



HAL
open science

Amélioration des moyens de lutte contre *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agent de la bactériose du Kiwi : Biologie du ravageur, étude épidémiologique, outils de diagnostic et moyens de lutte.

Marie-Lisa Brachet, A. Moronvalle, Sylvie Désiré, V. Mechenin, Eric
Sclaunich, Baptiste Labeyrie, S. Bornes, Louise Chevallier, Françoise
Poliakoff, Cindy E. Morris, et al.

► To cite this version:

Marie-Lisa Brachet, A. Moronvalle, Sylvie Désiré, V. Mechenin, Eric Sclaunich, et al.. Amélioration des moyens de lutte contre *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agent de la bactériose du Kiwi : Biologie du ravageur, étude épidémiologique, outils de diagnostic et moyens de lutte.. *Innovations Agronomiques*, 2018, 63, pp.307-319. 10.15454/1.519118468056355E12 . hal-01837867

HAL Id: hal-01837867

<https://hal.science/hal-01837867v1>

Submitted on 12 Jul 2018

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0
International License

Amélioration des moyens de lutte contre *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, agent de la bactériose du Kiwi : Biologie du ravageur, étude épidémiologique, outils de diagnostic et moyens de lutte.

Brachet M.-L.¹, Moronville A.¹, Désiré S.², Mechenin V.³, Sclaunich E.⁴, Labeyrie B.⁵, Borne S.⁵, Chevallier L.⁵, Poliakoff F.⁶, Morris C.⁷, Borschinger B.⁷

¹ Ctifl Centre de Lanxade, 28 route des Nébouts, F-24130 Prignonrieux

² FDGDON 64, 124 Boulevard Tourasse F-64078 Pau Cedex

³ Fredon Aquitaine, Centre Inra, 71 av. Edouard Bouleaux, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon

⁴ Invenio, Domaine de Lalande, F-47110 Nerac

⁵ SEFRA, 2685 route des Pécoltes, F-26800 Etoile sur Rhône

⁶ ANSES, 7 rue Jean Dixmèras, F-49044 Angers Cedex 01

⁷ INRA PACA, BP 94, F-84140 Monfavet

Correspondance : brachet@ctifl.fr

Résumé

La bactériose du kiwi, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, sévit depuis 2010 en France et concerne maintenant la quasi-totalité des aires de production. Un programme de recherche a vu le jour en 2012 pour 3 années, fruit d'un partenariat entre un institut (Ctifl), deux laboratoires (Anses, Inra) et trois collaborateurs régionaux (Sefra, Invenio, Fredon Aquitaine). Il a permis aux partenaires i) d'acquérir des connaissances quant au développement et au comportement de cette bactérie ; ii) de mettre au point un certain nombre de test (méthode officielle de détection, tests de pathogénicité, test de sensibilité variétale) ; et iii) d'évaluer différentes stratégies de protection. Beaucoup de données et d'informations ont ainsi été générées, et sont maintenant disponibles pour les producteurs.

Mots-clés : *Actinidia*, chancre bactérien, détection, connaissance, moyens de protection.

Abstract: Improvement of bacterial kiwifruit canker management caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: biology, epidemiology, diagnostic and protective measures.

Bacterial canker of kiwifruit, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, has caused severe damages in France since 2010 and has spread throughout nearly all the kiwifruit production areas. A 3-year research project began in 2012, fruit of cooperation between one institute (Ctifl), two research laboratories (ANSES, INRA), and three regional partners (Sefra, Invenio and Fredon Aquitaine). Partners were able to acquire knowledge on the development and the behavior of this bacterium as well as to develop a series of tests (an official detection method, pathogenicity tests, a varietal susceptibility test) and to assess different control strategies.

Keywords: *Actinidia*, bacterial canker, detection, knowledge, control strategies.

1. La bactériose du kiwi : éléments de contexte

En juillet 2010, la bactériose du kiwi, causée par *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA), est identifiée officiellement pour la première fois en France de manière quasi-simultanée dans 2 vergers (Vanneste et al., 2011), le premier en Rhône-Alpes sur la variété Summer (*Actinidia deliciosa*) et le second en Aquitaine dans un verger de Jintao (*A. chinensis*). D'autres bactérioses provoquées par

différentes souches de *P. syringae* (dans les groupes taxonomiques nommés *P. syringae* pv. *syringae* et *P. viridiflava*) ont déjà été observées sur kiwi, mais les dégâts étaient sporadiques et peu inquiétants pour l'avenir de la filière.

1.1 Les différentes populations de PSA recensées au niveau mondial.

Quatre populations de souches distinctes par rapport à leurs traits biologiques (biovars) ont été recensées au niveau mondial (Chapman et al., 2012 ; Scortichini et al., 2012 ; Vanneste et al., 2012) ; elles se différencient par leur pathogénicité, leur aire de répartition, et leurs caractéristiques génomiques (Tableau 1). Cependant, des travaux d'identification moléculaire, de phylogénie et de pouvoir pathogène menés dans le cadre d'un projet de thèse co-encadré par l'Anses et l'INRA ont abouti à renommer les souches de PSA bv.4 au sein d'un nouveau pathovar *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* (PSAf) (Cunty et al., 2015). Cette variante de *P. syringae* ne se vascularise pas et provoque uniquement des tâches foliaires (comme *P. syringae* pv. *syringae*).

