culture sur le milieu (mg.l^{-1}) KNO_3 , 1 800; NH_4NO_3 , 400; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 360; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1200; KH_2PO_4 , 270; Na_2EDTA , 37,3; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27,8; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1; ZnSO_4 , 8,6; H_3BO_3 , 6,2; KI 0,08; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,25; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; Biotine, 0,1; Thiamine HCl, 1; Ac nicotinique, 1; Pyridoxine HCl, 1; méso-inositol, 100; Glycine, 5; BAP, 0,4; AIB, 0,15; GA3, 0,10; Glucose, 30 000, Agar Agar, 6 000.

Les microboutures obtenues sont ensuite multipliées sur le même milieu, modifié au niveau des teneurs en Glycine (0,75), en BAP (0,75), en AIB (0,25) et en GA3 (0,25). A partir des touffes composées de 6 à 8 plantules de 0,5 à 2 cm de hauteur, chaque explant individualisé est mis dans un tube contenant 15 ml de milieu gélosé pour l'amandier x pêcher et 12 ml de milieu liquide avec support synthétique Milcap® (Challet Hérault, Nuailly 49) pour le pêcher. Le repiquage est réalisé en atmosphère stérile, sous une hotte à flux laminaire. Le milieu PAM (en mg.l^{-1} : NH_4NO_3 , 1 650; KNO_3 , 1 900; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 440; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 370; KH_2PO_4 , 170; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8,6; H_3BO_3 , 6,2; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 22,3; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,25; KI , 0,83; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,025; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,025; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 27,8; Na_2EDTA , $2\text{H}_2\text{O}$, 37,3; thiamine HCl, 0,4; méso-inositol, 100; GA_3 , 0,1; BAP, 1; AIB, 0,1; saccharose, 30000; agar agar, 7 000) pour l'amandier x pêcher et le milieu Murashige et Skoog (1962) modifié pour les teneurs en BAP (0,08) et AIB

(0,02) et la nature de la gibbérelline ($\text{GA}_4 + \text{GA}_{7,4}$) pour le pêcher, sont utilisés. Un séjour des vitroplants d'amandier x pêcher à 4 °C pendant quelques j ou un séjour prolongé sur un même milieu favorise l'allongement. Pour les vitroplants de pêcher, la combinaison d'acide gibbérellique et le support Milcap® favorisent l'allongement. Il a été nécessaire de sélectionner des vitroplants d'une taille ≥ 2 cm pour l'amandier x pêcher afin de pouvoir apprécier le développement de la nécrose. Les pêchers ont une taille de 5–8 cm. Pour l'amandier x pêcher, conduit sur milieu gélosé, seuls les vitroplants dont les racines ne sont pas ou peu développées sont utilisés, afin d'éviter la formation de lésions mécaniques à leur niveau, au moment de l'inoculation, le vitroplant étant retiré du tube quelques instants. Ces 2 contraintes ont pour effet de limiter le nombre de vitroplants disponibles pour chaque expérimentation et de réduire les dispositifs expérimentaux. En revanche, pour le pêcher, l'utilisation du support synthétique évite de provoquer des lésions, l'ensemble vitroplant et support étant retiré pour l'inoculation.

Avant l'inoculation, les vitroplants sont élevés en cellule de vitroculture sous thermopériode de 24°/19 °C et photopériode de 16/8 h. L'intensité lumineuse est de 3000 lux. Les traitements thermiques et les conditions d'incubation après l'inoculation sont indiqués dans le tableau I.

Tableau I. Conduite des vitroplants et observation des symptômes sur amandier x pêcher INRA GF 677 et sur pêcher (3 variétés).

Essai	Milieu/Traitements des vitroplants après inoc Photopériode	Premiers symptômes		Symptômes à 30 j		
		235	239	235	239	
1	PAM ^a depuis 2 semaines 24°/19 °C, 16/8 h	GF ^b	8 j	30 j	Léger brunissement	
2	PAM depuis 20 semaines 24°/19 °C, 16/8 h	GF :	8 j	NAc	Nécrose autour de la blessure	Pas de symptôme
3	PAM depuis 12 semaines Séjour à - 4°C, 4 jours après puis 24°/19 °C, 16/8 h	GF :	8 j	15 j	Nécrose totale du vitroplant	Nécrose 5 mm
4	PAM depuis 12 semaines 6 °C, 8/16 h	GF :	9 j	30 j	Nécrose 2,5 mm	Léger brunissement
5	MS modifié ^d depuis 3 semaines 6 °C, 16/8 h	RW ^b :	22 j	22 j	Nécrose partielle ou totale du vitroplant ^e	
		JL ^b :	22 j	30 j		
		RK ^b :	22 j	30 j		
6	MS modifié depuis 3 semaines séjour à - 3 °C, 4 jours après inoculation, 6 °C, 16/8 h	RW :	15 j	22 j	Nécrose partielle ou totale du vitroplant ^e	
		JL :	22 j	30 j		
		RK :	22 j	NA		

^a PAM : milieu amandier x pêcher; ^b GF : GF 677; RW : Redwing; JL : July Lady; RK : Redskin; ^c NA : symptôme non apparu; ^d MS modifié : milieu pêcher; ^e Ce sont les fréquences de vitroplants plus ou moins nécrosés qui différencient les clones et les variétés (fig 2).

Matériel microbiologique

Deux espèces bactériennes phytopathogènes (*P s pv persicae* et *P s pv syringae*) et 2 espèces bactériennes saprophytes (*Erwinia herbicola* et *Pseudomonas fluorescens*) sont inoculées en comparaison, au cours d'un essai préliminaire.

