



**HAL**  
open science

# Identification des souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* par inoculation de cals de racine de *Malus domestica*, cv. "Golden Delicious"

Jean-Pierre Paulin, Michel Duron

## ► To cite this version:

Jean-Pierre Paulin, Michel Duron. Identification des souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* par inoculation de cals de racine de *Malus domestica*, cv. "Golden Delicious". *Agronomie*, 1986, 6 (9), pp.869-872. <hal-00884948>

**HAL Id: hal-00884948**

**<https://hal.science/hal-00884948v1>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

# Identification des souches pathogènes d'*Erwinia amylovora* par inoculation de cals de racine de *Malus domestica*, cv. « Golden Delicious »

Jean-Pierre PAULIN & Michel DURON (\*)

I.N.R.A., Station de Pathologie végétale

(\*) Station d'Amélioration des Plantes, Centre de Recherches d'Angers, F 49000 Angers

## RÉSUMÉ

La bactérie *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien des *Pomoïdeae*, a été inoculée sur cals de racine de pommier (cv. « Golden Delicious »). Le résultat de cette inoculation est la production de gouttes d'exsudat caractéristiques de la maladie. Cette réponse, qui n'est obtenue qu'avec la forme virulente du pathogène, est spécifique : sous réserve de respecter certaines conditions expérimentales (en particulier taux d'inoculum inférieur à  $10^4$  germes/ml), aucune des 61 autres souches testées, appartenant à diverses espèces bactériennes (phytopathogènes ou non) ne provoque cette production d'exsudat. On peut donc proposer cette méthode pour l'identification des souches virulentes de l'espèce *E. amylovora*.

**Mots clés additionnels :** Culture de tissus.

## SUMMARY

*Inoculation of callus of root tissues of Malus domestica cv. 'Golden Delicious' for the identification of pathogenic strains of Erwinia amylovora (Burr.) Winslow.*

A technique is described for inoculating calluses obtained from roots of *in vitro* cultures of *Malus domestica* (cv. 'Golden Delicious') with the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. The specificity of the reaction (i.e. droplets of exudate produced on the callus surface) was checked by inoculation of 61 bacterial strains, phytopathogenic or not. Results were very satisfactory, especially when the level of inoculum was not higher than  $10^4$  cells/ml, as far as virulent isolates were concerned.

**Additional key words :** *In vitro culture.*

## I. INTRODUCTION

L'identification au laboratoire de la bactérie *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.*, agent du feu bactérien des *Pomoïdeae* ne repose pas sur un nombre élevé de caractères (PAULIN & SAMSON, 1973). La réponse aux tests biochimiques usuels est le plus souvent négative et la détermination doit s'appuyer presque nécessairement sur l'utilisation de méthodes complémentaires (sérologie, sensibilité à des phages). Au cas où ces méthodes ne sont pas disponibles, c'est l'inoculation à une plante sensible qui fournit le moyen de confirmation le plus sûr.

L'inoculation, pour donner lieu au développement de la maladie, doit impérativement être pratiquée sur une plante en croissance, ce qui implique un type de

matériel végétal qui n'est pas disponible tout au long de l'année. De plus, le déroulement du processus infectieux dans la plante et la production d'exsudat, symptôme caractéristique attendu, entraînent un risque de dispersion de la bactérie dans l'environnement qui peut interdire le recours à cette méthode dans certains laboratoires.

Pour pallier cet inconvénient, des méthodes de laboratoire ont été proposées. L'inoculation de fruits (pommes ou poires) en survie, selon BILLING *et al.* (1960), donne des résultats satisfaisants, à condition qu'elle soit effectuée sur fruits immatures. La conservation de fruits immatures n'est pas aisée, même en chambre froide, et il peut donc se poser là aussi la question de la disponibilité de fruits aux stades sensibles, en périodes de besoins importants au laboratoire (automne, hiver).

L'inoculation de micro-boutures cultivées « *in vitro* » de variétés de pommier et de poirier a été réalisée (DURON *et al.*, en préparation) et conduit à un développement complet de la maladie : elle permettrait de se libérer des contraintes liées aux méthodes précédentes, mais ajouterait celle d'un coût (en temps de préparation et en matériel) élevé pour une simple identification.