Tableau 1 : Principales caractéristiques des différentes populations de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Population	Caractéristiques		Gène codant toxine ou effecteur			Répartition	Pathogénicité
	Hydrolyse esculine	Fluorescence milieu King B	Phaséolotoxine	Coronatine	HopA1		
PSA bv. 1	Non	Non	Présent	Absent	Absent	Japon 1984-1995 Italie 1992	Dégâts importants au Japon, mais mineurs en Italie; isolé sur Hayward
PSA bv. 2	Non	Non	Absent	Présent	Absent	Corée du Sud 1994	Pertes économiques importantes sur Hayward
PSA bv. 3	Non	Non	Absent	Absent	Présent	Mondiale	Pertes économiques importantes au niveau mondial
PSA bv. 4 ou Psaf	Oui	Oui	Absent	Absent	Absent	Nouvelle Zélande Australie France	Peu virulente; symptômes foliaires (nécroses)

Les souches responsables de l'épidémie vécue en ce moment au niveau mondial appartiennent à la population PSA bv. 3. Elles ont la capacité de se vasculariser, et peuvent donc, en fonction des variétés et de la situation, entraîner la mort complète de l'arbre par obstruction des vaisseaux du xylème.

1.2 Mobilisation de la filière française et actions nationales

Suite à la détection de PSA en France, et au regard de ce qui se passait à l'étranger (Italie notamment), les producteurs via l'interprofession (Bureau interprofessionnel du kiwi) ont exprimé de réelles inquiétudes vis-à-vis de ce qui allait se passer en France, que ce soit sur les variétés de kiwi à chair jaune et dites plus sensibles, ou les variétés de kiwi à chair verte qui représentent plus de 95% de la production (variété Harward surtout).

Dans ce contexte, 2 actions majeures ont été mises en place au niveau national (Brachet et Fritsch, 2013) : un plan de surveillance national, et un projet de recherche national financé à 50% par des fonds Casdar Innovation et Partenariat (projet n°1277). Ces deux actions ont démarré respectivement en 2011 et 2012, et sont le reflet d'une mobilisation forte à la fois de la DGAL (Direction générale de l'Alimentation du ministère en charge de l'agriculture) et de ses services régionaux, de la recherche, des organismes d'expérimentation et de la profession.

Le programme de recherche sur 3 ans a été mené par deux laboratoires de recherche (INRA et ANSES), le Ctifl (porteur), et 3 relais régionaux, à savoir, 2 stations régionales d'expérimentation (Invenio et la Sefra) et la Fredon Aquitaine. Il s'articulait autour de trois actions distinctes : la première concernant la coordination et l'animation et les deux autres affectées aux travaux de recherche (détails ci-dessous).

2. Projet casdar n°1277 : 2 actions techniques complémentaires

2.1 Action 1 - Etat des lieux et stratégies de protection au verger

Cette action concerne l'ensemble des moyens pouvant être mis en place au niveau parcellaire et qui pourront aider le producteur à réaliser une gestion optimale de la maladie ; ainsi, 3 objectifs ont été poursuivis :

- 1) Mettre au point et évaluer la sensibilité du matériel végétal, en particulier vis-à-vis des souches capables de se vasculariser (Ctifl)
- 2) Caractériser les souches vis-à-vis de leur pouvoir pathogène afin d'adapter les pratiques de protection (Anses, Inra)
- 3) Evaluer l'impact des pratiques culturales agricoles diverses sur le développement de la maladie (Sefra, Fredon Aquitaine, Invenio, Ctifl).

2.2 Action 2 - Compréhension de la biologie et de l'écologie de l'agent pathogène dans différents contextes pédoclimatiques et de gestion de verger.

Afin d'essayer de comprendre au mieux le comportement de la maladie, ainsi qu'apporter des outils fiables de détection aux producteurs, cette action s'est déroulée principalement autour de 2 types de travaux :

- 1) Mise au point d'une technique de détection et d'identification de Psa fiable et robuste faisant consensus au niveau européen (Anses, Ctifl).
- 2) Identification des différentes communautés de bactéries présentes dans des typologies de verger bien spécifiques pour essayer d'appréhender la dynamique de propagation de la maladie (Inra, Sefra).

3. Etat des lieux et stratégies de protection au verger (Action 1)

3.1 Sensibilité du matériel végétal

3.1.1 Objectifs

- Mise au point d'un test de sensibilité du matériel végétal d'Actinidia à PSA afin de discriminer les variétés/cultivars très sensibles de celles/ceux peu sensibles.
- Evaluation de la sensibilité du matériel végétal disponible au niveau national

3.1.2 Démarche méthodologique

Manipulation de PSA : PSA est un organisme de quarantaine qui requiert des autorisations pour être manipulé. Une demande d'agrément a donc été fait par le Ctifl (laboratoire NS2 et NS3).

