

CENTRE NATIONAL D'ETUDES AGRONOMIQUES DES REGIONS CHAUDES
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE TROPICALE-DE MONTPELLIER

Diplôme d'Agronomie Tropicale
Filière : Protection des Cultures

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH (1896) A LA REUNION

- Identification de la race 3
- Etapes préalables à la mise au point d'un test de l'agressivité des isolats

Présenté par

Hélène SUZOR

Elève de 3ème année de L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Stage effectué à l'INSTITUT DE RECHERCHES AGRONOMIQUES ET DES
CULTURES VIVRIERES
Agence de La Réunion
Station de Saint-Pierre

Maître de stage :
Jean-Claude GIRARD

Année universitaire :
1987-1988

CENTRE NATIONAL D'ETUDES AGRONOMIQUES DES REGIONS CHAUDES
ECOLE SUPERIEURE D'AGRONOMIE TROPICALE DE MONTPELLIER

Diplôme d'Agronomie Tropicale
Filière : Protection des Cultures

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH (1896) A LA REUNION

- Identification de la race 3
- Etapes préalables à la mise au point d'un test de l'agressivité des isolats

Présenté par

Hélène SUZOR

Elève de 3ème année de L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE
AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Stage effectué à l'INSTITUT DE RECHERCHES AGRONOMIQUES ET DES
CULTURES VIVRIERES
Agence de La Réunion
Station de Saint-Pierre

Maître de stage :
Jean-Claude GIRARD

Année universitaire :
1987-1988

Ce stage a été réalisé à l'IRAT-REUNION, au laboratoire de phytopathologie de la station de Ligne-Paradis, sous la direction de Monsieur Jean-Claude GIRARD.

Je tiens à remercier :

- J.L. MARCHAND, Responsable de la station de Ligne-Paradis, pour son accueil chaleureux,
- J.C. GIRARD, pour son encadrement et tous les moyens qu'il a mis à ma disposition,
- J.J. CHERON et C. LAFFUTEUR, pour leur aide technique qui m'a été précieuse,
- M. DUVAL, Technicien au SUAD de la Plaine des Cafres, pour ses nombreux conseils.

Enfin, merci à M. DEVEAUX pour avoir assuré la frappe de ce rapport.

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH (1896) A LA REUNION

- Identification de la race 3,
- Etapes préalables à la mise au point d'un test de l'agressivité des isolats

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM E.F. SMITH (1896) IN REUNION ISLAND

- Identification of race 3,
- A test for assessing the aggressiveness of isolates : preliminary experiments

Hélène SUZOR

Enseignant du CNEARC responsable : Claude BOISSON, Maître de
Conférence en Protection
des Cultures

Etablissement où s'est déroulé le stage : IRAT-CIRAD-REUNION

(Institut de Recherches Agronomiques Tropicales et des
Cultures Vivrières, département du Centre de Coopération
International en Recherche Agronomique pour le Développement,
Agence de La Réunion)

Station de Ligne-Paradis
7 chemin de l'IRAT
97410 SAINT-PIERRE (REUNION) Tél : 25.77.11

Maître de stage : Jean-Claude GIRARD

RESUME

Pour la première fois à l'île de La Réunion, des souches de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith ont été isolées dans des champs de pomme de terre à 1 600 m d'altitude, et identifiées comme appartenant au biovar II. Les tests de croissance *in vitro* à températures contrôlées, l'infiltration de feuilles de tabac, et les inoculations artificielles en chambre climatique, tendent à montrer l'appartenance de ces souches à la race 3, particulièrement adaptée à la pomme de terre et à des conditions climatiques beaucoup plus fraîches que les races tropicales 1 et 2.

Par ailleurs, dans le cadre du criblage variétal de tomates et aubergines pour la résistance au flétrissement bactérien (race 1), il paraissait important de pouvoir sélectionner sur leur niveau d'agressivité les souches inoculées.

La mise au point d'un test de l'agressivité des isolats de *Pseudomonas solanacearum* a donc été amorcée.

Les premiers essais réalisés ont permis le choix d'une variété de tomate, du mode de conduite des semis et repiquages, et d'une méthode d'inoculation, susceptibles de permettre la discrimination des niveaux d'agressivité. L'efficacité de cette méthode n'a pas pu être testée dans le cadre de ce travail.

Mots-clés : *Pseudomonas solanacearum*, race 1, race 3, agressivité.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
GENERALITES SUR LE FLETRISSEMENT BACTERIEN	2
1 - Répartition géographique	2
2 - Plantes hôtes	2
3 - Symptômes	2
4 - Variabilité de l'agent pathogène	2
5 - Conservation et dissémination	4
5.1. Conservation	4
5.2. Dissémination	4
6 - Influence des facteurs de l'environnement	4
7 - Lutte	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RACE POMME DE TERRE	6
1 - Ecologie de la race pomme de terre	6
1.1. Répartition géographique	6
1.2. Hôtes	7
1.3. Conditions thermiques propres à la race 3	7
1.4. Conservation et dissémination de la race 3	8
1.4.1. Conservation	8
1.4.2. Dissémination	8
2 - Diagnostic de la race 3	9
2.1. Diagnostic de genre et d'espèce	9
2.1.1. Caractéristiques bactériologiques, physiologiques, biochimiques	9
2.1.2. Caractéristiques sérologiques	9
2.2. Tests biochimiques liés à la race 3	10
2.2.1. Détermination du biovar	10
2.2.2. Dénitrification	10
2.2.3. Production de pigment brun diffusible	10
2.2.4. Autres propriétés biochimiques	11
2.3. Tests physiologiques de croissance à température contrôlée in vitro	11
2.4. Tests sérologiques	12
2.5. Tests tabac	12
2.6. Tests d'inoculation à température contrôlée	13
2.7. Gamme d'hôtes	13
3 - Lutte	13
3.1. Lutte génétique	13
3.2. Utilisation de matériel sain : détection des infections latentes	14
3.3. Rotations et jachères	15

PSEUDOMONAS SOLANACEARUM SUR POMME DE TERRE CULTIVEE EN ALTITUDE	17
1 - Matériels et méthodes	18
1.1. Diagnostic de genre et d'espèce	18
1.1.1. Isolement, culture, conservation	18
1.1.2. Tests biochimiques	18
1.1.3. Tests sérologiques	19
1.1.4. Test d'hypersensibilité sur tabac	19
1.1.5. Autres tests biochimiques	19
1.2. Tests biochimiques de diagnostic race 3/biovar II	19
1.2.1. Détermination du biovar	19
1.2.2. Dénitrification	20
1.2.3. Production de pigments sur milieu enrichi en tyrosine	20
1.3. Tests physiologiques de croissance <i>in vitro</i> à température contrôlée	20
1.3.1. Sur milieu solide	20
1.3.2. En milieu liquide	20
1.4. Test d'infiltration de feuilles de tabac	21
1.5. Inoculations à température contrôlée	21
1.6. Gamme d'hôtes	22
2 - Résultats	22
2.1. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches isolées	22
2.2. Tests physiologiques de croissance à température contrôlée <i>in vitro</i>	22
2.2.1. En milieu solide	22
2.2.2. En milieu liquide	23
2.3. Test d'infiltration de feuilles de tabac	23
2.4. Inoculations à température contrôlée	26
2.5. Gamme d'hôtes	26
3 - Discussion	26
3.1. Tests biochimiques	26
3.2. Croissance <i>in vitro</i> à température contrôlée	27
3.2.1. Sur milieu solide	27
3.2.2. En milieu liquide	27
3.3. Tests d'infiltration de feuilles de tabac	28
3.4. Inoculations à température contrôlée	28
3.5. Gamme d'hôtes	28
4 - Conclusion de l'étude des isolats de <i>Pseudomonas solanacearum</i> sur pomme de terre en altitude	30

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE PRELIMINAIRE A LA MISE AU POINT D'UN TEST DE L'AGRESSIVITE DES SOUCHES DE <i>P. SOLANACEARUM</i>	32
1 - Virulence et agressivité des souches de <i>Pseudomonas solanacearum</i>	32
2 - Evaluation de l'agressivité	33
3 - Méthodes applicables à l'étude de l'agressivité	34
3.1. Inoculations dans la tige	35
3.2. Inoculation par les racines	35
3.3. Comparaison des techniques	35
3.4. Concentration bactérienne de l'inoculum	36
QUELQUES ETAPES PREALABLES A LA MISE AU POINT D'UN TEST DE L'AGRESSIVITE D'ISOLATS DE <i>PSEUDOMONAS SOLANACEARUM</i>	37
1 - Essai n°1 : comparaison des variétés pour différentes souches inoculées	38
1.1. Matériels et méthodes	38
1.2. Résultats	39
1.3. Discussion	39
2 - Essai n°2 : comparaison des variétés selon la concentration de l'inoculum	40
2.1. Matériels et méthodes	40
2.2. Résultats	40
2.3. Discussion	41
3 - Essai n°3 : amélioration de la technique d'inoculation	41
3.1. Matériels et méthodes	42
3.2. Résultats	42
3.3. Discussion	42
4 - Essai n°4 : choix de la concentration bactérienne de l'inoculum	43
4.1. Matériels et méthodes	43
4.2. Résultats	44
4.3. Discussion	44
5 - Conclusion	45

SIGLES

C.I.P. : Centro Internacional de la Papa

A.V.R.D.C. : Asian Vegetable Research and Development Center

I.R.A.T. : Institut de Recherches Agronomiques Tropicales
et des Cultures Vivrières

INTRODUCTION GENERALE

Le flétrissement bactérien, provoqué par *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith (1896), répandu dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes, est présent à l'île de La Réunion. Il provoque des dégâts importants pendant la saison chaude, de décembre à avril, dans les cultures de solanacées maraîchères : tomate, aubergine et pomme de terre.

L'IRAT de Saint-Pierre teste la résistance à la bactériose, en conditions locales, de variétés sélectionnées notamment à l'AVRDC (Taïwan). Le criblage variétal implique l'inoculation d'une souche de l'agent pathogène la plus agressive possible, pour limiter tout risque d'effondrement du niveau de tolérance des variétés proposées à la vulgarisation.

Le but du travail envisagé était donc la mise au point d'un test de l'agressivité des souches de *Pseudomonas solanacearum*, qui permette un choix raisonné des isolats utilisés ensuite pour les inoculations au champ.

D'autre part, à l'époque où a débuté ce stage, du flétrissement bactérien sur pomme de terre a été signalé dans des zones d'altitude de l'île jusque là réputées indemnes de cette maladie.

En effet, les températures moyennes relativement basses qui y règnent, interdisent le développement de la race de *Pseudomonas solanacearum* recensée à La Réunion. Cela permet la production, dans ces zones, de semences de pomme de terre garanties saines, pour la période de l'année où les semences d'importation ne sont pas disponibles.