Par la suite, toutes les inoculations sont réalisées avec 2 clones bactériens, l'un toxigène et agressif (235), l'autre atoxigène et non agressif (239), obtenus, selon la méthode décrite par Luisetti (1983), à partir d'une culture de la souche de *P s pv persicae* INRA M 24 Sm', mutant spontané sélectionné pour la résistance à la streptomycine; il a été montré chez *P s pv persicae* une relation étroite entre toxinogénèse et agressivité (Luisetti, 1983). Ces clones sont conservés par congélation dans de l'eau distillée stérile, à raison de 1 ml par cryotube. Au moment de l'utilisation, les bactéries sont décongelées etensemencées sur milieu LPGA (en g.l⁻¹: Extrait de levure, 8; biogélytone, 8; glucose, 7; agar agar, 15; pH 7) additionné de streptomycine (50 mg.l⁻¹, Sygma). Les boîtes de Petri sont mises en incubation à 16 °C durant 60 h.

Méthodes

La bactérie pénétrant dans les tissus du pêcher par l'intermédiaire soit de blessures (plaies de taille), soit des plaies pétiolaires (Prunier *et al*, 1970), c'est la première voie de pénétration qui a été utilisée sur vitroplant. La blessure est obtenue par une incision de la tige faite à l'aide d'un scalpel. Pour dégager la blessure et faciliter le dépôt d'inoculum, quelques feuilles sont éliminées autour de l'incision. Il est nécessaire d'être vigilant lors du dépôt de l'inoculum sur la blessure afin de ne pas infecter les plaies au niveau des pétioles coupés. Pour réaliser cette opération, le vitroplant doit être retiré du tube durant une trentaine de secondes. Ce travail est accompli stérilement, sous une hotte à flux laminaire. Le vitroplant inoculé est ensuite réintroduit dans son tube. L'inoculation des vitroplants est réalisée à partir d'une suspension dosée à 1–5 x 10⁸ bactéries par ml et préparée dans de l'eau distillée stérile. Vingt microlitres de suspension bactérienne sont déposés, à l'aide d'une micropipette, sur chaque blessure, ce qui introduit de 3 à 5 x 10⁶ germes par blessure (estimation réalisée dans les 2 h suivant l'inoculation). Au cours de l'essai préliminaire, réalisé sur l'hybride amandier x pêcher, en plus des vitroplants inoculés avec chacune des 4 souches, des vitroplants témoins, maintenus sur le même milieu depuis 4 semaines, ont été blessés selon la même méthode et une microgoutte d'eau distillée stérile a été déposée sur les blessures.

Le premier essai est réalisé sur des vitroplants d'amandier x pêcher récemment repiqués (depuis 2 semaines) sur milieu PAM. Pour les essais suivants réalisés sur amandier x pêcher, une modification de l'état physiologique du vitroplant est recherchée pour

tenir compte de la caractéristique de la maladie qui se développe essentiellement pendant le repos végétatif de l'arbre (Vigouroux, 1970; Prunier *et al*, 1973). On a d'abord cherché à limiter la nutrition du vitroplant en le maintenant sur le même milieu durant une longue période (20 semaines). Puis on a associé à ce type de traitement (12 semaines sur le même milieu) soit un choc thermique (1 h à –4 °C) appliqué 4 j après l'inoculation, soit une incubation à une température froide (6 °C) sous une photopériode inversée (6/18 h).

Dans le cas des 3 variétés de pêcher, la méthodologie est légèrement modifiée. Les vitroplants, maintenus sur le même milieu pendant 3 à 4 semaines, sont placés pendant 4 j après l'inoculation, sous une thermopériode de 24/19 °C et une photopériode 16/8 h; par la suite, ils sont transférés à une température de 6 °C. Dans une seconde expérience, un choc thermique (–3 °C pendant 1 h), placé avant le transfert à la température de 6 °C, est introduit dans la séquence des traitements. Le choc thermique est obtenu dans une chambre froide dans laquelle on a provoqué un gel artificiel de type convectif tel que l'ont décrit Flura *et al* (1991); l'abaissement de la température est linéaire, de l'ordre de 2 °C/h, avec un plateau d'1 h à la température retenue (–4 °C pour l'amandier x pêcher et –3 °C pour le pêcher); la température remonte ensuite à raison de 5 °C/h.

Pour chacun des 2 clones bactériens (235 et 239), le nombre de vitroplants à inoculer est déterminé de manière à ce qu'à chaque contrôle des populations, 8 vitroplants puissent être analysés.

Observations et analyses

Les vitroplants sont régulièrement observés pendant une période de 30 j après inoculation et les symptômes sont décrits. La fréquence des contrôles est variable pour les vitroplants d'amandier x pêcher selon les essais; les nécroses sur tiges sont mesurées individuellement.

Pour le pêcher et pour les 2 essais, les observations sont faites 1, 4, 8, 15, 22 et 30 j après l'inoculation. Les notations au 30^e j sont basées sur une répartition des dégâts en 3 classes : (0) pas de symptôme, (1) nécrose limitée autour de la blessure d'inoculation (type 1), (2) nécrose étendue entraînant le dessèchement de la tige (type 2).