Mise au point du test d'évaluation de la sensibilité : Comparaison de 2 tests

1 - Sur rameaux excisés : à partir de rameaux prélevés pendant l'hiver et conservés au froid, ou prélevés en saison, des baguettes de 20 cm de long et de diamètre le plus homogène possible sont découpées. 3 points d'inoculation équidistants sont réalisés sur chaque baguette (inoculation par blessure), puis disposés dans des boîtes contenant du papier humide pour maintenir une bonne hygrométrie tout au long de l'incubation (Figure 1). Après inoculation, les boîtes sont incubées 19 jours. La longueur des nécroses et l'intensité du suintement sont alors notés pour permettre le calcul d'un indice, le WSBI (Woody Stem Bio Index), utilisé dans différents tests à l'étranger.



Figure 1 : Rameaux excisés prêts à être incubés.

2 - Sur plantule : à partir de plants de 50 cm de hauteur environ, des inoculations par pulvérisation foliaire sont réalisées. Une lecture de la longueur de la nécrose est réalisée plusieurs jours après (variable en fonction des essais).

Evaluation en routine de la sensibilité des variétés disponibles : le matériel végétal analysé provient du verger « collection variétale » de Lanxade, et de parcelles de producteurs de la SCAAP Kiwifruit de France. Au total, ont été analysés :



- 12 variétés femelles
- 12 cultivars femelles
- 17 mâles « connus »
- 18 mâles « inconnus » (producteur)

3.2.3 Principaux résultats

Une comparaison des 2 méthodes d'évaluation de la sensibilité du matériel végétal est proposée dans le Tableau 2. Bien que ces 2 tests permettent d'obtenir des résultats intéressants, c'est le test sur tiges excisées qui a été préféré par la suite pour sa praticité (disponibilité du matériel végétal, rapidité de mise en œuvre, répétabilité).

Le test sur tiges excisées permet de discriminer 3 gammes de sensibilité variétale (sensibilité forte, moyenne et faible) et de définir le potentiel des différentes variétés lié au matériel végétal lui-même. Ces résultats ne sont pas extrapolables au comportement de la variété en verger, car d'autres facteurs entrent en compte dans l'expression de la maladie (précocité, port de la variété, gestion de l'arbre [blessures, fertilisation], contexte pédoclimatique, ...). En revanche, une variété très sensible dans les tests en laboratoire ne manifestera pas de résistance au verger.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des tests sur tiges excisées et plantules.

	Tiges excisées	Plantules
Avantages 	Rapidité d'exécution Peu coûteux à mettre en place Permet de discriminer les variétés très sensibles des variétés peu sensibles Evaluation d'un grand nombre de variétés en même temps	Pas de problèmes de contamination secondaire
Inconvénients 	Selon la période de l'année, difficultés de lecture du résultat (présence de champignons saprophytes qui colonisent les rameaux)	Fonctionne uniquement avec certaines souches Nécessite plus d'espace Nécessite d'être prévu en amont car besoin de plants homogènes des différentes variétés (vitroplants)

Concernant les tests réalisés en routine (hors mise au point méthodologique), au total 18 tests sur rameaux excisés qui ont été réalisés.

Un exemple de résultats obtenus lors d'un essai en 2013 est proposé en Figure 2. L'objectif de cet essai était d'identifier la sensibilité de l'ensemble des variétés mâles d'Actinidia disponibles dans le verger du Ctifl de Lanxade. Les variétés sont comparées à Tomuri car c'est la variété mâle d'Hayward qui présente la meilleure tolérance à PSA. Les résultats obtenus devaient permettre d'identifier de potentiels individus mâles qui pourraient remplacer les variétés mâles sensibles présentes chez les producteurs. Quelques variétés ressortent comme très peu sensibles (étoiles roses à droite de la Figure 2), à l'inverse de variétés très sensibles (étoiles vertes à gauche). Cependant, les variétés identifiées comme peu sensibles appartiennent principalement à des espèces autres qu'*A. deliciosa* et *A. chinensis*, ce qui pose des problèmes de compatibilité pollinique.