Il était donc indispensable de caractériser les souches nouvellement isolées dans les Hauts de l'île, afin d'établir s'il s'agit ou non d'une race de *Pseudomonas solanacearum* différente de celles décrites lors des précédentes études, et de déterminer dans quelles mesures cela remet en cause la production locale de semences.

C'est essentiellement cette caractérisation qui a été réalisée, la mise au point du test d'agressivité n'a pu qu'être amorcée.

Ces deux parties sont exposées séparément.

GENERALITES SUR LE FLETRISSEMENT BACTERIEN

1 - Répartition géographique

Le flétrissement bactérien est une maladie vasculaire provoquée par une bactérie du sol, *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith (1836) recensée dans de nombreuses régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes. Des souches ont également été isolées à des altitudes de 3 000 m au Pérou, et ont survécu à un hiver en Suède. La liste des pays hébergeant *Pseudomonas solanacearum* est fournie en annexe 1.

2 - Plantes hôtes

Des plantes appartenant à plus de 30 familles différentes sont sensibles au flétrissement. Des familles importantes au plan économique sont particulièrement touchées : Solanacées, Musacées, Légumineuses. De nouvelles plantes hôtes sont fréquemment recensées. La liste présentée en annexe 2 n'est donc pas exhaustive.

3 - Symptômes

La maladie se caractérise le plus souvent par une épïnastie foliaire, puis une fanaison rapide du feuillage ; certaines plantes forment de nombreuses ébauches de racines sur la tige, puis la plante meurt ; en coupe transversale de la tige, on observe un brunissement des vaisseaux.

4 - Variabilité de l'agent pathogène

Pseudomonas solanacearum se caractérise par une grande variabilité des isolats, selon le lieu géographique et la plante d'origine, tant au niveau des propriétés biochimiques que pathogéniques.

BUDDENHAGEN et al (1962) différencient trois races selon la gamme d'hôtes :

- la race 1 attaque beaucoup de Solanacées, certains bananiers diploïdes, et d'autres plantes cultivées et non cultivées, appartenant à des familles très variées,

- la race 2 attaque les bananiers triploïdes et les *Heliconia* (maladie de Moko),

- la race 3 attaque la pomme de terre et la tomate, mais pas les autres Solanacées cultivées, et quelques plantes non cultivées.

Deux nouvelles races ont été proposées, l'une attaquant le gingembre aux Philippines (KAM et QUIMIO, in BUDDENHAGEN, 1985), l'autre le mûrier en Chine (HE et al., 1983), les deux appelées malencontreusement race 4 (BUDDENHAGEN, 1985).

HAYWARD (1964) classe les souches en quatre biovars, selon leur capacité à oxyder ou non une gamme de carbohydrates. Un cinquième biovar a été décrit en Chine (HE et al., 1983).

Tableau 1 - classification en Biovars

Oxydation de :	BIOVAR				
	I	II	III	IV	V
Maltose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

Les souches de race 3 appartiennent toutes au biovar II, par contre le biovar II renferme également des isolats de race 1 ; c'est, à l'origine, la seule correspondance étroite entre les deux systèmes de classification (BUDDENHAGEN, 1985). Par ailleurs, la race 4 sur mûrier correspond au biovar V (HE et al., 1983).

OKABE et GOTO (1961) séparent les souches japonaises en treize pathotypes, selon les résultats d'inoculations artificielles, ou d'infection en conditions naturelles, d'un certain nombre d'hôtes .

Une subdivision du biovar I en sous-groupes, basée sur d'autres propriétés biochimiques, a été proposée par HARRIS (1972).

Une subdivision de la race 1 en quatre pathotypes est faite par HE et al. (1983) pour des isolats de Chine.

D'autres subdivisions sont possibles sur la base d'études sérologiques et lysotypiques (ESCALANT-TAUZIER, 1985).

5 - Conservation et dissémination

5.1. Conservation

Pseudomonas solanacearum peut survivre à l'état libre dans le sol. Le temps de survie dépend des conditions d'environnement et de la race. Lors d'expériences dans des mélanges sol-sable, il n'excède pas 24 semaines (GRANADA et SEQUEIRA, 1983a). SCHMIT et ROBERT (1984) ont montré l'effet létal de la dessiccation des argiles sur *P. solanacearum*.

La bactérie se conserve surtout dans les résidus végétaux de cultures d'hôtes sensibles (GRANADA et SEQUEIRA, 1983 ; PERSLEY, 1985). SMITH (SHAMSUDDIN et al, 1978) signale ainsi des temps de survie d'au moins quatre ans dans des champs en jachère.

5.2. Dissémination

L'homme est le principal vecteur de la maladie, par la dissémination de matériel végétal contaminé, les blessures des racines lors de pratiques culturales favorisant la pénétration de la bactérie, le transport par les eaux d'irrigation, l'utilisation d'outils contaminés (BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964 ; KLOOS, 1985 ; PERSLEY, 1985).

Les insectes sont vecteurs de la maladie de Moko provoquée par la race 2 (BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964).

Les nématodes favorisent la pénétration de la bactérie (SUATMADJI, 1985).

La dispersion locale du pathogène de racine à racine est signalée pour la tomate et le tabac (KELMAN ET SEQUEIRA, 1965).

6 - Influence des facteurs de l'environnement

Les saisons chaudes et humides sont les plus favorables à l'expression du flétrissement bactérien, cependant les gammes de température varient selon les races. La bactérie est sensible à la sécheresse et à l'inondation du sol (BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964 ; PERSLEY, 1985 ; AKIEW, 1985).

Les sols ferrallitiques à PH compris entre 5,5 et 6,5 sont les plus facilement contaminés, bien que la bactérie ait déjà été observée à PH 4,5 (MESSIAEN, 1975 ; GRAHAM et LLOYD, 1979). BERREAU et MESSIAEN (1975) signalent en Guadeloupe des sols réceptifs à la bactérie (sols à Kaolinite), et d'autres

résistants (sols à Montmorillonite), sans que ces différences soient parfaitement expliquées.

7 - Lutte

On lutte contre le flétrissement bactérien essentiellement par la résistance variétale, bien établie pour le tabac et l'arachide. Les résistances sélectionnées chez la pomme de terre et la tomate s'effondrent souvent avec les changements d'environnement, notamment l'augmentation de température (THURSTON, 1976 ; MEW & HO, 1977).

La lutte chimique reste coûteuse et d'une efficacité limitée (MESSIAEN, 1975).

L'action des antibiotiques, dont l'utilisation n'est possible que si la législation l'autorise, a été surtout testée *in vitro* (CIP, 1984).

Il semble qu'on puisse induire une résistance chez la pomme de terre par l'introduction dans les plantes de mutants avirulents (KEMPE et SEQUEIRA, 1983). On peut protéger les semences de pomme de terre en les traitant avec une rhizobactérie qui colonise la surface des racines (SEQUEIRA, 1982).

Le greffage est efficace pour la tomate et l'aubergine, mais c'est une méthode fastidieuse et coûteuse en main d'oeuvre. Le porte-greffe le plus courant est *Solanum torvum* (FELIX, 1973 ; PEREGRINE, 1982).

Des rotations ou des jachères d'au moins deux ans réduisent l'incidence du flétrissement, surtout pour les races 2 et 3 dont la gamme d'hôtes est très étroite (RAYMUNDO et ACASIO, 1982 ; MATEO et al, 1982 ; AUTRIQUE, 1982). Elles sont efficaces pour la race 1 si elles sont accompagnées d'une suppression des adventices pouvant héberger la bactérie (HAYWARD, 1985).

Le chaulage des sols contaminés, l'introduction de fumure dans le sous-sol, peuvent contribuer également à la réduction de la maladie (MESSIAEN, 1975 ; TANAKA, 1976). Aux Antilles, des quantités élevées d'azote réduisent fortement le flétrissement bactérien pour la seconde culture après l'apport au champ, et durant 5 années successives de cultures de Solanacées (PRIOR, 1987).

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA RACE POMME DE TERRE

Il est question ici, non pas de reprendre les généralités sur le flétrissement bactérien, qui restent vraies pour la race 3, mais de se focaliser sur ses caractéristiques propres.

Rappelons qu'il s'agit ici de la race 3 au sens défini par BUDDENHAGEN et al(1962).

1 - Écologie de la race pomme de terre

1.1. Répartition géographique

La race 3 est présente sur tous les continents, et c'est semble-t-il la race de *Pseudomonas solanacearum* la plus répandue dans le monde.

On la trouve dans la plupart des zones tropicales et subtropicales cultivées en pomme de terre, mais elle est en général dans ce cas limitée aux terres de haute altitude (supérieures à 1000 m, jusqu'à 3000 m au Pérou) (FRENCH, 1979; BUDDENHAGEN, 1985 ; FRENCH, 1985).

Elle s'est également répandue de pays en pays dans les zones tempérées, sa distribution étant alors limitée du fait de sa gamme d'hôtes étroite (GRAHAM et al., 1972). On la signale sur le pourtour méditerranéen (en Egypte : EL GOORANI, 1976), dans certaines zones d'Europe (au Portugal : HARRISON, 1961). La latitude la plus nordique où on l'a observée est la Suède (59°N), où la bactérie a été introduite accidentellement à partir de tubercules importés (OLSSON, 1976).

Certains la signalent cependant à basse altitude en zone tropicale, soit dans des terres vierges (MARTIN et al., 1981, en Amazonie), mais il est possible dans ce cas qu'il y ait confusion entre race 3 et biovar II, correspondance qui n'est pas toujours vérifiée (MARTIN et al., 1981 ; BUDDENHAGEN, 1985) ; soit lors d'introduction accidentelle par des semences produites en zone d'altitude (NYANGERI et al., 1984, au Kenya).

D'après LLOYD (1978), la race 3 domine dans les zones tempérées d'Australie, mais également dans les zones subtropicales où une monoculture de pomme de terre est pratiquée ; dans les mêmes zones où sont pratiquées des rotations pomme de terre et autres Solanacées, la race 1 domine. Les deux races attaquant la pomme de terre peuvent cohabiter dans un même champ (KATAYAMA et KIMURA, 1984 ; FRENCH, 1986).

En fait, il semble que la répartition de la race 3 soit due plus à son affinité quasi exclusive pour la pomme de terre qu'à une préférence pour des conditions de température plus fraîches, auxquelles elle est cependant beaucoup plus adaptée que les autres races.

1.2. Hôtes

BUDDENHAGEN et al. en 1962 ont défini la race 3 comme étant spécifique de la pomme de terre, mais pouvant également attaquer la tomate.

De nombreux travaux réalisés dans des régions très diverses confirment la restriction de la race 3, en conditions naturelles à ces deux cultures (HAYWARD, 1964; PERSLEY, 1985; FRENCH, 1985). Une exception est signalée en Colombie, où la race 3 attaque *Cyphomandra betacea*, la tomate arbuste (MARTIN et NYDEGGER, 1982).