A chaque examen, la population bactérienne présente dans les tissus est estimée : chacun des 8 vitroplants est broyé séparément pendant 10 s, sous conditions aseptiques et dans 5 ml d'eau distillée stérile à l'aide d'un broyeur homogénéiseur UltraTurrax®. Une aliquote de ce broyat (50 µl) et de chacune des 3 premières dilutions est ensuite étalée sur plaque gélosée de milieu LPGA dans lequel on a incorporé une fongicide à raison de 50 mg.l⁻¹ (cycloheximide, Sygma) et de la streptomycine à raison de 50 mg.l⁻¹ (Sygma); 3 boîtes par dilution sont ensemencées, elles sont mises en incubation à 16°C pendant 60 h.

L'activité toxigène des clones est vérifiée avant inoculation au travers de la mise en évidence de l'inhibition de la croissance *in vitro* d'une souche de *Bacillus* sp (souche INRA B6). Pour chaque clone bactérien, 64–96 colonies sont prélevées au hasard sur les boîtes de Petri qui ont servi au dénombrement, et déposée individuellement sur une plaque gélosée de milieu LPGA, préalablement ensemencée par une nappe de *Bacillus* sp. Après 48 heures d'incubation à 16 °C, on note la présence d'une zone d'inhibition de croissance du *Bacillus* sp autour de chaque isolat de *P s pv persicae* (Luisetti, 1983).

RÉSULTATS

Réponse de l'amandier x pêcher à l'inoculation de bactéries phytopathogènes ou saprophytes

Seuls les vitroplants inoculés avec des espèces phytopathogènes, *P s pv syringae* ou *P s pv persicae*, présentent des nécroses autour de la blessure alors que les vitroplants inoculés avec de l'eau stérile ou avec une espèce saprophyte, *P fluorescens* ou *E herbicola*, ne montrent aucun symptôme.

Réponse de l'amandier x pêcher à l'inoculation de *P s pv persicae*

Vitroplants en croissance (essai 1)

Les symptômes obtenus restent limités à de légers brunissements qui apparaissent autour des blessures; ces manifestations sont visibles plus tôt sur les vitroplants inoculés avec le clone 235 (tableau I).

La dynamique des populations *in vitro* est identique pour les 2 clones : elle est caractérisée par une chute dès le 1^{er} jour d'incubation, puis par une augmentation rapide au cours des 7 jours suivants, permettant d'atteindre une teneur en bactéries supérieure à 10⁶ par plant; par la suite la croissance reste plus limitée (fig 1).

Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement (essai 2)

Huit jours après l'inoculation, les premiers brunissements apparaissent, autour des blessures sur les tiges inoculées avec le clone 235. Par la

suite, les brunissements évoluent en nécroses; la partie apicale de la tige se dessèche alors. En revanche, aucun symptôme n'apparaît sur les plants inoculés avec le clone 239 (tableau I).

Cette différence de comportement des 2 clones bactériens se manifeste aussi au niveau de la dynamique des populations *in vivo*. Après une baisse, intervenant le premier jour et commune aux 2 clones, la population du clone 235 augmente rapidement pour atteindre au 8^e j un niveau > 10⁶ bactéries/plant; cette croissance se poursuit encore par la suite mais à un taux nettement plus faible; en revanche pour le clone 239, à une phase de croissance limitée qui permet à peine de dépasser 10³ bactéries/plant succède une phase de régression de la population qui, après 30 j d'incubation compte moins de 10² cellules par vitroplant (fig 1).

Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement et subissant un choc thermique (essai 3)

Au cours du choc thermique à – 2 °C, subi par les vitroplants 4 j après inoculation, il n'y a pas de prise en glace dans les tissus car *P s pv persicae* n'est apte à provoquer la rupture de surfusion qu'à partir de –5 °C (Paulin et Luisetti, 1978). Une nécrose de la tige est visible après 8 j (clone 235) ou 15 j (clone 239) d'incubation. Par la suite, le clone 235 entraîne la nécrose totale de la tige de plusieurs vitroplants alors que le clone 239 provoque une nécrose limitée à 5 mm en moyenne autour de la blessure, mais cependant, au-dessus de la nécrose les feuilles jaunissent et se dessèchent. A 30 j, l'intensité des symptômes est plus importante que lors des essais précédents et la différence entre les 2 clones bactériens est bien marquée. En particulier, les feuilles de vitroplants inoculés avec le clone 235 présentent des taches nombreuses dont l'origine est bactérienne comme le confirme l'isolement, alors que ce phénomène n'est pas observé sur les feuilles des vitroplants inoculés avec le clone 239 (tableau I).

L'analyse de la dynamique des populations *in vivo* des 2 clones confirme la différence de comportement; en effet, si l'évolution générale est la même, caractérisée par une succession de 3 phases : baisse des populations, croissance accélérée puis stabilisation; un écart significatif d'une unité logarithmique est constaté en faveur du clone 235 entre les niveaux des populations à l'issue de l'essai (fig 1).

Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement et soumis à une température basse et une photopériode inversée (essai 4)

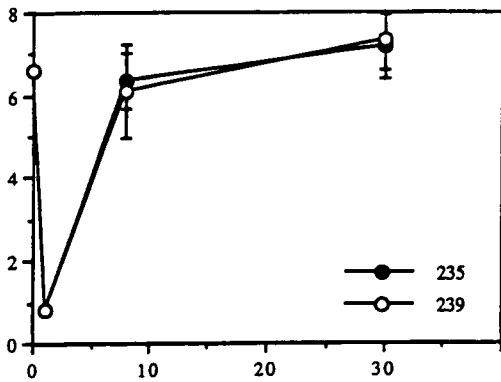
Une évolution différente des symptômes est observée selon le clone bactérien inoculé. Pour le clone 235, un brunissement des tissus apparaît autour de la blessure dès le 9^e j et après 30 j, la nécrose atteint 2,5 mm en moyenne. Pour le clone 239, les symptômes ne sont visibles qu'à 30 j et restent limités à un simple brunissement autour de la blessure (tableau I).