Nous avons voulu examiner les possibilités offertes par l'utilisation de cals indifférenciés, matériel aisément manipulable, peu coûteux, dont la production est indépendante des rythmes saisonniers.

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. Origine et multiplication des cals

#### 1. Matériel végétal

Des pousses de 3 à 5 cm de long sont prélevées au printemps sur des rameaux provenant de bourgeons de pommier (cv. « Golden Delicious »), greffés l'hiver précédent. Les plantes sont élevées en serre pendant la durée des prélèvements (température 20-22 °C ; éclairage artificiel de complément — 14 h de jour). Les pousses sont stérilisées suivant la méthode publiée par JONES *et al.* (1979). Les extrémités des pousses mesurant 1 cm environ sont placées sur le milieu minéral de LEPOIVRE (1979), comprenant par l : 7 g d'agar (Merck), 30 g de saccharose, 100 mg d'inositol, 0,4 mg de thiamine. En outre 0,5 mg de 6-benzylaminopurine et 0,1 mg d'acide indolybutyrique (AIB) sont ajoutés à ce milieu, qui est également utilisé ultérieurement comme milieu de multiplication.

#### 2. Milieu d'enracinement

L'enracinement est induit en utilisant le milieu minéral de DUDITS *et al.* (1975), dilué de moitié, additionné, par l, de : saccharose 20 g, agar (Merck) 7 g, vitamines : inositol 100 mg, thiamine 0,4 mg et AIB 0,2 mg. Au cours de la phase d'induction des racines, les plantes sont placées à l'obscurité puis transférées 5 j plus tard en régime photopériodique (16 h d'éclairage sur 24 h, 2 500 lux), sur le même milieu dépourvu d'auxine. La température est maintenue à 24 °C en période de jour, 17 °C en période obscure.

#### 3. Formation de cal

Une racine mesurant environ 5 cm a été fragmentée en parties de 1 cm. Chaque fragment est placé sur un milieu composé des éléments minéraux de MURASHIGE & SKOOG (1962) et des addenda suivants, soit par l : saccharose 30 g, agar (Merck) 7 g ; vitamines : inositol 100 mg, pantothénate de calcium 1 mg, thiamine 2 mg, acide nicotinique 1 mg, pyridoxine 1 mg, biotine 0,01 mg ; hormones : 6-benzylaminopurine 2 mg, kinétine 1 mg, 6 ( $\gamma,\gamma$ -diméthylallyl-amino)-purine 1 mg, acide  $\alpha$ -naphthalène acétique 0,5 mg.

Les cals formés au niveau de la section des racines sont repiqués au bout de 80 à 90 j sur un milieu analogue dans lequel l'acide  $\alpha$ -naphthalène acétique est remplacé par de l'acide 2-4 dichlorophénoxyacétique à

0,05 mg/l. Les tubes contenant les cals sont placés sur une étagère non éclairée. Les cals reçoivent donc la faible lumière « d'ambiance » de la chambre de culture (600 lux) dont la température est de 24 °C en période éclairée et de 17 °C la nuit.

### B. Souches bactériennes

Elles proviennent, soit de collections de laboratoires de la Station de Pathologie végétale (I.N.R.A.-Angers) : dans ce cas le nom du responsable du laboratoire suit le numéro de la souche, soit, plus généralement, de la Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, I.N.R.A.-Angers). Elles sont choisies pour représenter l'ensemble des genres phytopathogènes, d'une part, et les bactéries épiphytes (ou saprophytes) susceptibles d'être rencontrées sur les hôtes du feu bactérien, et donc associées à *E. amylovora* lors de l'isolement (*Enterobacter agglomerans* par exemple), d'autre part :

#### 1. Souches d'espèces phytopathogènes

— *Pseudomonas syringae* pv *mors-prunorum* (696), pv *persicae* (C.32 — J. LUISETTI), pv *phaseolicola* (1 739), pv *savastanoi* (KOI — L. GARDAN), pv *syringae* (1 391, 675, 1 587, 1 689, 1 773, 1 748, 1 755).

— *Pseudomonas cichorii* (1 149), *P. corrugata* (81.26.6 — B. RAT), *P. marginalis* (1 387), *P. solanacearum* (702), *P. tolaasii* (2 068), *P. viridiflava* (1 592, 860).