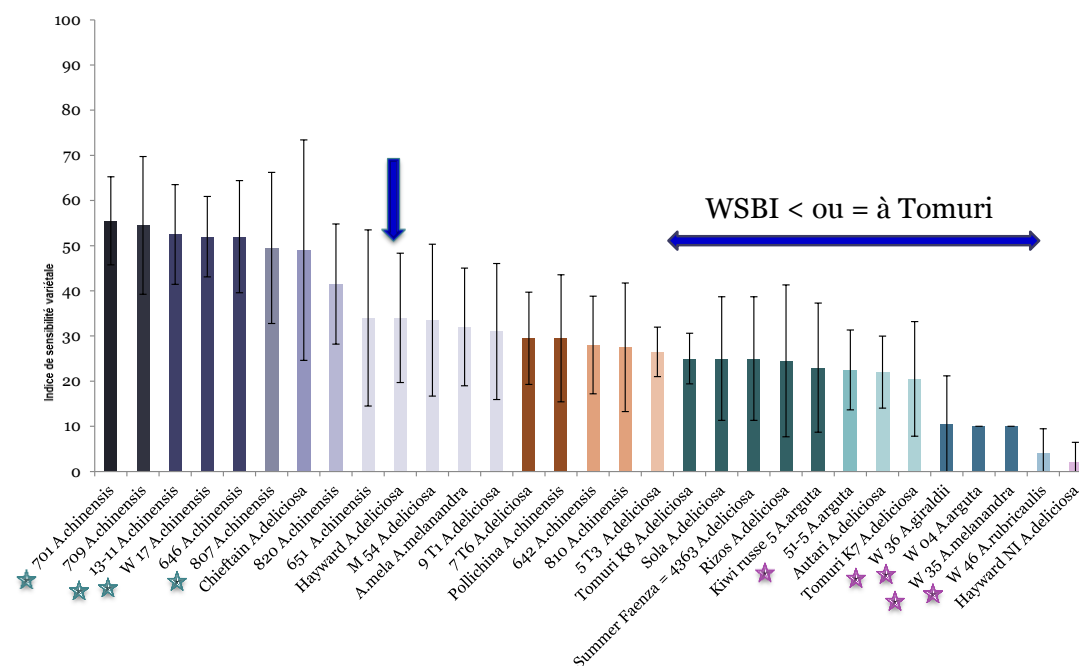


Figure 2 : Indice de sensibilité variétale à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* exprimée en fonction de la variété d'Actinidia mâle (variétés très sensibles indiquées par des étoiles vertes à gauche, variétés très peu sensibles étoiles roses à droite)

3.2 Pouvoir pathogène des souches

3.2.1 Objectif

Afin de prévenir l'apparition de nouvelles souches particulièrement agressives (témoignant de l'évolution d'une souche déjà présente sur le territoire ou de l'introduction d'une nouvelle souche) et qui pourrait remettre en cause les moyens de protection actuellement mis en œuvre contribuant au maintien de l'état sanitaire des vergers, un test de pouvoir pathogène des souches, reproductible et robuste a été mis au point.

3.2.2 Démarche méthodologique

Le développement de ce test a été réalisé conjointement par l'Anses et l'Inra.

Matériel végétal : deux variétés de l'espèce *A. deliciosa* (Hayward et Moncap).

Matériel bactérien : différentes souches représentatives des biovars de PSA et de *P. syringae*.

Méthodes d'inoculation :

- 1) pulvérisation sur la face inférieure des feuilles,
- 2) piqûre d'un entre nœud (Figure 3) ;
- 3) découpe partielle d'un pétiole.



Figure 3 : Inoculation par piqûre d'un vitroplant de *A. deliciosa*

3.2.3 Principaux résultats et discussion

D'une manière générale, les symptômes observés après inoculation artificielle sont très variables pour toutes les techniques, et d'une répétition à l'autre. Cependant, l'inoculation par piqûre se démarque tout de même, pour 4 raisons :

- Peu d'inoculum nécessaire pour l'inoculation
- Maîtrise des risques de contamination entre plants (blessure limitée) et des infrastructures (risque de mauvaise maîtrise des aérosols pour le test par pulvérisation)
- Vérification du Postulat de Koch (ré-isolement de la souche inoculée)
- Les plants inoculés avec PSAf (=PSA bv.4) finissent par cicatriser.

Cette technique d'inoculation sera proposée pour être ajoutée au protocole de diagnostic de l'OEPP (Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes) relatif à *Pseudomonas actinidiae* pv *actinidiae*, pour être accessible et utilisable au niveau national et international.

3.3 Impact des pratiques agricoles

Afin d'évaluer l'impact de différentes pratiques sur l'expression de la maladie, 2 types de travaux complémentaires ont été menés : une enquête parcellaire pour identifier les facteurs biotiques et abiotiques influençant le développement de PSA ; et des essais de protections phytosanitaire pour optimiser cette pratique qui a un impact direct sur l'expression de la maladie.

3.3.1 Enquête parcellaire

Objectif : Identifier les facteurs favorables ou non au développement de PSA en parcelle de production.

Démarche méthodologique :

Un échantillon de 48 parcelles de la variété Hayward, réparties pour 2/3 en Nouvelle Aquitaine et 1/3 en Rhône-Alpes, ont été suivies sur les 3 années du projet. Un protocole commun d'enquête a été défini conjointement entre le Ctifl, la Fredon Aquitaine et la Sefra ; celui-ci a permis la constitution d'une base de données (Bdd) contenant une quantité importante de données liées à la fois à la maladie (dynamique de progression parcellaire), aux pratiques culturales (calendriers culturaux), à la météo et à l'environnement proche de chaque parcelle.

Principaux résultats et discussion :

Deux résultats « généraux » ont été dégagés :

- Généralisation de la protection cuprique : sur l'échantillon étudié, une augmentation des parcelles traitées au cuivre est observée d'une année sur l'autre (46% des parcelles traitées en 2012, 80% en 2014).
- Aggravation des symptômes secondaires traduisant une évolution importante de la bactérie : contamination du système vasculaire, aucun moyen de traitement curatif disponible, maintien de l'inoculum d'une année sur l'autre. En 2013, 33% des parcelles présentaient des symptômes secondaires, contre 67% en 2014 (inversement des proportions).

La base de données ainsi constituée a permis d'identifier quelques facteurs prépondérants. Les premiers résultats montrent que l'environnement parcellaire (niveau de contamination, présence de haies) est un élément très important et que certaines pratiques culturales, telles que l'excès de fertilisation azotée, peuvent favoriser le développement de la maladie.