Quelques plantes hôtes non cultivées ont également été répertoriées. On peut citer : *Solanum nigrum* (HAYWARD, 1985), *Solanum cinerum* (GRAHAM et LLOYD, 1978), *Solanum dulcamara* (OLSSON, 1976). Elles ne présentent pas toujours les symptômes de flétrissement, même si elles sont envahies par la bactérie.

VOLCANI et PALTÍ (1960), ont réalisé des inoculations artificielles avec la race 3 sur tabac, piment, aubergine, arachide ; seule l'aubergine a flétri. Au Nigéria, ERINLE (1976) confirme le flétrissement de l'aubergine en inoculation artificielle; il a également fait flétrir l'arachide lors d'un test, résultat qui ne s'est jamais reproduit.

1.3. Conditions thermiques propres à la race 3

C'est aussi en grande partie par sa tolérance à des températures beaucoup plus basses que la race 3 diffère des deux autres.

Elles est capable de survivre, dans le sol, dans des conditions hivernales auxquelles ne résistent pas les autres : dans des débris végétaux en Suède où la température du sol descend deux mois en dessous de 0°C (OLSSON, 1976) ; dans des sols du New Jersey, quand la température de l'air descend à -17,8°C (VAUGHAN, 1944, in BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964).

Mais la bactérie n'est pas active à de telles températures; il faut également cerner la gamme de température qui est optimale à l'expression de la maladie, et jusqu'à quelle température elle risque de s'exprimer.

KATAYAMA et KIMURA (1984) ont montré au Japon la coexistence dans un même champ des deux races attaquant la pomme de terre, avec une augmentation de la proportion d'isolats de race 3 en fin de saison de culture, quand la température est plus fraîche. La culture est attaquée par les deux races en période chaude, avec sans doute une prédominance de la race 1, puis par la race 3 en période fraîche.

1.4. Conservation et dissémination de la race 3

1.4.1. Conservation

De façon générale, la race 3 est signalée par de nombreux auteurs comme survivant moins longtemps dans le sol que les autres races, quelque soit le type de sol (HAYWARD, 1985).

Il est difficile de déterminer avec certitude quels facteurs expliquent cette différence (RAMOS, 1976).

La race 3 serait, d'après AKIEW (1985), plus sensible à la sécheresse que la race 1.

En fait, la conservation des deux races ne dépend pas des mêmes facteurs. La race 3 survit sous les climats tempérés dans les résidus de cultures, parce que le froid réduit considérablement l'activité microbienne qui dégrade les débris végétaux en climat tropical ; elle a par contre très peu d'hôtes alternatifs, qui en général ne survivent pas pendant la saison froide. La race 1 au contraire se maintient beaucoup plus par les hôtes alternatifs, entre deux cultures de pomme de terre (LLOYD, 1976 ; GRAHAM et al., 1979).

Tous les travaux s'accordent à attribuer un rôle primordial aux tubercules de pomme de terre dans la survie de la race 3 (SCHAMSUDDIN et al., 1978 ; NYANGERI et al., 1984).

1.4.2. Dissémination

Les tubercules sont le moyen de dissémination privilégié de la race 3, qui a la propriété de s'y maintenir sous forme d'infection latente : les tubercules restent d'apparence saine, et développent des plants visiblement sains, mais eux-mêmes sources d'infection latente, tant que les conditions restent défavorables à l'expression de la maladie (essentiellement températures trop basses) (GRAHAM et al., 1979).

Symptômes d'une infection de
Pseudomonas solanacearum sur tubercule

PLANCHE 1

2 - Diagnostic de la race 3

2.1. Diagnostic de genre et d'espèce

Les symptômes sur la partie aérienne des plants de pomme de terre sont un flétrissement qui débute souvent par une ou deux feuilles, puis s'étend aux autres, et un jaunissement du feuillage. En coupe, on observe un brunissement des vaisseaux de la tige.

Les tubercules infectés examinés en coupe transversale présentent le plus souvent un brunissement de l'anneau vasculaire, bien qu'on cite des exceptions pour des souches du Portugal et du Kenya. En pressant le tubercule coupé en deux, on observe des exsudats crémeux sortant des vaisseaux infectés (planche 1). A un stade avancé de la maladie, des exsudats bactériens apparaissent au niveau des yeux, et le tubercule finit par pourrir (KELMAN, 1981).

En présence de symptômes de flétrissement, on peut réaliser un test très simple, qui consiste à tremper dans un verre d'eau l'extrémité d'une tige sectionnée ; l'observation d'exsudats bactériens blancs très caractéristiques laisse suspecter la présence de *Pseudomonas solanacearum*.

2.1.1. *Caractéristiques bactériologiques, physiologiques, biochimiques*

Pseudomonas solanacearum est une bactérie asporogène, en forme de court bâtonnet ; les formes virulentes sont souvent non flagellées, et non mobiles, contrairement aux formes avirulentes (KELMAN et HRUSCHKA, 1973). On les distingue sur milieu de Kelman (enrichi en Tétrachlorure de Tétrazolium) (Kelman, 1954).

Pseudomonas solanacearum appartient au groupe des bactéries phytopathogènes *Pseudomonas* non fluorescents (gram - oxydase +, voie oxydative d'utilisation du glucose, Nitrate réductase +, accumulation de granules de poly- β -hydroxybutyrate, pas de pigments sur King B).

Les souches varient pour d'autres propriétés biochimiques et physiologiques (hydrolyse de l'amidon, de la gélatine, présence d'une Tween estérase...) (HAYWARD, 1983).

2.1.2. *Caractéristiques sérologiques*

La relation entre l'espèce et le sérotype est suffisamment stricte chez *Pseudomonas solanacearum* pour que la sérologie qui a l'avantage d'être une méthode rapide, soit utilisée avec

un minimum de risques d'erreur (DIGAT et CAMBRA, 1976 ; ESCUDIE et DIGAT, 1965).

2.2. Tests biochimiques liés à la race 3

2.2.1. *Détermination du biovar*

Toute souche de race 3 répond également aux caractéristiques du biovar II, l'inverse n'étant pas toujours vrai. On ne peut donc se fier à la seule détermination du biovar pour savoir si une souche appartient à la race 3 (HAYWARD, 1964 ; BUDDENHAGEN, 1985).

Rappelons les caractéristiques des biovars (cf. tableau 2).

Tableau 2 - caractéristiques des Biovars

Oxydation de	BIOVAR				
	I	II	III	IV	V
Maltose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Cellobiose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	+	+	-

0 - + réaction positive
- réaction négative

2.2.2. *Dénitrification*

D'après HAYWARD (1964), les souches de biovar II ne réalisent pas la dénitrification, c'est-à-dire la production de gaz en milieu anaérobie à partir de nitrate, encore appelée respiration des nitrates (LELLIOTT et STEAD, 1987). Une souche capable de dénitrification ne peut donc appartenir au biovar II ; par contre, certaines souches de biovar I sont également incapables de dénitrifier.

Au contraire, SWANEPOEL (1988) observe la dénitrification d'isolats de biovar II, et l'absence de dénitrification d'isolats de biovars III.

2.2.3. *Production de pigment brun diffusible*

La production de pigment brun sur milieu enrichi en tyrosine est citée comme critère de différenciation des races, essentiellement race 1/race 2 (cette dernière ne produisant aucun pigment) ; la race 3 produit la coloration, mais en

quantité beaucoup plus faible à 27°C, que les isolats de race 1 (HARRISON, 1961 ; THURSTON, 1963 ; FRENCH et SEQUEIRA, 1970).

2.2.4. Autres propriétés biochimiques

HAYWARD (1964, 1976) a comparé les quatre biovars pour beaucoup d'autres propriétés biochimiques (résistance à NaCl, présence d'une phosphatase, utilisation de différentes sources de carbone, etc...);, mais la plus sélective reste l'utilisation des six carbohydrates (lactose, maltose, cellobiose, dulcitol, mannitol, sorbitol).

2.3. Tests physiologiques de croissance à température contrôlée *in vitro*

In vivo, la race 3 est adaptée à des températures beaucoup plus basses que les autres races.

D'après CIAMPI et SEQUEIRA (1980a), la croissance *in vitro* à basse température ne reflète pas toujours la capacité à induire des symptômes à basse température.

En effet, plusieurs de leurs isolats identifiés comme étant de race 3 (isolés de pomme de terre et appartenant au biovar II), n'ont pas provoqué de symptômes lors d'inoculations à 16°C, alors que leurs taux de croissance à cette même température étaient comparables à ceux d'isolats de race 3 virulents.

Ils envisagent cependant une perte de la virulence au cours de la conservation *in vitro*.

En fait, de nombreux auteurs signalent des différences de comportement pour la croissance *in vitro* à température contrôlée, qui permettent une sélection nette entre isolats de race 1 et de race 3.

Les résultats de HARRISON (1961), de THURSTON (1963) et de HAYWARD (1976), indiquent un optimum de croissance en milieu de culture solide de 28°C pour les isolats de race 3/biovar II contre 37°C pour les biovars III et IV (HAYWARD, 1976).

KATAYAMA et KIMURA (1984) indiquent à quelques exceptions près, une croissance plus rapide à 16°C de leurs biovars II, que de leurs biovars IV, en milieu liquide non agité, la situation étant inversée à 35°C, tous les isolats provenant de la même culture de pomme de terre.

2.4. Tests sérologiques

Nous avons déjà souligné la grande spécificité sérologique de *Pseudomonas solanacearum*.

D'après DIGAT et CAMBRA(1976), la différenciation des races de *Pseudomonas solanacearum* basée sur la spécificité sérologique est envisageable, puisque chaque race semble posséder ses propres caractères antigéniques, en plus des caractères communs à l'espèce.

SCHAAD et al. (1978) ont pu différencier des races de *Pseudomonas solanacearum* au Brésil sur la base des antigènes membranaires. La sérologie ne semble cependant pas encore directement applicable au diagnostic de la race.

2.5. Tests tabac

LOZANO et SEQUEIRA (1970) différencient les 3 races par la méthode d'infiltration de feuilles de tabac. Leurs résultats sont résumés dans le tableau 3.

tableau 3 - temps et type de réaction selon la race après infiltration de feuilles de tabac *Nicotiana tabacum* cultivar "Botton Spécial" avec une suspension de *Pseudomonas solanacearum* à une concentration de l'ordre de 10^7 à 10^8 bactérie /ml

	10 à 12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
Race 1			Nécrose brun noir avec halo jaune débutant	Halo jaune de plus en plus net	Invasion des tissus vasculaires voisins
Race 2	- réaction d'hypersensibilité - tissus de la zone infiltrée légèrement chlorotiques et translucides	- tissus de la zone infiltrée décolorés, nettement différenciés de la zone non inoculée			zone infiltrée très mince, blanche et translucide
Race 3				Décoloration jaune des seules zones infiltrées	- légère accentuation de la décoloration - pas d'invasion des tissus voisins

2.6. Tests d'inoculation à température contrôlée

Nous avons déjà signalé que les tests de croissance *in vitro* à basse température ne reflètent pas forcément la capacité à induire un flétrissement à une telle température; il est donc indispensable de pratiquer des tests d'inoculation à différents régimes de température pour diagnostiquer la race 3, (FRENCH, 1985), sur pomme de terre de préférence, et sur tomate.