Les 3 phases précédemment décrites de la dynamique des populations *in vivo* sont toujours observées; la baisse initiale reste limitée mais cependant plus marquée pour le clone 239; par la suite, l'écart de niveau entre les clones s'estompe progressivement (fig 1).

Réponse du pêcher à l'inoculation de *P s pv persicae*

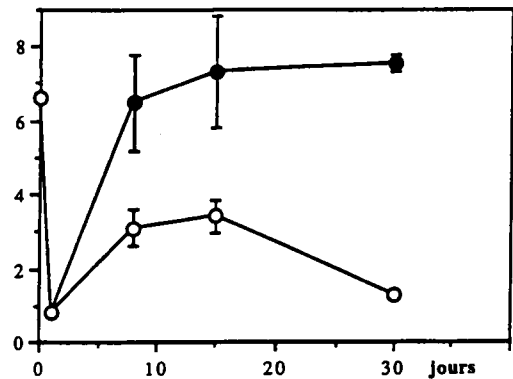
Vitroplants des variétés Redwing, July Lady et Redskin soumis à une température basse (essai 5)

Dans les conditions spécifiques de cet essai, les premiers symptômes n'apparaissent sur les 3 variétés qu'après 22 j d'incubation. Pour le clone bactérien 235, on observe alors 25% de nécroses de type 1 sur la variété Redwing, 13% sur la variété July Lady et 13% sur la variété Redskin; en revanche, le clone bactérien 239 ne provoque que des nécroses limitées et sur une faible fraction (6%) des vitroplants de la variété Redwing. A l'issue de l'essai (30 j) on observe entre les 2 clones bactériens inoculés et entre

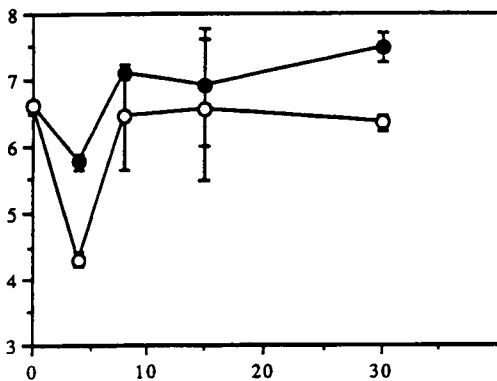


I : intervalle de confiance

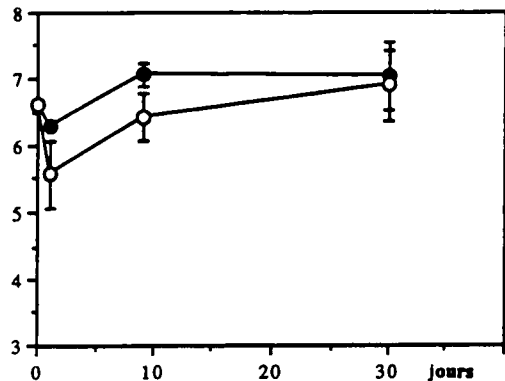
Essai 1 - Vitroplants en croissance, 24°/19°C, 16/8 h



Essai 2 - Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement, 24°/19°C, 16/8 h



Essai 3 - Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement et subissant un choc thermique (- 4°C durant 1 heure) et séjour à 24°/19°C, 16/8 h



Essai 4 - Vitroplants sur milieu en cours d'épuisement et soumis à une température basse (6°C) et à une photopériode inversée (8/16 h)

Fig 1. Dynamique des 2 clones de *P s pv persicae* sur vitroplants d'amandier x pêcher INRA GF 677 en fonction des conditions expérimentales.

les 3 variétés de sensibilité différente, un net gradient des dégâts (fig 2). La variété Redwing est très touchée, 75% des vitroplants inoculés avec le clone 235 présentant des nécroses, dont 25% de type 2 avec dessèchement de la tige; en revanche, seulement 33% des vitroplants de la variété Redskin montrent des nécroses qui restent limitées (type 1).

La différence d'agressivité des 2 clones est confirmée : 48% des vitroplants, toutes variétés confondues, inoculés avec le clone 235 et seulement 22% de ceux inoculés avec le clone 239 expriment des symptômes.

Dans les conditions de cet essai, la dynamique des populations ne semble être influencée ni par l'agressivité du clone inoculé ni par la variété support. La dynamique des 2 clones bactériens dans les tissus est du même type pour les 3 variétés. La multiplication est importante puisqu'elle atteint et se stabilise, au 15^e jour, à une moyenne de 10⁹ bactéries par plant (fig 3).