Concernant les facteurs favorisant ou non la maladie, en dehors des données météo, il a été démontré que sur les données 2013 et 2014, certaines variables étaient liées à la variable PSA (tests du Khi-Deux), à savoir :

- L'état sanitaire de l'environnement à proximité (2013 et 2014) : la présence de vergers contaminés par PSA dans les 5 km entourant la parcelle est favorable à la contamination,
- Le pH du sol (2013 et 2014) : un pH basique est défavorable à la présence de PSA dans la parcelle,
- La présence de haies (2013 et 2014) : la présence de haies entourant la parcelle réduit le taux de vergers malades par rapport aux vergers sains (Tableau 3),
- La fertilisation azotée (2014) : une fertilisation au-dessus de 100 unités d'azote par hectare et par an est favorable à la présence de PSA dans la parcelle (Tableau 4).

	Nb de vergers sans PSA	Nb de vergers avec PSA
Parcelle non abritée	1	12
Parcelle abritée	13	22

Tableau 3 : Répartition des vergers composant l'échantillon en fonction de la présence ou non de haies.

Fertilisation azotée en unités/hectares	Nb de vergers sans PSA	Nb de vergers avec PSA
< 100	8	2
100-170	8	25
> 170	0	6

Tableau 4 : Répartition des vergers composant l'échantillon en fonction des quantités d'azote apportée annuellement.

Actuellement, la Base de données est retravaillée « hors projet », car l'analyse des résultats était, à l'époque, en dehors des compétences disponibles. De nouveaux résultats seront donc certainement disponibles dans les mois à venir.

3.3.2 Essais de protection phytosanitaire :

Objectif : L'objectif principal de cette tâche est d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies de protection (pluriannuelles). Deux objectifs complémentaires ont été poursuivis :

- Validation d'un protocole d'évaluation au champ de spécialités phytosanitaires vis-à-vis de la bactériose kiwi,
- Acquisition de compétences méthodologiques pour les partenaires.

Démarche méthodologique :

Sur la base d'un protocole commun d'expérimentation, 3 essais pluriannuelles ont été mis en place, 2 dans le Sud-ouest (Saint Nicolas département (dpt) 47 et Sordes l'Abbaye dpt. 40) et 1 dans le Sud-est (Loriol dpt. 26). D'une année sur l'autre, des modifications ont été apportées au protocole.

Dispositif expérimental :

Les essais ont été mis en place dans des vergers de Hayward (variété d'*A. deliciosa*). Les parcelles élémentaires contenaient de 3 à 4 arbres (notation sur 2 arbres femelles) et répétées 5 fois (5 réplicats). Les témoins étaient imbriqués.

Stratégies de protection évaluées : 7 stratégies de protections différentes ont été évaluées, mêlant des produits cupriques, 1 engrais, 1 Stimulateur de Défense des Plantes, et 1 régulateur de croissance. Les stratégies sont basées sur une protection cuprique tout au long de l'année (Figure 4), seuls les traitements entre le débourrement et la floraison changent d'une modalité à l'autre.

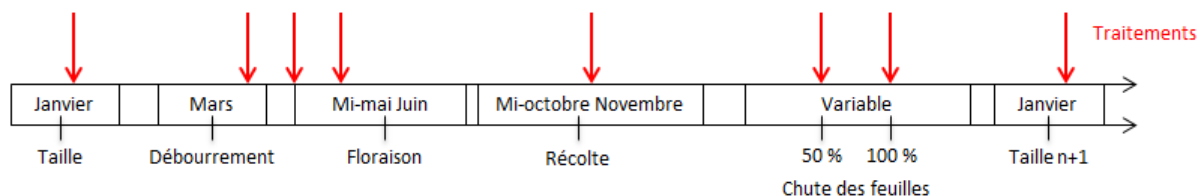


Figure 4 : Planning de traitement annuel des essais de protection phytosanitaire.

Notations :

- Symptômes primaires (tâches sur feuilles) : 100 feuilles par parcelle élémentaire
 - o Intensité = pourcentage de surface foliaire nécrosée par feuille.
 - o Fréquence = nombre de feuilles nécrosées
- Symptômes secondaires (chancres sur bois) : nombre de point de gomme par organe

$$\text{Indice d'attaque} = (\text{nb tronc} \times 4) + (\text{nb charp} \times 3) + (\text{nb canes} \times 2) + (\text{nb ram} \times 1)$$

Principaux résultats et discussion :

Au moment du choix des parcelles d'expérimentation (fin 2012), il a été décidé de choisir des parcelles avec un faible taux d'attaque (taux < 2% de plants avec exsudats sur bois), ou avec un taux d'attaque nul mais présentant des parcelles contaminées dans l'environnement proche. Ainsi, la parcelle située dans le dpt. 26 était non contaminée, et les parcelles situées dans les dpts. 47 et 40 étaient contaminées. La parcelle dpt. 26 est restée non contaminée tout au long de l'étude, empêchant les notations d'efficacité. Seules les parcelles de Saint Nicolas (dpt.47) et Sordes l'Abbaye (dpt. 40) ont pu être suivies dans leur ensemble.