2.7. Gamme d'hôtes

La race 3 ne fait théoriquement flétrir que la pomme de terre, la tomate, la tomate arbuste et quelques Solanacées non cultivées, ainsi que l'aubergine en conditions artificielles.

Le flétrissement d'autres plantes en inoculations artificielles peut donc faire suspecter une erreur de diagnostic. Cependant, la méthode d'inoculation intervient également. D'après FRENCH (1979), LALLMAHOMED et RICAUD (1978), l'inoculation par piqûre dans la tige à travers une goutte de suspension (WINSTEAD et KELMAN, 1952) est trop sévère, et provoque des flétrissements sur des plantes non hôtes en conditions naturelles. Par contre, FAHY et HAYWARD (1983) la recommandent.

3 - Lutte

3.1. Lutte génétique

L'espèce *Solanum phureja*, cultivée dans les Andes, et notamment en Colombie a probablement évolué avec la race 3, et c'est d'elle qu'on a pu tirer la résistance la plus efficace. Cette résistance a été intégrée à *S. tuberosum*, dans un programme initié en 1967 par ROWE et SEQUEIRA, à l'Université du Wisconsin, travail ensuite poursuivi au CIP, au Pérou (BUDDENHAGEN, 1985 ; SCHMIEDICHE, 1985).

Parallèlement, on a introduit dans la sélection les gènes de l'espèce sauvage *S. demissum*, codant pour la résistance à *Phytophthora infestans*, autre problème majeur de la pomme de terre (SCHMIEDICHE, 1985).

La résistance chez *S. phureja* est un caractère dominant, facilement transmissible. Peu de gènes, sans doute trois ou quatre, confèrent la résistance à une souche de *P. solanacearum*. Par contre, il semble que beaucoup de gènes soient nécessaires pour l'extension du spectre de résistance à plusieurs souches. C'est pourquoi les programmes de sélection se sont heurtés à des pertes de résistance, lorsque leurs

clones étaient confrontés à de nouveaux isolats (phénomène qui s'est manifesté aussi bien pour la race 1 que pour la race 3) (SEQUEIRA et ROWE, 1969 ; TORRES et al., 1985 ; FRENCH et DE LINDO, 1982).

Cette résistance n'est pas absolue. Elle diminue beaucoup en présence de nématodes des racines (JATALA et al., 1982). Mais elle s'effondre également lorsque ces clones, sélectionnés en conditions tempérées, sont testés en zone tropicale, à haute température et faible intensité lumineuse (THURSTON, 1976 ; FRENCH et DE LINDO, 1982).

C'est pourquoi le CIP a utilisé à partir de 1980 un clone sélectionné à l'AVRDC, adapté à la chaleur, et dont les sources de résistance ont été tirées de deux espèces sauvages, *S. raphanifolium* et *S. chacoense* (SCHMIEDICHE, 1985).

Plus récemment, le CIP s'est orienté vers un élargissement du spectre de résistance, principalement basé sur le caractère polygénique de la résistance chez les espèces de *Solanum* sauvages, contrairement au cas de *S. phureja* où elle repose sur un petit nombre de gènes majeurs. De nouvelles sources de résistance ont été tirées de trois espèces différentes, *S. sparsipilum*, *S. chacoense*, et *S. microdontum* (SCHMIEDICHE, 1985), la première codant également pour la résistance aux nématodes des racines (*Meloidogyne spp.*) (MARTIN, 1979). Ces nouvelles sources ont été combinées à celles issues de *S. phureja*, et la population obtenue a été testée à la fois contre les races 1 et 3, les deux pouvant cohabiter à moyenne altitude (SCHMIEDICHE, 1985 ; FRENCH, 1986).

CIAMPI et SEQUEIRA (1980b) ont également montré l'absence totale d'infection des tubercules, chez un clone dont la résistance est issue de *S. phureja*. Il existerait donc des gènes codant pour la résistance aux infections latentes, et qui pourraient être inclus dans les programmes de sélection.

JATALA et al. (1975) ont montré que des taux élevés de résistance à *Meloidogyne incognita* et à *Pseudomonas solanacearum* étaient souvent associés.

Toujours selon JATALA et al. (1982), il est plus simple de procéder à un premier criblage variétal pour la résistance au nématode, puis parmi les variétés retenues, à un second criblage pour la résistance à *Pseudomonas solanacearum*.

3.2. Utilisation de matériel sain : détection des infections latentes

Il faut s'assurer du bon état sanitaire des semences utilisées, car la possibilité d'infections latentes est le principal danger dans la dissémination de la race 3 sur de très vastes zones, même si théoriquement une région où la bactérie a été détectée doit être mise en quarantaine pour la

production et l'exportation de semences. Mais les agriculteurs n'ont pas toujours les moyens de se procurer des semences garanties saines. C'est notamment le cas de La Réunion.

Les infections latentes peuvent être détectées en incubant les tubercules deux à trois semaines à 30°C et sous forte humidité (MARTIN et FRENCH, 1985).

CIAMPI et SEQUEIRA (1980) désinfectent les tubercules en surface, puis prélèvent au hasard des petites tranches qu'ils mettent à incuber 24 h à 28°C, dans un milieu liquide. Ils étalent ensuite deux anses de la suspension sur milieu de Kelman (KELMAN, 1954) et après 48 h à 28°C observent la présence ou non de colonies de *Pseudomonas solanacearum*.

JANSE (1988) propose une méthode basée sur le marquage par anticorps en immunofluorescence indirecte, les résultats positifs étant confirmés par un test de pouvoir pathogène sur tomate. La technique, réalisée sur des échantillons de 200 tubercules, sur lesquels on prélève de petits fragments de taille définie, dans la zone du "talon" (zone d'insertion du stolon) permet de détecter de 10^2 à 10^4 bact/ml.

3.3. Rotations et jachères

D'après AUTRIQUE (1982) qui a comparé les effets de différentes cultures (maïs, haricot, pois, blé) en rotation avec la pomme de terre ainsi que les effets d'une jachère, en présence de race 3, c'est plus la perturbation amenée par la rotation, que la nature de la culture qui importe. Il préconise deux ans de rotation ou de jachère avant une nouvelle culture de pomme de terre sur un sol contaminé.

Par ailleurs, pour éviter la dispersion locale de la bactérie des racines d'une plante malade vers une plante saine, il espace les plants d'1 m et pratique un buttage séparé pour chaque plant : le nombre de plants flétris passe ainsi de 47 % à 1,9 %.

D'après SHAMSUDDIN et al. (1978), une jachère nue ou enherbée d'un an et demi n'a quasiment aucun effet sur le taux de contamination par la race 3, alors qu'une rotation avec un mélange ray-grass, dactyle et trèfle a, pour la même durée, un effet très favorable. En revanche au bout de deux ans et demi, l'effet de ces différentes rotations est identique, la bactérie n'étant plus décelable par une culture de pomme de terre sensible.

HARRIS (1976), sur les hauts plateaux du Kenya, préconise une rotation d'au moins deux ans, avec un pâturage ou une culture non hôte.

Finalement, d'après FRENCH (1979), il est possible de contrôler le flétrissement des pommes de terre provoqué par la race 3, en combinant la résistance variétale avec différents facteurs réduisant l'inoculum, essentiellement des rotations d'au moins deux ans.

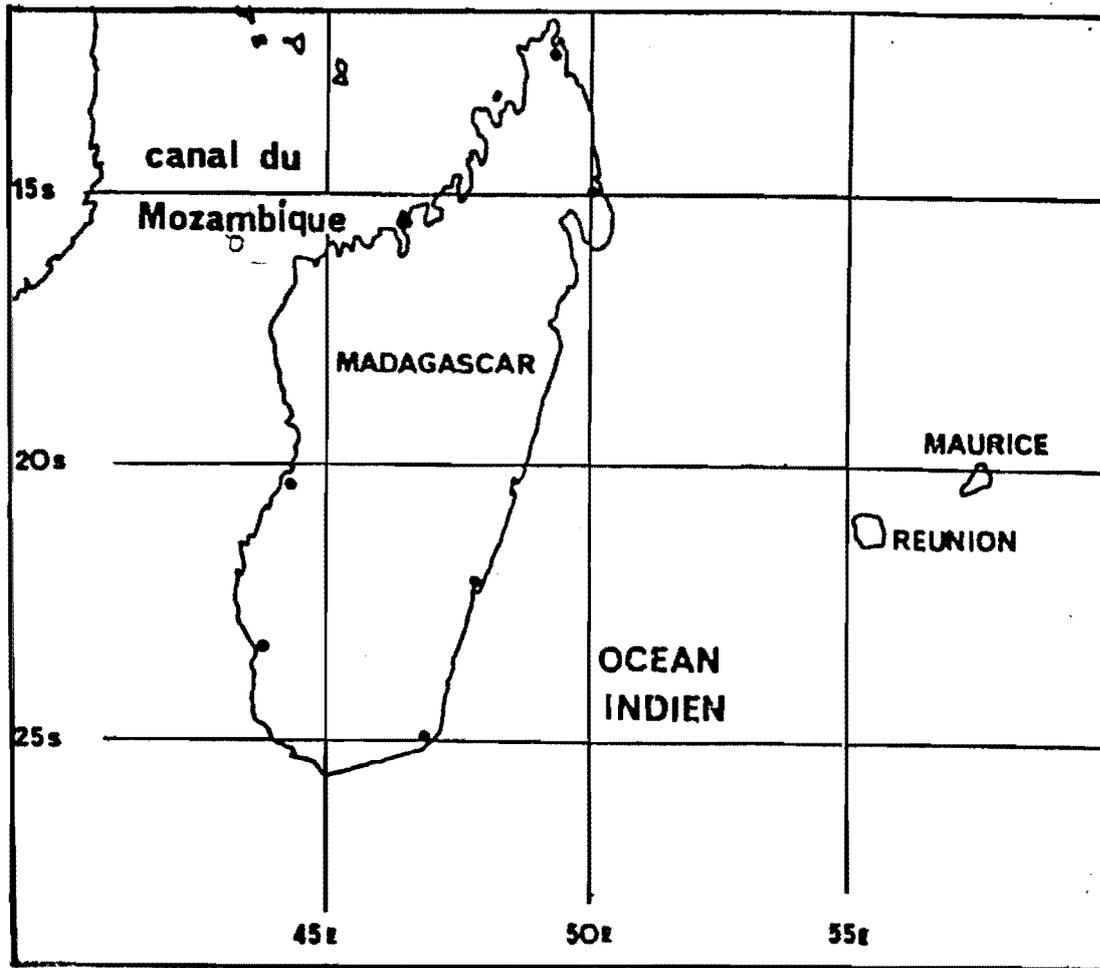


Fig. 1 : Situation géographique de l'île de La Réunion

ETUDE DES ISOLATS DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM* SUR POMME DE TERRE CULTIVEE EN ALTITUDE

L'île de La Réunion est située dans l'Océan Indien, par 55°30 de longitude et 21° de latitude Sud, à 800 km à l'Est de Madagascar (fig.1).