Vitroplants des variétés Redwing, July Lady et Redskin soumis à une température basse et à un choc thermique (essai 6)

Quinze jours après l'inoculation, les premiers symptômes sont visibles sur 12,5% des vitroplants de la variété Redwing. Au 22^e j, des différences entre les 3 variétés et les 2 clones bactériens sont observées : dans le cas d'inoculation avec le clone 235, 46% des vitroplants de la variété Redwing présentent des nécroses, à la fois de type 1 et de type 2 et 15% des vitroplants de la variété July Lady ou Redskin, des nécroses de type 1; le clone 239 n'a entraîné des nécroses, li-

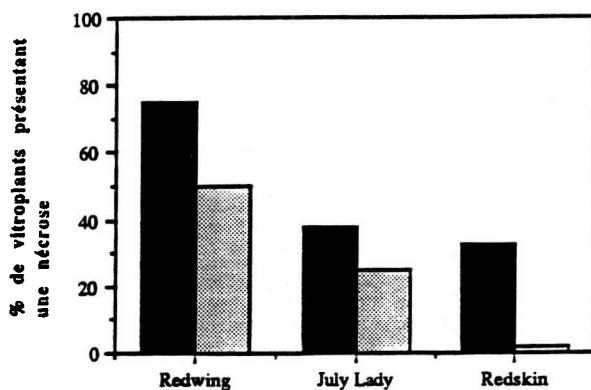
mitées, que sur 25% des vitroplants de la variété Redwing. A l'issue de l'essai, le gradient de sensibilité variétale est confirmée, la fréquence de vitroplants nécrosés passant de 87% pour la variété Redwing, à 43% pour la variété July Lady, et à 29% pour la variété Redskin (inoculation avec le clone 235); on retrouve aussi la différence d'agressivité entre les clones : 53% et 26% de vitroplants sont nécrosés lorsqu'inoculés respectivement avec 235 et 239 (toutes variétés confondues) (fig 2).

DISCUSSION

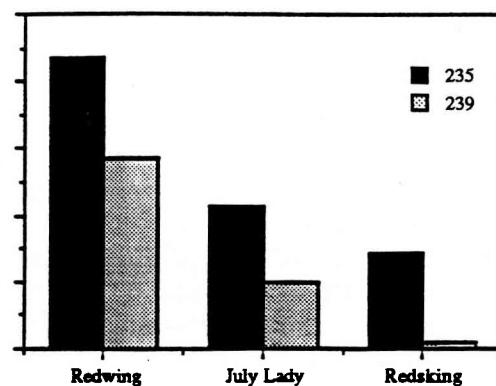
Le premier essai a permis de confirmer que seules des bactéries phytopathogènes (*P s pv syringae* et *P s pv persicae*) peuvent engendrer des lésions sur vitroplants de l'hybride interspécifique amandier x pêcher. Ce premier résultat était essentiel pour la poursuite des travaux sur ce matériel végétal.

Les essais suivants permettent de distinguer 3 types de réponses du vitroplant d'amandier x pêcher inoculé avec *P s pv persicae* (comparaison d'un clone agressif 235 et d'un clone non agressif 239) en fonction des conditions de milieu et d'environnement :

– le vitroplant sur milieu riche (installé sur milieu PAM depuis 4 semaines ou moins), donne une réponse non différenciée selon le clone bactérien inoculé; les symptômes sont limités à de légers brunissements sur tige autour de la blessure, malgré une multiplication intense des bactéries; l'absence de symptômes sur vitroplants d'amandier x pêcher maintenus sur milieu



Essai 5 : Vitroplants soumis à une température basse (6°C) et à une photopériode inversée (8/16 h)



Essai 6 : Vitroplants soumis à une température basse (6°C), à une photopériode inversée (8/16 h) et à un choc thermique (-3°C durant 1 heure)

Fig 2. Distribution des dégâts sur vitroplants de pêcher après 30 jours, en fonction de la variété, du clone bactérien inoculé et des conditions expérimentales.

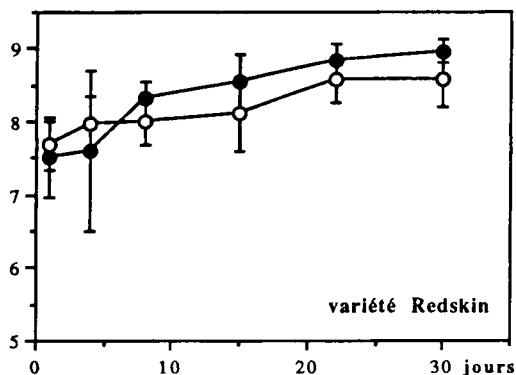
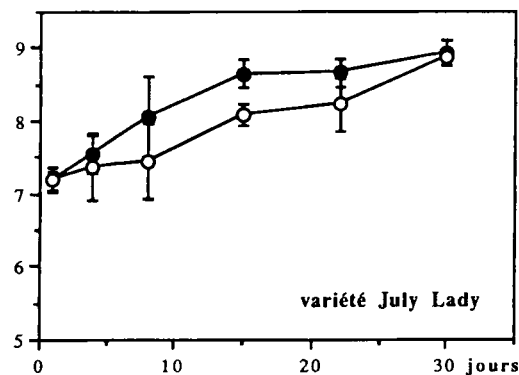
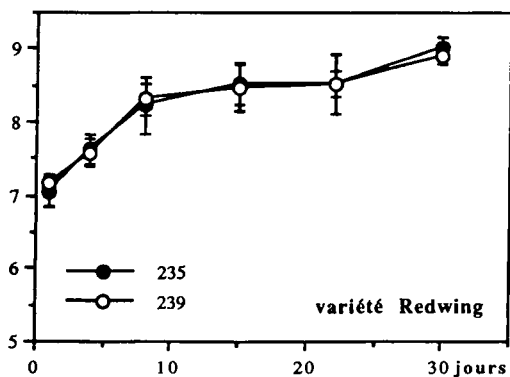