A Sordes l'Abbaye, les fréquences et intensités de contamination primaire étaient variables d'une année sur l'autre ; la parcelle était indemne de symptômes en 2013 et 2014, ce n'est qu'en 2015 que des symptômes secondaires ont été observés. Pour Saint Nicolas (Figure 5), la parcelle était globalement moins contaminée que celle de Sordes l'Abbaye au moment de la mise en place de l'essai, avec des fréquences de contamination avec symptômes primaires respectivement de 45% et 80% en janvier 2013. Cependant, des symptômes sur bois ont été observés dès 2013.

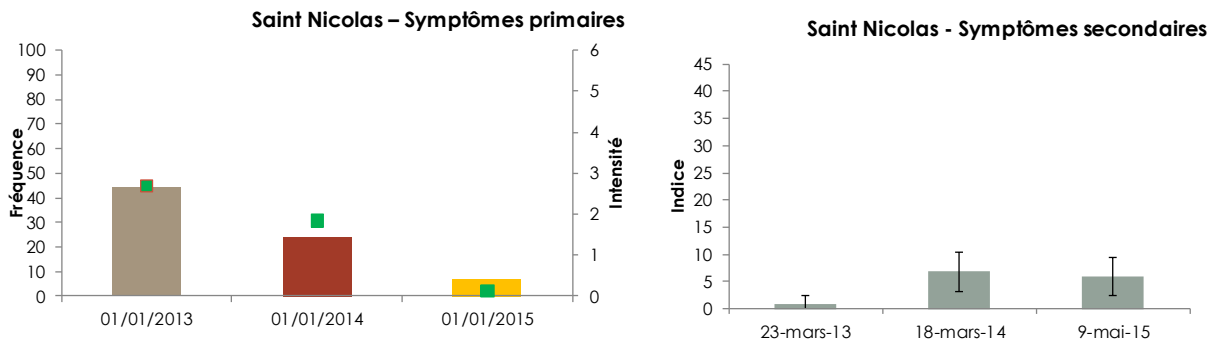


Figure 5 : Intensité (carrés verts) et fréquence de contamination de l'essai situé à Saint Nicolas par PSA : symptômes primaires (à droite) et secondaires (à gauche)

Les résultats obtenus dans les essais en termes d'efficacité ont permis de mettre en avant :

- L'importance de la protection cuprique, qui permet de réduire de manière significative la maladie,
- L'intérêt de 2 produits de traitement non cupriques (1 SDP et 1 régulateur de croissance), qui devraient obtenir des AMM (Autorisations de Mises sur le Marché) dans les années à venir,

Le projet a aussi permis de faire progresser significativement le protocole d'évaluation de spécialités phytosanitaires vis-à-vis de la bactériose du kiwi. Les résultats obtenus ont servi à la rédaction d'une méthode CEB (Commission des Essais Biologiques) spécifique aux bactérioses du kiwi (PSA, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. viridiflava*).

4. Biologie et écologie de l'agent pathogène

4.1 Techniques de détection et d'identification de PSA

4.1.1 Objectif

Identifier un test moléculaire permettant de discriminer les différentes populations de PSA et PSAf, ou à minima PSA bv. 3, afin de pouvoir suivre l'évolution de la maladie à la fois à l'échelle nationale et internationale.

4.1.2 Démarche méthodologique

Cette tâche a été réalisée en 2 phases :

- Phase 1 : Evaluation et comparaison de l'ensemble des méthodes d'extraction et de détection de PSA décrites dans la littérature (Tableau 5) afin d'identifier les plus performantes.
- Phase 2 : réalisation d'un test inter-laboratoires coordonné par l'Anses et auquel a participé le Ctifl ainsi que 15 laboratoires européens (projet Eranet EUPHRESKO)

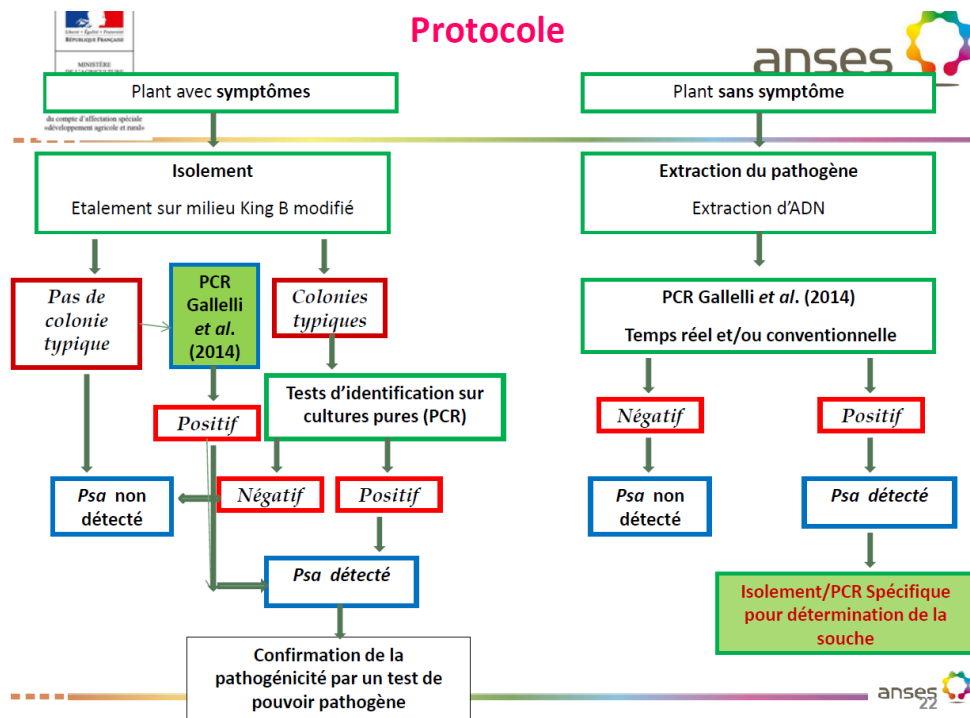
Tableau 5 : Présentation succincte des différentes méthodes de détection testées.