Elle est constituée d'une zone littorale assez étroite, et de deux massifs volcaniques accolés, séparés par des plaines de haute altitude (1 000 à 1 700 m).

Le climat, de type tropical, présente deux saisons :

- l'hiver, de mai à novembre, où les températures moyennes du mois le plus frais (août) varient entre 20 et 22°C à basse altitude,
- l'été, de décembre à avril, saison chaude et humide, où les températures moyennes du mois le plus chaud varient entre 26 et 28°C à basse altitude.

En altitude, le climat devient plus tempéré : température plus fraîche, pluviométrie plus abondante.

Dans les précédentes études sur le flétrissement bactérien à La Réunion, seule la race 1 est signalée, et les isolats sont surtout de biovar III, quelques-uns de biovar I ou IV. La gamme d'hôtes répertoriés est relativement restreinte : *Anthurium x andreanum* (anthurium), *Arachis hypogaea* (arachide), *Capsicum annuum* (poivron), *C. frutescens* (piment oiseau), *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Pelargonium ? capitatum x radens* ou *graveolens* (géranium rosat type "rosé"), *Phaseolus vulgaris* (haricot), *Solanum melongena* (aubergine), *Solanum tuberosum* (pomme de terre), *Strelitzia reginae* (oiseau de paradis). Aucun symptôme n'avait été observé au delà de 1000 m.

Cette année, pour la première fois, du flétrissement a été signalé en altitude, à 1600 m, dans une zone où les températures moyennes pour la période de culture ont varié de 15,7°C (en avril) à 17,8°C (en janvier); les températures moyennes minimales ont été de 11°C en avril, de 13,7°C en janvier, les températures moyennes maximales de 20,2°C en avril, de 21,9°C en janvier.

Nous avons donc effectué des prélèvements de plants et de tubercules de pomme de terre infectés, dans les champs à 1600m, et également dans les zones de plus basse altitude où du flétrissement sur pomme de terre est signalé chaque année (localisation et altitude des prélèvements : tableau 4, 2).

1 - Matériels et méthodes

1.1. Diagnostic de genre et d'espèce

1.1.1. *Isolement, culture, conservation*

Les tiges des plants prélevés sont sectionnées, on observe les exsudats bactériens par le test du verre d'eau.

La section de la tige est désinfectée, et de fines coupes de tissus vasculaires, effectuées dans les zones présentant une couleur brunâtre anormale, sont mises à exsuder 15 à 30 mn dans quelques cm³ d'eau stérile (JENKINS et KELMAN, 1976).

Une goutte de la suspension ainsi obtenue est ensuite étalée en trois secteurs, sur milieu de Kelman en boîte de Pétri (annexe 3). Après 48 h d'incubation à 27°C, on choisit, d'après l'aspect (muqueux blanchâtre à centre rosé), trois ou quatre colonies de type virulent qui sont repiquées séparément.

Pour la conservation, et notamment le maintien de la virulence (KELMAN et JENSEN, 1951), les souches sont repiquées sur milieu de PYDAC (Annexe 3), puis après 48 h de croissance, recouvertes d'huile de paraffine stérile. Elles sont également mises en suspension dans de petites ampoules d'eau stérile ; maintenues à 10-15°C, elles se conservent ainsi un à deux ans, et sont facilement disponibles pour les tests ultérieurs (SLY, 1983).

1.1.2. *Tests biochimiques*

- Gram à la potasse (d'après RYU, 1938 in SUSLOW et al., 1982)
- Formation d'inclusions de Poly-β-hydroxybutyrate (OSTLE et HOLT, 1982)
- Présence d'une cytochrome C oxydase (disques imprégnés de réactifs de Kovacs)
- Métabolisme du glucose sur milieu Hugh et Leifson (GARDAN ET LUISETTI, 1983)
- Réduction des nitrates sur milieu EPN (GARDAN et LUISETTI, 1983)
- Formation de pigments fluorescents sur milieu de King B (GARDAN ET LUISETTI, 1983).

1.1.3. Tests sérologiques

- Agglutination sérologique en plaque de microtitration (Annexe 6)
- Immunofluorescence indirecte (LELLIOTT et STEAD, 1987).
Le sérum a été préparé sur lapin en 1987 au laboratoire de l'IRAT à Saint-Pierre, à partir d'une souche réunionnaise de *Pseudomonas solanacearum*.

1.1.4. Test d'hypersensibilité sur tabac

L'infiltration des feuilles de tabac à une concentration de l'ordre de 10^8 bact/ml est systématiquement faite pour confirmer le pouvoir pathogène des souches.

1.1.5. Autres tests biochimiques

D'autres tests ont été réalisés d'après GARDAN et LUISETTI (1983), pour évaluer l'homogénéité des caractéristiques biochimiques au sein des isolats:

- présence d'une arginine dihydrolase,
- hydrolyse de l'amidon,
- hydrolyse de la gélatine, en boîte de Pétri (technique de Frazier) et en culot,
- mise en évidence d'une Tween estérase dans un milieu au Tween 80.

1.2. Tests biochimiques de diagnostic race 3/biovar II

1.2.1. Détermination du biovar

Elle est réalisée selon la méthode de HAYWARD (1964, 1976). Le milieu de base (milieu ARJ modifié, annexe 4) est dispensé en tubes.

On y ajoute les six carbohydrates (dulcitol, mannitol, sorbitol, cellobiose, maltose, lactose) dont on étudie l'oxydation, plus deux sucres témoins dont on est sûr qu'ils sont oxydés : glucose et saccharose.

Les tubes sont ensemencés avec 50 μ l d'une suspension bactérienne, préparée à partir d'une culture sur milieu de Kelman de 24 h.

Huit tubes témoins non ensemencés sont également préparés avec chacun des huit carbohydrates. Le tout est réalisé en double.

Le virage de la couleur des milieux est suivi pendant 21 jours, à raison d'une lecture tous les 2 jours.

Pour la plupart des souches, les tests ont été réalisés deux ou trois fois.

1.2.2. Dénitrification

Cette propriété est étudiée selon la méthode de STANIER et al. (1966) (FAHY et HAYWARD, 1983).

Les bactéries sont précultivées sur le milieu (annexe 5) 24 à 48 h, puis on ensemence par 50 µl de suspension à 10⁸ bact/ml environ, que l'on fait descendre dans le milieu ramolli (40°C) en faisant rouler le tube entre les paumes des mains (on évite ainsi l'introduction d'oxygène).

1.2.3. Production de pigments sur milieu enrichi en Tyrosine

Le milieu, préparé selon HAYWARD (1964) (annexe 5) est dispensé en tubes, en pente.

Le milieu ensemencé est inoculé à 27°C, et la production de pigment est suivie une à deux fois par jour pendant sept jours.

1.3. Tests physiologiques de croissance *in vitro* à température contrôlée

1.3.1. Sur milieu solide

4 souches de biovar II : PdT 7-6, PdT 7-8, PdT 12-2, PdT 16-1 ; 3 souches de biovar III : PdT 9-3, PdT 9-5, An 5, sont ensemencées sur milieu de Kelman par dépôt de 4 spots, par boîte, de 50 µl de suspension diluée à 10² bact./ml, ceci répété sur trois boîtes par souche. Les boîtes sont mises à incuber à 10°C, 15°C, 27°C, 37°C.

1.3.2. En milieu liquide

La croissance est suivie par la densité bactérienne mesurée quotidiennement à l'aide d'un colorimètre, à 530 nm.

Les souches sont repiquées sur milieu de Kelman sans Tetrachlorure de Tetrazolium (pour éviter la coloration rose qui modifierait la mesure de la densité).

3 souches de biovar II : PdT 7-7, PdT 12-4, PdT 7-8 ; 3 souches de biovar III : PdT 9-5, An5, T 30 sont ensemencées par 50 µl de suspension, à environ 10⁵ bact/ml, par tube de

milieu liquide LP (annexe 3).

Les tubes sont mis à incuber à 27°C et 37°C.

1.4. Test d'infiltration de feuilles de tabac

2 souches de biovar II : PdT 7-6, PdT 7-8 ; 2 souches de biovar III : An3, PdT 9-3, sont inoculées.

Etant donné qu'il s'agit d'observer une réaction qualitative, ainsi qu'un délai d'apparition des symptômes, il paraît nécessaire de s'affranchir des interférences possibles avec les stades de développement des feuilles.

Chaque demi-feuille de tabac est inoculée avec une souche, sur deux espaces internervaires ; la demi-feuille correspondante est inoculée avec une autre souche. Un espace internervaire par feuille est inoculé à l'eau stérile (témoin).

Toutes les combinaisons possibles entre souches sont réalisées. Chaque combinaison est répétée trois fois, pour trois stades de feuilles, et à chaque fois sur un plant de tabac différent.

Nous utilisons une variété locale de tabac, "IRA Bourbon".

1.5. Inoculations à Température contrôlée

Les essais sont réalisés en chambre climatique, à température et hygrométrie contrôlées, et suivis sur thermohygrogramme.

Les plants de tomates et de pomme de terre sont semés et mis à pousser sous serre-tunnel pendant quatre semaines en semis direct dans un mélange (annexe 7), en pot individuel. Ils sont transférés dans la chambre climatique deux jours avant l'inoculation.

La technique d'inoculation employée est l'insertion dans la tige d'un embout de micropipette contenant 50 µl de suspension bactérienne (d'après LUM, non publié, in BOWMAN et SEQUEIRA, 1982). L'embout est laissé en place jusqu'à totale absorption de la suspension par la tige, soit environ 12 h.

L'inoculum est préparé à partir de cultures de 24 h sur milieu de Kelman et ajusté à une concentration de l'ordre de 10⁸ bact/ml.

2 souches de biovar II : PdT 7-7 et PdT 7-8 , 1 souche de biovar III : T 30, sont inoculées.

20 plants de tomate et 20 plants de pomme de terre sont inoculés par souche.

2 plants de tomate et 2 plants de pomme de terre sont inoculés à l'eau stérile (témoin).