— *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (1 460), pv *glycinea* (1 559), pv *pelargonii* (1 718).

— *Corynebacterium michiganense* (1 460), *fascians* (1 709).

— *Agrobacterium tumefaciens* (1 831, 1 001).

— *Erwinia ananas* (466), *E. amylovora* (1 430, 1 376, nombreux isolats provenant d'isolements récents), *E. amylovora* f. sp. *rubi* (1 958), *E. atroseptica* (1 880), *E. carotovora* (2 046), *E. chrysanthemi* (2 052), *E. nigrifluens* (1 281), *E. quercina* (1 266), *E. rhapontici* (1 025), *E. rubifaciens* (1 283), *E. salicis* (1 877), *E. Stewartii* (1 719).

#### 2. Souches d'espèces épiphytes

Il s'agit de 32 souches isolées de feuilles de poirier dans le cadre d'une étude d'écologie microbienne (MANCEAU *et al.*, 1984), dont :

— 28 *Enterobacter agglomerans*,

— 3 *Flavobacterium* sp.

— 1 *Serratia rubidea*.

### C. Méthode d'inoculation

Les cals obtenus en tube, en pleine croissance (3 à 4 semaines de culture), sont divisés en 4 fragments de 0,5 cm de côté, approximativement cubiques. Ils sont disposés en boîtes de Petri (5 cm  $\varnothing$ ) sur le même milieu de croissance gélosé, de telle manière qu'une coupe fraîche de cal se trouve placée horizontalement, tournée vers le haut. Sur cette face du fragment est déposée une microgoutte (10  $\mu$ l) d'une suspension bactérienne en eau distillée stérile, titrée si nécessaire par

étalement d'un aliquot sur milieu nutritif gélosé, ou ajustée à une opacité convenable par comparaison avec l'échelle de Mc FARLAND. Un cal témoin reçoit une microgoutte d'eau distillée, dans les mêmes conditions. Les cals sont examinés pendant l'incubation (26 °C, à l'obscurité) tous les jours, à partir de 3 j après l'inoculation et pendant une semaine, à l'aide d'une loupe binoculaire (6 ×).

### III. RÉSULTATS

#### A. Inoculations à forte dose (10<sup>8</sup> c.f.u./ml)

##### 1. *Erwinia amylovora*

L'inoculation d'*E. amylovora* (souche agressive, 1 430) à une dose de 10<sup>8</sup> c.f.u./ml conduit, après 3 à 4 j d'incubation, à la production, à la surface du cal, de gouttes d'exsudat blanc laiteux rappelant exactement l'exsudat bactérien caractéristique produit sur les plantes-hôtes. Cette production n'est jamais accompagnée de nécrose des tissus du cal. Elle a été obtenue avec toutes les souches d'*E. amylovora* virulentes testées (plus de 100). L'inoculation d'une souche non agressive d'*E. amylovora* (1 376) comme celle d'une goutte d'eau stérile n'entraîne ni production d'exsudat, ni nécrose.

##### 2. Autres souches bactériennes

###### a) Espèces phytopathogènes

Dans les mêmes conditions, aucun symptôme n'a été obtenu après inoculation de 4 cal par chacune des autres souches phytopathogènes, sauf 3.

En effet, à cette concentration bactérienne, on note, sur au moins un des cals inoculés, la production de gouttelettes d'aspect trouble pouvant rappeler celui de l'exsudat produit sur cal par les souches d'*E. amylovora* agressives, à la suite de l'inoculation des 3 souches suivantes :

- *Ps. syringae* pv *syringae* (1 755),
- *Erwinia salicis* (1 877),
- *Erwinia rhapontici* (1 025).

###### b) Espèces épiphytes

L'inoculation de ces souches n'a pas conduit à la production de symptômes, sur aucun des cals inoculés, pour 28 d'entre elles.

En revanche, 4 souches d'*Enterobacter agglomerans* produisent des gouttelettes qui ressemblent à des gouttes d'exsudat sur au moins un des cals inoculés.