Nom de la méthode	Auteur	Détail
RG-PCR	(Rees-George et al., 2010)	PCR simple
d-PCR	(Gallelli, L'Aurora, et Loreti, 2011)	Duplex PCR (avrD et Koh&Nou)
PCR-C	(Gallelli et al., 2014)	PCR simple
real-time PCR	(Gallelli et al., 2014)	PCR temps réel
Nested PCR	(Biondi et al., 2013)	Nested-PCR et enzymes
Mlt-PCR	(Balestra et al., 2013)	Multiplex PCR
rep-PCR	(Louws et al., 1994)	Répétitive PCR (BoxPCR)

4.1.3 Principaux résultats et discussion

Les résultats ont permis de mettre en évidence la performance de 2 kits d'extraction d'ADN, et de 4 méthodes de détection, qui peuvent maintenant être utilisées en routine pour détecter *Psa* bv. 3 : RG-PCR, d-PCR, PCR-C et la PCR en temps réel. Ces méthodes sont applicables à la fois à des échantillons symptomatiques et asymptomatiques, et sur différentes matrices (bois, feuilles, pollen).

A partir de ce travail, un nouveau protocole de détection de PSA a été proposé au niveau de l'OEPP (Figure 6).

**Figure 6** : Méthodologie à suivre pour détecter PSA à partir d'échantillons symptomatiques et asymptomatiques.

4.2 Dynamique des populations de PSA au verger

4.2.1 Objectif

Dans cette tâche, 3 objectifs distincts ont été poursuivis :

- Etude de la dynamique des populations de *P. syringae* en vergers de kiwis,
- Etude de la structure des populations de *P. syringae* en vergers de kiwis,
- Etablir, si possible, un lien entre la structure des populations de *P. syringae* et l'état sanitaire des plants de kiwis.

4.2.2 Démarche méthodologique

Quatre vergers situés en Rhône-Alpes dans la vallée de la Drôme ont été sélectionnés et échantillonnés en 2014, à 3 périodes de l'année (début avril, fin avril et fin novembre). Les souches de *P. syringae* associées aux arbres ont été isolées de façon quantitative conduisant à la mise en collection de plus de 800 souches. Les travaux sont basés sur l'étude des différents phylogroupes de *P. syringae* (13 au total) décrits par Berge *et al.*, 2014.

Sur la base des souches disponibles et des caractéristiques de chaque phylogroupe, 2 étapes ont été suivies :

- 1) Mise au point de la méthode moléculaire permettant de déterminer rapidement et facilement l'appartenance des souches aux différents phylogroupes,
- 2) Analyse des phylogroupes présents dans les 4 parcelles échantillonnées.

4.2.3 Principaux résultats et discussion

Méthode moléculaire : une méthodologie couplant 2 PCR successives a été développée et permet de différencier 6 phylogroupes différents (Borschinger *et al.*, 2015).

Analyse des phylogroupes présents dans les 4 parcelles : Les colonies qui poussent sur le milieu d'isolement sont transférées dans des plaques de microtubes pour conserver l'ADN en attente de l'analyse moléculaire. L'analyse par PCR révèle l'appartenance de chaque souche à un phylogroupe. PSA appartient au phylogroupe 1. Des analyses PCR plus spécifiques peuvent ensuite confirmer la présence de PSA dans les arbres. Une caractérisation des différents phylogroupes présents dans chaque verger aux différentes époques a donc été entreprise.

Cette analyse a permis de mettre en évidence que chaque plant de kiwi, que ce soit au niveau des bourgeons ou du système vasculaire, est colonisé par des populations mixtes de différents phylogroupes de *P. syringae*, et que la structure et l'abondance de ces populations évoluent au cours des saisons. Sur les arbres malades, très peu de cas ont été retrouvés avec uniquement Psa. Il existe une forte variation entre les arbres (chaque arbre portait des structures de populations de *P. syringae* différentes) bien que certains vergers avaient des profils de populations clairement différentes des autres vergers. Le suivi de ces arbres, qui sont pour la plupart apparemment sains, permettra de révéler un profil microbiologique propice à l'expression des symptômes et de générer des hypothèses sur le rôle des interactions au sein de la population diverse de *P. syringae* dans la santé de l'arbre.