La température de la chambre climatique varie entre 18°C (nuit) et 20°C (jour). L'hygrométrie entre 90 % (nuit) et 80 % (jour). Le choix de la température s'est fait d'après la littérature, les données climatiques de la zone d'origine des souches n'étant pas encore disponibles.

L'incidence de la maladie est suivie par comptage du nombre de plants flétris.

Des isolements d'un ou deux plants flétris sont faits pour chaque souche, ainsi que la vérification du biovar de l'isolat.

1.6. Gamme d'hôtes

Parallèlement à l'expérience précédente, nous avons inoculé des plants d'arachide. Cette espèce a été choisie parce qu'elle est sensible à la race 1, et qu'elle n'appartient pas aux Solanacées (famille dans laquelle ont été recensés les hôtes de la race 3).

20 plants sont inoculés par la même technique (micropipette dans la tige), avec les trois souches déjà utilisées (PdT 7-7, PdT 7-8, T 30), ainsi que deux plants inoculés à l'eau stérile (témoin). Ces plants sont conservés en chambre climatique.

2 - Résultats

2.1. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches isolées

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

2.2. Tests physiologiques de croissance à température contrôlée *in vitro*

2.2.1. *En milieu solide*

* A 27°C, après 60 h d'incubation, toutes les souches ont bien poussé ; on différencie cependant assez nettement les

colonies, au point de vue coloration et taille (planche 2).

- . Souches PdT 7-6/PdT 7-8/PdT 12-2/PdT 12-4/PdT 16-1: les colonies sont blanc crémeux elles font environ 1 à 3 mm.
- . Souches PdT 9-3/PdT 9-5/An5 : les colonies sont blanc crémeux à centre rose, elles font environ 3 à 5 mm.
- . Souche PdT 15-2 : l'aspect est le même que pour les souches PdT 9-3, 9-5 et An 5, mais les colonies sont plus petites, elles font 2 à 3 mm.

* A 37°C, après 60 h d'incubation, les colonies n'ont pas l'aspect typique (blanc crémeux à contour irrégulier et centre rosé) des souches virulentes de *Pseudomonas solanacearum* ; elles sont au contraire parfaitement rondes.

- . Souches PdT 7-6/PdT 7-8/PdT 12-2/PdT 12-4/PdT 16-1: les colonies sont minuscules (diamètre < 0,5 mm), en tête d'épingle, blanc translucide, à peine visibles.
- . Souches PdT 9-3/PdT 9-5/An 5/PdT 15-2 : les colonies ont environ 1 mm de diamètre et sont rouges (planche 2).

* A 15°C, ce n'est qu'au bout d'une semaine que nous avons observé un début de croissance. Toutes les souches ont poussé, avec une avance de un à deux jours pour les souches de biovar II.

* A 10°C, aucune souche n'a poussé.

2.2.2. En milieu liquide

Les résultats sont illustrés par les figures 2 et 3.

2.3. Test d'infiltration de feuilles de tabac

Les délais d'apparition des symptômes sont homogènes pour une même souche, indépendamment du niveau de la feuille, du plant de tabac, et de la souche inoculée sur la demi-feuille correspondante. Le type de réaction, au niveau taille et contour des nécroses, est assez irrégulier selon le niveau de la feuille (qui se traduit par l'épaisseur de l'épiderme, etc...), phénomène que l'on ressentait déjà à l'infiltration, plus ou moins aisée selon les cas (planche 3) (tableau 5).

2 - Croissance à 60 h d'une souche de biovar III (PdT 9-3)
et d'une souche de biovar II (PdT 7-8) sur milieu
solide à une température de 37°C

1 - Symptômes à 12 h après infiltration
d'une feuille de tabac avec une souche
de biovar III (An3) et une souche de
biovar II (PdT 7-8)

2 - Symptômes à 60 h après infiltration
d'une feuille de tabac avec une souche
de biovar III (An3) et une souche de
biovar II (PdT 7-8)

Tableau 5 : Infiltration de feuilles de tabac avec différentes souches

Souche	DELAI D'APPARITION DES SYMPTOMES			
	12 h	36 h	48 h	60 h
PdT 9-3 et An 3	début d'effondrement des tissus de toute la zone infiltrée couleur gris/verdâtre	nécrose brun/vert de toute la zone infiltrée	nécrose brune	nécrose brune
PdT 7-6 et PdY 7-8		début d'effondrement des tissus, par taches. Couleur gris/verdâtre ne couvrant pas toute la zone infiltrée	nécrose brun/vert s'étendant irrégulièrement sur la zone infiltrée (coalescence)	nécrose brune en mélange avec des plages jaunâtres

2.4. Inoculations à température contrôlée

Les résultats sont illustrés par les figures 4 et 5, et fournis en annexe (tableau 6, annexe 8).

Les biovars des souches inoculées ont été confirmés après les réisolements, qui ont tous été positifs pour les tomates et les pommes de terre flétries testées.

2.5. Gamme d'hôtes

Environ 25 jours après l'inoculation, 3 plants d'arachide ont flétri avec la souche T30, 4 plants avec la souche PdT 7-7, 4 plants avec la souche PdT 7-8 ainsi qu'un plant inoculé à l'eau.

Les réisolements faits sur les plants inoculés avec des bactéries ont tous été positifs, et l'étude des biovars a permis de retrouver les caractéristiques d'origine. Rien n'a été isolé du plant témoin flétri.

3 - Discussion

3.1. Tests biochimiques

Toutes les souches isolées de tubercules ou de plants récoltés à 1 600 m sont de biovar II, ainsi qu'une souche isolée à 1 100 m, d'après les tests d'oxydation des sucres.

Certains de nos isolats de biovar II ont été incapables de dénitrifier, aucun trouble n'est apparu dans le milieu en anaérobie, même au-delà d'une semaine d'incubation. Mais d'autres en ont été capables, résultat en contradiction avec ceux d'HAYWARD (1964).

Il est possible que la technique ait été mal maîtrisée, en particulier au niveau de l'ensemencement du milieu, où l'on doit éviter toute introduction d'oxygène.

Par ailleurs, la plupart des auteurs identifient les biovars uniquement sur la base de l'oxydation des six sucres, et ne réalisent pas le test de dénitrification ; on ne peut donc affirmer que tout biovar II, de n'importe quelle origine géographique est incapable de dénitrifier. Ainsi, SWANEPOEL (1988) en Afrique du Sud, qui étudie des souches de biovar II isolées de pomme de terre et de biovar III isolées de tomate et de tabac, obtient une dénitrification pour un seul de ces isolats (alors que d'après HAYWARD (1976), toute souche de biovar III dénitrifie), et il s'agit d'un isolat de biovar II.

Nous avons donc considéré que la capacité à dénitrifier, observée pour beaucoup de nos souches, ne nous interdisait pas de les classer en biovar II.

Le test de production de pigment brun sur tyrosine n'est pas discriminant pour nos isolats. Il ne l'est pas non plus pour ceux de SWANEPOEL (1988). Nous avons déjà souligné qu'il permet surtout de différencier la race 2, des deux autres.

Les caractéristiques des isolats se sont révélés homogènes pour les autres tests biochimiques, dont l'éventail n'était pas très large ; ce n'était pas le principal objectif de notre travail.

3.2. Croissances *in vitro* à température contrôlée

3.2.1. *Sur milieu solide*

Nous pouvons séparer nos isolats en deux groupes quant aux délais de croissance et à l'aspect des colonies ; ces deux groupes correspondent au classement en biovars.

Contrairement à ce qu'en dit HAYWARD (1976), 37°C ne semble pas la température optimale de croissance de nos biovars III, qui, cependant poussent nettement mieux à cette température que ceux de biovar II. A 27°C, le léger avantage du biovar III sur le biovar II est en accord avec les résultats de HAYWARD (1976).

La croissance à 15°C des deux biovars, avec un avantage du biovar II sur le biovar III, est en accord avec les résultats de KATAYAMA et KIMURA (1984), qui sont beaucoup moins catégoriques dans leurs optimums de croissance pour les deux biovars, que HAYWARD (1976) ; ils observent les mêmes tendances parmi leurs isolats, selon le biovar, que celles que nous obtenons.

Aucune de nos souches n'a poussé à 10°C. Mais il faut signaler qu'à cette température, nous n'avons pu éviter un envahissement du milieu par des champignons.

3.2.2. *En milieu liquide*

Les résultats sont cohérents avec ceux obtenus sur milieu solide. On différencie là encore deux tendances, correspondant aux deux biovars.

A 27°C, les taux de croissance sont comparables. L'expérience à 37°C a malheureusement été interrompue par une coupure de courant qui a fait chuter la température à 25°C pendant environ six heures ; l'appareil étant endommagé, le test n'a pu être recommencé. C'est sans doute ce qui explique la reprise de croissance pour toutes les souches au sixième jour. Mais il reste visible que 37°C n'est pas l'optimum de croissance de nos isolats de biovar III, même si l'avantage sur ceux de biovar II est net.

Ce résultat n'est peut-être pas étonnant, si l'on considère les zones d'origine de nos souches de biovar III. Les températures moyennes qui y règnent sont beaucoup moins fraîches qu'à 1 600 m, mais cependant moins élevées que sur le littoral, où nous avons déjà cité des températures moyennes en été de 26 à 28°C. Nos souches de biovar III isolées de pomme de terre sont donc peut-être adaptées à des conditions d'environnement moins chaudes que les isolats d'Australie étudiés par HAYWARD (1976).

3.3. Tests d'infiltration de feuilles de tabac

Nous n'obtenons pas les réactions décrites par LOZANO et SEQUEIRA (1970) : pour nos isolats de biovar III/race 1, pas de halo jaune, pas d'envahissement des tissus ; les symptômes sont nets dès 12 h après infiltration, beaucoup plus semblables à ceux que ces auteurs observent pour la race 2, et se rapprochant donc d'une relation d'hypersensibilité.

Ce résultat n'est peut-être pas surprenant si l'on considère que les souches de race 1 à La Réunion ne sont pas pathogènes sur tabac, contrairement à celles utilisées par LOZANO et SEQUEIRA.

La réaction obtenue avec nos souches de biovar II est plus brutale que celle qu'ils ont décrite pour la race 3, puisque nous obtenons un affaissement et une nécrose des tissus, et non un simple jaunissement. Les symptômes sont intermédiaires entre ceux qu'ils observent pour la race 3, et ceux que nous obtenons pour la race 1.

Cependant, nous différencions nettement deux types de réactions parmi nos souches, en accord là aussi avec le classement en biovars.

3.4. Inoculations à température contrôlée

Les deux souches de biovar II ont été beaucoup plus agressives sur la pomme de terre, que la souche de biovar III.