#### B. Inoculations à faible dose (10<sup>4</sup> c.f.u./ml)

Elles n'ont porté que sur *E. amylovora* (1 430 et de nombreuses souches récemment isolées) et sur les souches ne donnant pas de résultat négatif pour les 4 cal inoculés lors de l'essai précédemment décrit. Elles concernent 4 cal par souche.

Aucun des cals inoculés (sauf par *E. amylovora*, quelle que soit la souche) dans ce cas n'a conduit à l'apparition de symptôme.

### IV. DISCUSSION - CONCLUSION

L'inoculation de suspensions bactériennes titrées à 10<sup>4</sup> c.f.u./ml à des cals de racine de pommier en croissance ne conduit à la formation de gouttelettes d'exsudat que dans le cas d'*E. amylovora* virulentes. L'aspect de ces gouttelettes examinées à la loupe binoculaire (6 ×) est suffisamment caractéristique pour que cette production puisse devenir un critère de détermination d'*E. amylovora*. En général la réponse du cal est obtenue après 3 ou 4 j d'incubation.

Les quelques réponses positives obtenues par l'inoculation de fortes doses d'autres espèces bactériennes peuvent aisément être évitées au laboratoire. Ces réponses sont peut-être obtenues à la suite d'une multiplication en saprophyte de la bactérie à partir du cal mais aussi d'une association plus étroite avec le cal qui indiquerait que toute la spécificité parasitaire n'est pas révélée par ce matériel.

Le seuil minimum de sensibilité du cal semble être très bas : une fréquence non négligeable d'inoculations positives peut être obtenue avec un inoculum de moins de 10<sup>3</sup> c.f.u./ml (10 cellules/cal). Vraisemblablement le cal peut réagir à l'inoculation d'une seule cellule. La multiplication bactérienne dans le cal a été suivie par broyage du cal et étalement d'aliquots sur milieu gélosé ; elle ne semble pas révéler de différence sensible entre souches d'*E. amylovora* d'agressivités diverses. Cette étude devrait cependant être effectuée avec des effectifs plus élevés pour obtenir des résultats significatifs.

Telle qu'elle est décrite ici la technique se prête bien à la recherche de variants (ou de mutants) avirulents au sein d'une population bactérienne. En particulier, la rapidité d'exécution et de lecture autorise un tri sur de grands effectifs, au contraire limités dans le cas d'inoculations sur plantes entières.

Cette méthode d'inoculation sur cal peut donc être proposée pour la détermination de souches virulents d'*E. amylovora*. La quantification de la réponse en fonction du niveau d'agressivité de la souche ou en fonction du niveau de sensibilité génétique de la variété d'où est issu le cal n'a pas été tentée, non plus que des inoculations sur cal d'autre origine (fruit, feuille, etc...).

Reçu le 18 mars 1986.

Accepté le 10 juin 1986.

### REMERCIEMENTS

Nous remercions R. CHARTIER, J. C. LALANDE, (I.N.R.A., Angers), ainsi que S. BOUCAULT et C. GROSSAIN (stagiaires de l'E.S.A. et de l'Université d'Angers) pour leur participation active à ce travail.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Billing E., Crosse J. E., Garrett C. M. E.**, 1960. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.* *J. Appl. Bacteriol.*, **24**, 195-211.
- Dudits D., Nemet G., Haydu Z.**, 1975. Study of callus growth and organ formation in wheat tissue cultures. *Can. J. Bot.*, **53**, 957-963.
- Jones O. P., Pontikis C. A., Hoggood M. E.**, 1979. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hortic. Sci.*, **54** (2), 155-158.
- Lepoivre Ph.**, 1979. *C. R. Colloq.* : « Multiplication *in vitro* d'espèces ligneuses », Gembloux (Belgique) 6-8 juin, 191 p.
- Manceau Ch., Paulin J. P., Gardan I.**, 1984. Effect of streptomycin sprays on leaf microflora on pear trees. *Acta Hortic.*, **151**, 187-194.
- Murashige T., Skoog F. S.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- Paulin J. P., Samson R.**, 1973. Le feu bactérien en France, II. Caractères des souches d'*Erwinia amylovora* (Burril) Winslow *et al.*, 1920, isolées du foyer Franco-Belge. *Ann. Phytopathol.*, **5** (4), 389-397.