Fig 3. Dynamique de 2 clones de *P s pv persicae* sur vitroplants de pêcher (essai 5) appartenant à 3 variétés différentes.

riche, donc en plein développement, doit être mis en parallèle avec ce qui peut être observé en verger; cette maladie ne se développe que durant le repos hivernal de l'arbre (Prunier *et al*, 1973) et l'inoculation pendant la période de végétation de toute souche, agressive ou non, conduit à la formation d'une nécrose de dimension limitée et non évolutive; un constat similaire a été fait par Crosse (1966) en ce qui concerne des souches du pathovar *syringae* inoculées à des arbres fruitiers en période d'activité végétative; la formation d'une nécrose limitée, atypique, peut être assimilée à une réaction de défense de la plante, de type hypersensibilité (Klement, 1963) ou non;

– sur vitroplant maintenu sur le même milieu pendant 20 semaines, on note des différences nettes de la dynamique des populations dans les tissus et d'intensité des symptômes. On peut supposer que le milieu de culture s'est appauvri en substances nutritives, ce qui a pu entraîner une modification de l'état physiologique des vitroplants et une réponse différenciée tant au niveau des dégâts que de la dynamique des populations bactériennes *in vivo*. On constate en effet une évolution spécifique de chaque clone bactérien, l'une caractéristique d'une infection consécutive à l'inoculation d'une souche agressive sur un hôte homologue, et l'autre s'apparentant plutôt à une réaction de défense consécutive à l'inoculation d'une souche non agressive ou défi-

ciente. C'est aussi ce que constatent Hevesi *et al* (1978) après inoculation de *P fluorescens* sur tabac.

L'appauvrissement du milieu peut conduire également à une acidification qui n'a pas été mesurée, ce qui pourrait être relié aux observations faites par Vigouroux et Huguet (1980) qui ont constaté que la sensibilité du pêcher à *P s pv persicae* était accrue dans des sols acides et maigres.

– le vitroplant, maintenu sur un milieu en cours d'épuisement et soumis à différents traitements thermiques (choc thermique ou basse température associée à une photopériode inversée) réagit de manière différenciée à l'inoculation des 2 clones bactériens. Les dégâts apparaissent plus tôt et sont plus importants à 30 j avec le clone 235 (nécrose totale du vitroplant au-dessus de la blessure) qu'avec le clone 239; l'intensité des dégâts est aussi plus élevée chez les vitroplants ayant subi un choc thermique; le clone 239 manifeste une difficulté d'installation dans le tissu; en revanche, le clone 235 se multiplie rapidement, dès le premier jour et nettement après le choc thermique ou l'installation en basse température; la dynamique du clone 239 dans les tissus, l'apparition de nécroses limitées mais certes significatives pour ce clone bactérien sont analogues aux observations faites sur pêcher par Luisetti (1983), pour qui ce type de réaction s'apparente à une réaction d'hypersensibilité.

L'appauvrissement, le choc thermique et l'exposition à une température basse, séparément ou en association, entraînent un changement physiologique au niveau du vitroplant et une interaction différente avec la bactérie, ce qui se concrétise par des réponses différenciées au niveau des symptômes. Cette réponse du vitroplant est plus conforme à celle du pêcher en hiver.

Les essais réalisés sur vitroplants de pêcher conduisent à des conclusions voisines. Les observations faites sur le vitroplant de pêcher correspondent, au niveau des symptômes et pour les 2 clones bactériens, à celles faites sur vitroplant d'amandier x pêcher conduit dans les mêmes conditions de température. Le choc thermique et le séjour à une température basse entraînent, pour les 3 variétés, Redwing, July Lady et Redskin, une réponse différenciée au niveau des symptômes avec un gradient entre les 3 variétés pour chacun des clones 235 et 239. Un décalage dans l'apparition des symptômes entre les 3 variétés et entre les 2 clones bactériens est également mis en évidence. La dynamique dans les tissus n'est cependant pas différente entre les 2 clones bactériens. Ces résultats vont cependant dans le même sens que ceux observés en verger par Gardan *et al* (1971) qui ont classé ces 3 variétés dans les 3 catégories de sensibilité différente.

Pour analyser l'effet du choc thermique (exposition pendant 1 h à -4°C), il est intéressant de comparer l'évolution des populations entre les essais 2 et 3. Les niveaux de population atteints sur amandier x pêcher avec le clone 235 sont, dans les 2 cas, identiques. En revanche, pour le clone 239, les niveaux sont supérieurs, à 8 et à 15 j, pour les vitroplants d'amandier x pêcher ayant subi un choc thermique. Un niveau des populations plus élevé pour les plants ayant subi un choc thermique à -4°C persiste à 30 j. Deux hypothèses pourraient être émises sur l'action du froid. La première privilégierait une augmentation de la vitesse de multiplication *in vivo*, ce qui est vérifié pour le clone 239 dont le taux global de multiplication est nettement plus élevé sur des vitroplants ayant subi un choc thermique que sur ceux ayant subi tout autre traitement, mais non pour le clone 235 dont le taux de multiplication ne paraît pas être influencé par un traitement thermique. En revanche, pour un même niveau de population atteint après inoculation du clone 235, l'intensité des dégâts observés sur des vitroplants amandier x pêcher soumis à un refroidissement est significativement plus élevée. La se-