Une première hypothèse pour expliquer ce résultat est que les isolats de biovar II se montrent plus agressifs à une température de 18-20°C, que l'isolat de biovar III. Cela se manifeste à la fois par une période de latence beaucoup plus courte et une proportion de plants flétris beaucoup plus élevée (plus du double).

Mais les résultats sur tomate semblent contredire cette hypothèse, puisque les trois souches se sont montrées quasiment aussi agressives à cette même température de 18-20°. On observe cependant des écarts de trois à quatre plants flétris en moins avec la souche T30, mais l'absence de dispositif statistique (effectifs et disposition de l'essai),

ne permet pas de conclure à une différence significative.

Une seconde hypothèse serait une plus grande affinité des isolats de biovar II pour la pomme de terre, contrairement à la souche isolée de tomate. Mais ces mêmes isolats de biovar II se sont montrés aussi agressifs sur tomate, que la souche T30.

En fait, la variété de tomate utilisée a sans doute beaucoup joué sur ces résultats, du fait de sa sensibilité élevée au flétrissement bactérien.

Finalement, les différences observées entre les souches de biovar II et la souche de biovar III résultent sans doute à la fois d'une adaptation à une gamme de température plus fraîche, et d'une grande affinité pour la pomme de terre, chez les isolats de biovar II.

3.5. Gamme d'hôtes

D'après la littérature, le flétrissement de l'arachide serait une contre-indication pour le diagnostic de la race 3. Mais plusieurs remarques s'imposent :

- le flétrissement est survenu pour trois plants seulement par souche,

- il a eu lieu au-delà du vingtième jour après inoculation,

- on a employé une méthode d'inoculation réputée violente; rappelons qu'elle est même contre-indiquée par FRENCH (1979), LALLMAHOMED et RICAUD (1978),

- certains des plants ont, de toute évidence, souffert d'un défaut d'arrosage en fin d'expérience, puisqu'un des plants témoins est mort probablement de sécheresse, aucun agent pathogène n'ayant été isolé ; Or les symptômes des deux phénomènes, flétrissement bactérien et sécheresse, sont similaires.

Le réisolement de *Pseudomonas solanacearum* à partir des plants inoculés qui ont flétri ne contredit pas forcément l'hypothèse de mort par sécheresse ; en effet, il a été souvent observé des taux de multiplication élevés de *Pseudomonas solanacearum* dans des plantes non hôtes (PERSLEY, 1985). Remarquons par ailleurs que des plants d'arachides inoculés avec la souche T30, et conservés sous serre-tunnel munie d'un arrosage automatique, n'ont jamais flétri.

Rappelons enfin que le flétrissement de l'arachide avec une souche de biovar II, et diagnostiqué de race 3, a été obtenu lors d'une expérience d'inoculation artificielle par ERINLE (1976).

4 - Conclusion de l'étude des isolats de *Pseudomonas solanacearum* sur pomme de terre en altitude

Les souches isolées à La Réunion vers 1 600 m sont de biovar II. Celles isolées sur pomme de terre à plus basse altitude sont de biovar III (à l'exception d'un isolat de biovar II à 1100 m).

Par ailleurs, les tests *in vitro* à température contrôlée, et les tests d'infiltration de feuilles de tabac ont permis de nettement différencier deux groupes parmi nos isolats, qui systématiquement correspondent à la distinction en biovars.

Rien n'indique qu'il y ait une corrélation entre la capacité ou l'incapacité à oxyder une gamme de carbohydrates, et le taux de croissance à certaines températures, ou les symptômes sur feuilles de tabac. Les inoculations à températures contrôlée tendent à différencier les deux mêmes groupes. Il semble donc qu'on puisse conclure à une distinction de nos isolats en race 1 et 3, sur la base des observations décrites dans la littérature, et plus ou moins confirmées dans nos études.

Cependant, l'expérience décisive aurait sans doute dû être l'inoculation des plants à température contrôlée. Il est indispensable de la réaliser à nouveau, à une gamme de température choisie d'après les données climatiques des lieux de prélèvement, à savoir une moyenne de 15°C.

Cette expérience doit également être menée à une température de l'ordre de 25°C reflétant les conditions qui règnent dans les champs de basse et moyenne altitude à La Réunion.

La conjonction des deux essais devrait permettre de cerner les dangers que représentent ces souches de biovar II pour la culture de pomme de terre, et notamment la production de semences, mais également le danger potentiel pour la tomate en cas d'introduction de ces souches à basse altitude. En effet, en hiver, les attaques par les souches de *Pseudomonas solanacearum* jusqu'alors identifiées étaient faibles, du fait de la baisse des températures moyennes, qui par contre ne

serait pas un obstacle pour les isolats de biovar II.

Il faut également refaire l'inoculation d'arachides, d'une part avec la même technique, d'autre part, par un trempage des racines dans une suspension bactérienne, technique que plusieurs auteurs jugent plus adéquate aux tests de pouvoir pathogène, parce que plus proche des conditions naturelles d'infestation par *Pseudomonas solanacearum*.

Ces expériences n'ont pu être renouvelées dans le cadre du stage, la chambre climatique étant utilisée pour d'autres études menées à la station.

Au vu de nos résultats, il y a déjà lieu de préconiser l'introduction d'autres cultures, en rotation, dans les zones d'altitude où jusqu'à présent les agriculteurs pratiquaient une monoculture de pomme de terre. Plusieurs cultures sont envisageables, parmi lesquelles le maïs fourrage ou des pâturages pourraient convenir aux conditions des hautes plaines à La Réunion, qui sont essentiellement consacrées à l'élevage bovin.

La production de semences de pomme de terre, dans les zones où les conditions thermiques empêchaient le flétrissement bactérien causé par la race 1, est compromise par l'apparition de la race 3. Cette production doit être stoppée dans les champs où *Pseudomonas solanacearum* a été isolé. Elle reste nécessaire pour la période de culture où les semences d'importation ne sont pas disponibles, et peut être poursuivie dans les champs apparemment non contaminés. Mais les tubercules récoltés devront faire l'objet d'un contrôle sanitaire.

Dans cet objectif, le laboratoire de l'IRAT à Saint-Pierre initie la mise au point d'un test de dépistage des infections latentes, basé sur la sérologie en immunofluorescence.

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE PRELIMINAIRE A
LA MISE AU POINT D'UN TEST DE
L'AGRESSIVITE DES SOUCHES DE
PSEUDOMONAS SOLANACEARUM**

Les rapports des principaux organismes qui pratiquent la sélection variétale pour la résistance au flétrissement bactérien, sur tomate ou sur pomme de terre, (AVRDC à Taïwan, CIP au Pérou), exposent les méthodes d'inoculations employées; mais ils ne contiennent aucun renseignement sur le choix de l'isolat inoculé.

Pourtant, de nombreux auteurs signalent l'existence de différences d'agressivité au sein d'isolats de *Pseudomonas solanacearum* (KELMAN et PERSON, 1961 ; LUM et KELMAN, 1981 ; BOWMAN et SEQUEIRA, 1982), et le rôle que cela a pu jouer dans l'effondrement de la résistance de certains clones, confrontés aux souches présentes dans une zone différente de celle où ils avaient été sélectionnés (FRENCH, 1978 ; FRENCH et DE LINDO, 1982 ; BUDDENHAGEN, 1985).

Ainsi, BOWMAN et SEQUEIRA (1982), recommandent le tri des isolats les plus agressifs, avant de débiter un programme de sélection variétale.

La mise au point d'un test qui aboutirait à ce tri nécessite de cerner les composantes de l'agressivité, ainsi que les facteurs à prendre en compte pour l'évaluer. On pourra ensuite faire le choix de techniques d'études. Celles permettant d'apprécier des différences quantitatives de résistance variétale devraient être applicables à l'évaluation de différences d'agressivité (WELZ, 1987).

1 - Virulence et agressivité des souches de *Pseudomonas solanacearum*

Nous employons les termes de virulence et d'agressivité tels qu'ils sont définis par VAN DER PLANK (1968).

- Un isolat de *Pseudomonas solanacearum* sera dit virulent s'il est capable de provoquer le flétrissement d'un hôte sensible, il s'agit d'un phénomène qualitatif (manifestation ou non de la maladie) ; une souche avirulente a perdu la capacité à faire flétrir un hôte sensible,

- un isolat sera dit plus agressif qu'un autre s'il provoque un flétrissement plus sévère ; il s'agit alors d'un phénomène quantitatif (niveau de maladie provoqué).

Les souches de *Pseudomonas solanacearum* perdent très facilement leur virulence en milieu de culture. L'intérêt du milieu de Kelman (1954) est de permettre la distinction entre les colonies virulentes et avirulentes. D'après AVERRE et KELMAN (1963), la présence de bactéries avirulentes ne se traduit par une réduction du taux final de flétrissement, que si elles représentent plus de 50 % de l'inoculum ; en revanche, l'évolution dans le temps de l'index de flétrissement est modifiée.

HUSAIN et KELMAN (1958) parlent de mutants avirulents, mais également des mutants faiblement agressifs, (sans par ailleurs justifier cette appréciation quantitative), les deux étant issus d'une même souche. L'éventualité que les souches perdent de leur agressivité au cours de la conservation est un argument supplémentaire pour la mise au point d'un test de mesure d'agressivité. Cependant là aussi, HUSAIN et KELMAN différencient nettement l'aspect des colonies, celles des mutants avirulents comme celles des mutants faiblement agressifs.

Il semble donc possible de s'affranchir de ce risque par le choix des colonies sur milieu de Kelman, lors de la préparation de l'inoculum.

2 - Evaluation de l'agressivité

Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer l'induction du flétrissement (HUSAIN et KELMAN, 1958 ; BUDDENHAGEN et KELMAN, 1964 ; SEQUEIRA, 1964). Dans tous les cas, il y a invasion du système vasculaire par multiplication de la bactérie, conduisant à un affaiblissement des mouvements d'eau.

Il ne semble pas y avoir eu d'étude, d'après la littérature, sur la liaison éventuelle entre l'agressivité et les capacités *in vitro* des souches de *Pseudomonas solanacearum* (rapidité de croissance, taille des colonies,...) comme cela se fait pour les champignons par exemple (WELZ, 1987).

CIAMPI et SEQUEIRA (1980b) font la corrélation entre l'agressivité des souches et la vitesse de multiplication et de migration dans les tissus de l'hôte. Ils les mesurent par des coupes à différentes hauteurs dans des tiges de plants de pomme de terre inoculés à intervalles de temps variables.

D'après BOWMAN et SEQUEIRA (1982) qui ont réalisé le même type d'expériences, les interactions - souche x hauteur dans la tige x temps nécessaire pour atteindre cette hauteur - sont surtout significatives pour la comparaison souche virulente et avirulente. En effet, entre les deux souches virulentes qu'ils étudient, la moins agressive atteint plus

rapidement la hauteur maximale, même si la plus agressive est présente en quantité légèrement supérieure et semble plus apte à poursuivre l'invasion des tissus (le taux de multiplication de la bactérie la moins agressive ayant atteint un palier).