Conclusion

La bactériose du kiwi est aujourd'hui répandue sur la quasi-totalité des aires de production en France. La suppression des variétés très sensibles (arrachage ou recépage) ainsi que la généralisation des traitements cupriques ont permis de limiter le développement de la maladie dans certaines zones, bien que des cas critiques soient encore recensés (Nord de Valence notamment). Malgré toutes les précautions qui peuvent être prises, la bactériose du kiwi est très fortement influencée par les conditions climatiques (notamment hivernales), ce qui rend difficile son contrôle dans certaines zones.

Le programme de recherche présenté ci-dessus a permis d'avancer de manière importante sur des sujets divers : compréhension du fonctionnement de la bactérie, stratégies de protection, détection et identification de PSA. Comme pour bon nombre de maladies, il va falloir « vivre avec » tout en continuant d'améliorer les moyens de protection.

Bien qu'elle soit présente depuis 2010 en France, nous avons encore peu de recul sur cette maladie. Les années à venir seront importantes et apporteront des éléments sur la pérennité des stratégies de protection actuellement déployées.

Remerciements

Quelques remerciements permettent de mettre en avant le travail fourni par certains partenaires techniques « en dehors » des partenaires strictes du projet : B. Bourgouin (DGAL/SDQPV), J. Fritsch (DGAL/SRAL Aquitaine), Services techniques des structures de production SCAAP Kiwifruit de France et Garlanpy et l'ensemble des producteurs ayant participé de près ou de loin à ce projet.

Références bibliographiques

- Balestra G.M., Taratufolo M.C., Vinatzer B.A., Mazzaglia A., 2013. A Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and Differentiation of Populations with Different Geographic Origin. *Plant Dis.* [En ligne]. avril 2013. 97, 4, 472-478. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-12-0590-RE> >
- Berge O., Monteil C. L., Bartoli C., Chandeysson C., Guilbaud C., Sands D.C., Morris C.E., 2014. A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS ONE* [En ligne]. 3 septembre 2014. Vol. 9, n°9,. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105547> > (consulté le 12 février 2016)
- Biondi E., Galeone A., Kuzmanović N., Ardizzi S., Lucchese C., Bertaccini A., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* detection in kiwifruit plant tissue and bleeding sap: Early detection of kiwifruit bacterial canker causal agent. *Ann. Appl. Biol.* [En ligne]. janvier 2013. 162, 1, 60-70. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/aab.12001> >
- Borschinger B., Bartoli C., Chandeysson C., Guilbaud C., Parisi L., Bourgeay J.F., Buisson E., Morris C.E., 2015. A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J. Appl. Microbiol.* [En ligne]. décembre 2015. p. n/a-n/a. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/jam.13017> >
- Brachet M.-L., Fritsch J., 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* : une bactérie sous haute surveillance. *Infos CTIFL*. 289, 30-34.
- Chapman J.R., Taylor R.K., Weir B.S., Romberg M.K., Vanneste J.L., Luck J., Alexander B.J.R., 2012. Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology* 102, 11, 1034–1044.
- Cunty A., Poliakoff F., Rivoal C., Cesbron S., Fischer-Le Saux M., Lemaire C., Jacques M.A., Manceau C., Vanneste J.L., 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol.* [En ligne]. 64, 3, 582-596. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/ppa.12297> >
- Gallelli A., L'Aurora A., Loreti S., 2011. Gene sequence analysis for the molecular detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: developing diagnostic protocols. *J. Plant Pathol.* Vol 93, No 2, p. 425–435.
- Gallelli A., Talocci S., Pilotti M., Loreti S., 2014. « Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker ». *Plant Pathol.* [En ligne]. Vol. 63, n°2, p. 264-276. Disponible sur : <https://doi.org/10.1111/ppa.12082>

Louws F. J., Fulbright D. W., Stephens C. T., De Bruijn F. J., 1994. « Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. » *Appl. Environ. Microbiol.* juillet 1994. 60, 7, 2286-2295.

Rees-George J., Vanneste J. L., Cornish D. A., Pushparajah I. P. S., Yu J., Templeton M. D., Everett K. R., 2010. « Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* PCR primers ». *Plant Pathol.* [En ligne]. 23 février 2010. 59, 3, 453-464. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02259.x> >

Scortichini M., Marcelletti S., Ferrante P., Petriccione M., Firrao G., 2012. « *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen: *Pseudomonas actinidiae* ». *Mol. Plant Pathol.* [En ligne]. septembre 2012. 13, 7, 631-640. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00788.x> >

Vanneste J.L., Poliakoff F., Audusseau C., Cornish D. A., Paillard S., Rivoal C., Yu J., 2011. « First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit in France ». *Plant Dis.* [En ligne]. 19 juillet 2011. 95, 10, p. 1311-1311. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0195> >

Vanneste J.L., Yu J., Cornish D.A., Tanner D.J., Windner R., Chapman J.R., Taylor R.K., Mackay J.F., Dowlut S., 2012. Identification, Virulence, and Distribution of Two Biovars of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand. *Plant Dis.* [En ligne]. 14 novembre 2012. 97, 6, p. 708-719. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-12-0700-RE> >

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)