conde hypothèse, d'une sensibilité plus grande des tissus, paraît donc plus probable. Sur les pêchers de la variété Redwing, inoculés avec le clone 235 et ayant subi un choc d'1 h à -3°C , les dégâts apparaissent plus tôt et sont plus importants que sur les vitroplants de la même variété n'ayant pas subi de séjour à -3°C . Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Luisetti (1983) sur des arbres adultes en verger; il obtient en hiver des nécroses d'une longueur finale moyenne de 63 mm pour le clone 235 et de 12 mm pour le clone 239. Vigouroux (1974, 1979, 1989, 1991), a constaté sur pêcher que le refroidissement entraînait des modifications, tant physiques (congestion en eau des tissus) que biochimiques, favorables au développement de l'infection due à *P s pv persicae*. Le même phénomène a été constaté avec *P s pv syringae* sur pêcher (Weaver, 1978) et sur abricotier (Klement *et al*, 1974; Vigouroux, 1989). Des modifications de ce type pourraient favoriser la diffusion de la toxine du clone 235 et occasionner ainsi des dégâts importants. Cette interprétation rejoint celle de Williams et Keen (1967) qui soulignent le rôle du froid dans la diffusion de toxines bactériennes produits par *P s pv lachrymans* sur concombre.

Une variabilité importante du niveau des populations apparaît dans certains des essais, et bien qu'il s'agisse d'une multiplication clonale tant pour le vitroplant que pour la bactérie, elle peut être due, soit à un effet plante, soit à un effet inoculation. Dans les deux cas il faudra prendre en compte cette variabilité dans la mise en place des dispositifs expérimentaux ultérieurs.

L'inoculation de 2 clones bactériens, l'un agressif et l'autre non agressif, sur 3 variétés appartenant aux 3 classes de sensibilité à *P s pv persicae*, a permis d'obtenir, sous certaines conditions de culture, des réponses différenciant aisément la variété peu sensible de la variété très sensible. En revanche, il apparaît difficile de situer les variétés de sensibilité intermédiaire. Du fait de la petite taille des vitroplants, une réponse intermédiaire obtenue avec une variété moyennement sensible est difficile à apprécier sur ce type de matériel. L'ensemble de ces résultats confirme que le vitroplant paraît être un bon outil pour trier à la fois le matériel microbologique (agressif, non agressif) et le matériel végétal (très sensible et peu sensible).

Il ne permet cependant de trier que les variétés et porte-greffes très sensibles et les variétés et porte-greffes peu sensibles à *P s pv persicae*,

et est réservé aux seuls variétés et porte-greffes dont on maîtrise la culture *in vitro*. Il peut être utilisé comme test préliminaire à l'essai de plein champ. Un tel test permettrait de réaliser un tri précoce comme le suggère Dunez (1990) et serait particulièrement utile lors de l'arrivée sur le marché de nouvelles variétés de pêcher aux qualités agronomiques et de production intéressantes, et par là, promises à un développement rapide. Les améliorateurs de cette espèce fruitière ne prenant pas encore en compte dans leur programme de recherche la sensibilité à cette maladie, l'indication donnée par un test permettrait d'estimer le risque généré par une implantation massive de toute nouvelle variété, en particulier dans la région contaminée par cette bactérie. La non maîtrise de la multiplication *in vitro* de toutes les variétés de pêcher, et la difficulté d'obtenir des vitroplants avec des tiges bien développées constituent cependant une limite technique importante.

CONCLUSION

Au terme de cette série d'essais concernant l'étude du pouvoir pathogène de *P s pv persicae* (souche agressive et souche non agressive) sur pêcher (ou hybride interspécifique amandier x pêcher), le vitroplant apparaît comme un outil particulièrement intéressant. Il réagit parfaitement aux conditions de milieu. On a pu simuler des situations de croissance active entraînant la résistance des tissus à des infections bactériennes (comme le pêcher en croissance) ou de traumatismes divers conduisant au développement de lésions (comme le pêcher pendant la période de repos végétatif). Ces résultats laissent augurer de l'utilisation du vitroplant de pêcher pour la poursuite d'études approfondies dans le domaine des relations hôte/parasite, ou dans le domaine de la sélection variétale. Il présente par exemple, un intérêt certain pour mener des expérimentations avec des microorganismes génétiquement modifiés, tout risque de dissémination étant alors maîtrisé.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration du laboratoire de recherches de physiologie végétale d'Angers, qui a fourni les têtes de clones et le milieu de culture de l'amandier x pêcher et avec l'aide d'Imad Dandal,

étudiant, qui a participé aux travaux sur vitroplants de pêcher. Les auteurs remercient M Bozzini pour la mise en forme de cet article.

RÉFÉRENCES

- Boxus P, Quoirin M (1974) La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*. *Bull Soc Roy Bot Belg* 107, 91-101
- Brisset MN, Paulin JP, Duron M (1988) Feasibility of rating fire blight susceptibility of pears (*Pyrus communis*) cultivars on *in vitro* microcuttings. *Agronomie* 8, 707-710
- Carré M, Martin Tanguy J, Mussillon P, Martin C (1979) La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in vitro* au service de la pépinière. *Bull Petits Fruits* 14, 8-65
- Crosse JE (1966) Epidemiological relations of the pseudomonad pathogens of deciduous fruit trees. *Annu Rev Phytopathol* 4, 291-310
- Dunez J (1990) Apport de la culture *in vitro* à la pathologie végétale. In: *Les Colloques de l'INRA. Cinquantenaire de la culture in vitro* 51, 127-139. INRA (ed) Versailles, Oct 1989
- Flura D, Itier B, Brun O, Durand B, Masson S (1991) Mise au point de chambres de refroidissement pour l'étude de la gélimité des bourgeons. Application au cas de la vigne. *Agronomie* 11, 383-386
- Gardan L, Luisetti J, Prunier JP (1971) Premiers résultats sur la sensibilité variétale du Pêcher au dépérissement bactérien (*Pseudomonas morsprunorum* f sp *persicae*). *CR Acad Agric Fr séance* 6/10/71, 1090/1094
- Gardan L, Luisetti J, Prunier JP (1972) Variation in inoculum level of *Pseudomonas morsprunorum persicae* on leaf surface of peach trees. *Proc 3rd Int Conf Plant Path Bact* 87-94. Wageningen 1971
- Hevesi M, Rivera N, Garcia A (1978) *Pseudomonas fluorescens* as pathogen on pepper plants. *Proc 4th Int Conf Plant Path Bact* 711-716. Angers 1978
- Klement Z (1963) Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* 199, 299-300
- Klement Z, Rozsnyay S, Arsenijevic M (1974) II. Relationship of winter frost and the bacterial canker and dieback of apricots. *Acta Phytopathol Acad Sci Hung* 9, 35-45
- Lopez MM, Navarro L (1981) A new *in vitro* inoculation method for *Citrus* canker diagnosis. *Proc Int Soc Citriculture* 1, 399-402
- Luisetti J (1983) Quelques aspects de la variabilité de *Pseudomonas persicae*, agent du dépérissement bactérien du Pêcher. *CR 3e Coll Rech Fruit* 187-200. Bordeaux 1983
- Luisetti J, Gardan L, Prunier JP (1973) Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. VI. Étude du pouvoir pathogène de *P morsprunorum* f sp *persicae*.

- Influence de la dose d'inoculum. *Ann Phytopathol* 5, 347-353
- Luisetti J, Gaignard JL, Pacqueteau B, Lafuste JP (1984) Le dépérissement bactérien du Pêcher. *Phytoma* 358, 29-32
- Luisetti J, Gaignard JL, Vigouroux A, Sanier R, Lafuste JP, Charras J (1992) Pêcher, dépérissement bactérien. *Arbor Fruit* 447, 19-28
- Martin C (1980) La multiplication végétative *in vitro* : une technique de pointe au service de l'agriculture. *CR Séance Acad Agric Fr* 66, 629-637
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Physiol Plant* 15, 473-497
- Navatel JC (1980) L'utilisation des cultures *in vitro* pour la multiplication de quelques espèces légumières et fruitières. *CR Acad Agric Fr* 66, 681-691
- Navatel JC (1982) Problèmes liés à la production de porte-greffes d'arbres fruitiers par la multiplication *in vitro*. *Fruits* 37, 331-336
- Paulin JP, Luisetti J (1978) Ice nucleation activity among phytopathogenic bacteria. *Proc 4th Int Conf Plant Pathol Bact* 725-731. Angers 1978
- Prunier JP, Luisetti J, Gardan L (1970) Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. II. Caractérisation d'un *Pseudomonas* non-fluorescent, agent d'une bactériose nouvelle du Pêcher. *Ann Phytopathol* 2, 181-197
- Prunier JP, Luisetti J, Gardan L (1973) Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. V. Étude du pouvoir pathogène de *Pseudomonas mors-prunorum* f sp *persicae*, agent du dépérissement bactérien du pêcher. Méthodologie : premiers résultats sur l'influence de la date d'inoculation. *Ann Phytopathol* 5, 327-346
- Vigouroux A (1968) Premières observations sur une nouvelle bactériose chez le Pêcher. *CR Séances Acad Agric Fr* 54, 1021-1026
- Vigouroux A (1970) Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. A. Une nouvelle bactériose du Pêcher : description, étiologie, développement du parasite. *Ann Phytopathol* 2, 155-179
- Vigouroux A (1974) Obtention de symptômes de bactériose du Pêcher (*Pseudomonas morsprunorum* f sp *persicae*) sur rameaux de Pêcher détachés et conservés en survie. Effet du froid. *Ann Phytopathol* 6, 95-98
- Vigouroux A (1979) Incidence des basses températures sur la sensibilité du Pêcher au dépérissement Bactérien. *Ann Phytopathol* 11, 231-239
- Vigouroux A (1989) Ingress and spread of *Pseudomonas* in stems of peach and apricot promoted by frost-related water-soaking of tissues. *Plant Dis* 73, 854-855
- Vigouroux A (1991) Mechanism of cold-induced peach infection by *Pseudomonas syringae* pv *persicae*: water congestion in tissues. *J Phytopathol* 132, 139-145
- Vigouroux A, Huguet C (1980) Prédilection du Pêcher au dépérissement bactérien sur sols d'arène et de diluvion. *Ann Phytopathol* 12, 312
- Vigouroux A, Berger F, Bussi C (1987) La sensibilité du pêcher au dépérissement bactérien en France : incidence de certaines caractéristiques du sol et de l'irrigation. Relations avec la nutrition. *Agronomie* 7, 483-495
- Weaver DJ (1978) Interaction of *Pseudomonas syringae* and freezing in bacterial canker on excised peach twigs. *Phytopathology* 68, 1460-1463
- Williams PH, Keen NT (1967) Relations of cell permeability alteration to water congestion in cucumber angular leaf spot. *Phytopathology* 57, 1378-1385
- Zuccherelli G (1979) Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco. *Frutticoltura* 9, 2, 15-20