Par ailleurs, BOWMAN et SEQUEIRA (1982), LUM et KELMAN (1981), mettent en évidence des différences d'agressivité entre souches par l'évaluation des symptômes externes. Cette mesure peut se faire par une proportion de plants flétris (deux réponses possibles, plant malade ou plant sain), ou par l'échelle de notation de WINSTEAD et KELMAN (1952) :

- 0 : pas de symptômes
- 1 : 01 feuille partiellement flétrie
- 2 : 2 ou 3 feuilles flétries
- 3 : toutes les feuilles flétries à l'exception des 2 ou 3 du sommet
- 4 : toutes les feuilles flétries
- 5 : mort.

La première méthode offre moins de précision, mais est plus facile pour de grands effectifs.

On peut également envisager que le délai d'apparition des premiers symptômes, autrement dit la période de latence, soit une composante de l'agressivité. MEW et HO (1976) l'ont comparée pour des variétés possédant différents niveaux de tolérance ; ils obtiennent, pour un même isolat inoculé, des périodes de latence variant de six à dix sept jours pour les variétés résistantes, de quatre à sept jours pour les variétés sensibles.

Au niveau tolérance variétale, ce critère ne semble donc pas sélectif. Mais cela n'exclut pas qu'il soit applicable à la discrimination des niveaux d'agressivité de différentes souches, inoculées à une même variété.

3 - Méthodes applicables à l'étude de l'agressivité

Par méthode d'inoculation, nous entendons à la fois la technique proprement dite, et la concentration de l'inoculum.

Il s'agit ici d'un tour d'horizon des méthodes employées pour le criblage variétal, dont nous estimons qu'elles pourront être utilisées pour l'évaluation des différences d'agressivité.

3.1. Inoculations dans la tige

La méthode classique d'inoculation dans la tige est celle décrite par WINSTEAD et KELMAN (1952) : ils piquent dans la tige à l'aide d'une aiguille stérilisée à travers une goutte de suspension bactérienne placée à l'aisselle de la seconde ou troisième feuille bien développée à partir de l'apex, sur des plants de quatre à cinq semaines.

BOWMAN et SEQUEIRA (1982) inoculent au moyen d'une micropipette contenant 20 µl d'inoculum, insérée en diagonale dans la tige, à l'aisselle d'une feuille (d'après LUM, non publié). D'autres utilisent la même méthode avec 50 µl d'inoculum (HE et al., 1983 ; AVRDC, 1984).

3.2. Inoculations par les racines

WINSTEAD et KELMAN (1952) blessent les racines des plants âgés de 4 à 5 semaines, en enfonçant un scalpel dans la terre jusqu'à environ 4 cm, sur un côté de la plante ; puis ils versent 10 ml de suspension dans la zone de blessure.

La même méthode est reprise par différents auteurs, en variant la profondeur des trous et le volume de suspension versé (HARRISON, 1961 ; KESHWAL, 1976 ; LALLMAHOMED, 1976...).

WINSTEAD et KELMAN (1952) pratiquent un trempage des racines dans une suspension bactérienne (temps de trempage non précisé). KESHWAL (1976) réalise un trempage d'une heure, des racines de tomates âgées de 45 jours : il obtient 100 % de mortalité.

3.3. Comparaison des techniques

WINSTEAD et KELMAN (1952) obtiennent des résultats similaires entre l'inoculation par les racines et par la tige, pour des variétés de tomates sensibles. En revanche, la technique d'inoculation par la tige provoque un flétrissement beaucoup plus important que par les racines, pour des variétés résistantes. Ils attribuent cette différence à l'introduction directe des bactéries dans le xylème par la piqûre, d'où une extension et une multiplication rapide dans le système vasculaire.

LALLMAHOMED et RICAUD (1978) estiment que l'inoculation par la tige est une méthode trop violente qui conduit à des interprétations erronées de la virulence de certaines souches, opinion partagée par d'autres auteurs (FRENCH, 1979).

3.4. Concentration bactérienne de l'inoculum

D'après WINSTEAD et KELMAN (1952), MEW et HO (1976), la concentration de l'inoculum joue peu dans l'inoculation de variétés sensibles.

Par contre, ERCOLANI (1976), BOWMAN et SEQUEIRA (1982) insistent sur l'importance de la concentration pour l'inoculation de variétés moyennement résistantes. Une inoculation à une concentration de l'ordre de 10^7 à 10^8 bact/ml (méthode classique) est trop sévère pour permettre de déceler des différences de niveau de tolérance. Ces auteurs conseillent la méthode de l'"infectivity titrations" : les inocula couvrent toute une gamme de concentrations bactériennes, de $5,6 \cdot 10^{-1}$ à $1,2 \cdot 10^8$ bact/plante. Les inoculations sont réalisées dans la tige, par micropipette. Pour chaque variété testée, on calcule la valeur de l'ED50, définie comme la concentration bactérienne d'un isolat donné, nécessaire pour le flétrissement de 50 % de la population.

Réciproquement, BOWMAN et SEQUEIRA calculent l'ED50 pour chaque isolat, définie comme la concentration nécessaire pour le flétrissement de 50 % de la population d'une variété de tomate donnée, ils classent ainsi les isolats selon leur agressivité.

L'AVRDC (1984) utilise également, cette méthode d'"infectivity titrations" pour l'évaluation de la tolérance des variétés de tomates, en inoculation par les racines ; la discrimination des niveaux moyens de résistance est moins nette qu'en inoculation par la tige.

0

**QUELQUES ETAPES PREALABLES A LA MISE
AU POINT D'UN TEST DE L'AGRESSIVITE
D'ISOLATS DE *PSEUDOMONAS SOLANACEARUM***

Plusieurs facteurs, dont certains ont été abordés dans l'étude bibliographique, vont intervenir dans la mesure de l'agressivité des souches :

- si la variété de tomate utilisée dans le test a un niveau de résistance trop faible ou au contraire trop élevé, elle risque de ne permettre aucune différenciation d'agressivité des souches,

- de même, le stade auquel on inocule les plants intervient, la résistance augmentant avec l'âge (sauf pour les variétés très sensibles (WINSTEAD et KELMAN, 1952)),

- une méthode d'inoculation trop violente risque de provoquer systématiquement le flétrissement des plants, même pour les souches les moins agressives ; rappelons que le choix de la méthode d'inoculation comprend à la fois la technique proprement dite (dans la tige, par piqûre à la seringue hypodermique ou par micropipette, par les racines), et la concentration bactérienne de l'inoculum,

- les différences d'agressivité peuvent être évaluées par une proportion de plants flétris, une notation des symptômes de flétrissement, ou éventuellement la mesure de la période de latence,

- le traitement statistique des données est important car nous risquons peut-être d'observer des différences d'agressivité relativement faibles parmi nos isolats (même si elles sont suffisantes pour justifier un tri préalable au criblage variétal),

- les facteurs de l'environnement jouent beaucoup sur l'expression du flétrissement, notamment la température et l'intensité lumineuse ; une élévation de température et une baisse d'intensité lumineuse entraînent une augmentation du flétrissement.

Nous allons devoir prendre en compte ces différents facteurs, l'objectif étant la mise au point d'un test suffisamment rapide et facile à mettre en oeuvre, pour être répété chaque année avant les essais de criblage variétal.

Nous avons procédé par étapes, en établissant ou en modifiant les protocoles de nos expérimentations au fur et à mesure de l'obtention des résultats.

Nous avons donc choisi de présenter chacune de ces étapes successivement, tant au niveau des méthodes que des résultats

et des conclusions, présentation la plus fidèle à notre démarche.

Les essais ont été réalisés sous serre-tunnel en plastique. L'hygrométrie et la température ont été suivies par thermohygrographe sous abri météo.

1 - Essai n°1 : comparaison des variétés pour différentes souches inoculées

Nous avons inoculé trois souches différentes à trois variétés, dans l'idée de choisir la variété qui reflèterait le mieux les différences d'agressivité entre souches, en étant conscients pour cette première tentative, que nous n'étions pas dans des conditions, au niveau méthode d'inoculation, permettant de déceler des différences, et que nos trois souches auraient peut-être des niveaux d'agressivité trop proches pour être différenciés.

1.1. Matériels et méthodes

Nous avons comparé trois variétés, déjà testées au champ lors des criblages variétaux :

- variété Roma, niveau de résistance faible,
- variété MST 32-1, niveau de résistance moyen à élevé,
- variété Caraïbo, niveau de résistance élevé.

La technique choisie est l'inoculation par micropipette, dans la tige, l'avantage étant le contrôle précis du volume d'inoculum introduit (technique de LUM, non publié, in BOWMAN et SEQUEIRA, 1982). La micropipette est laissée en place jusqu'à absorption de tout le volume inoculé.

Les trois souches utilisées proviennent de trois hôtes différents ; c'était en effet le seul critère de choix possible a priori.

Pour ce premier essai, nous n'avons pas travaillé à une échelle permettant un traitement statistique des données ; il s'agissait seulement d'une première approche.

30 plants de chacune des trois variétés ont été inoculés avec 50 µl d'une suspension à 10^7 bact/ml, pour chacune des trois souches : souche T30, isolée de tomate, souche An4, isolée d'Anthurium, souche PdT9-3, isolée de pomme de terre. Par ailleurs, 30 plants ont été inoculés à l'eau stérile pour chacune des trois variétés (témoins).

La technique d'inoculation choisie nécessite des plants ayant au moins quatre à cinq semaines : ils ont été semés, puis repiqués individuellement à deux semaines, dans un mélange de terre, sable, pouzzolane et terreau (annexe 7).

L'irrigation est assurée par microaspersion, à raison de quatre arrosages de 5 mn par jour.

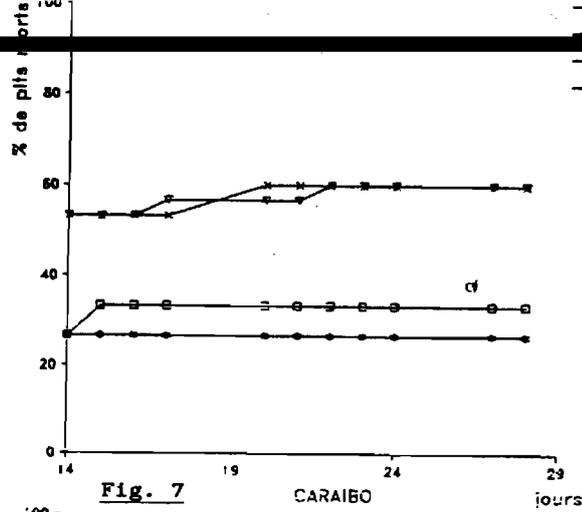


Fig. 7

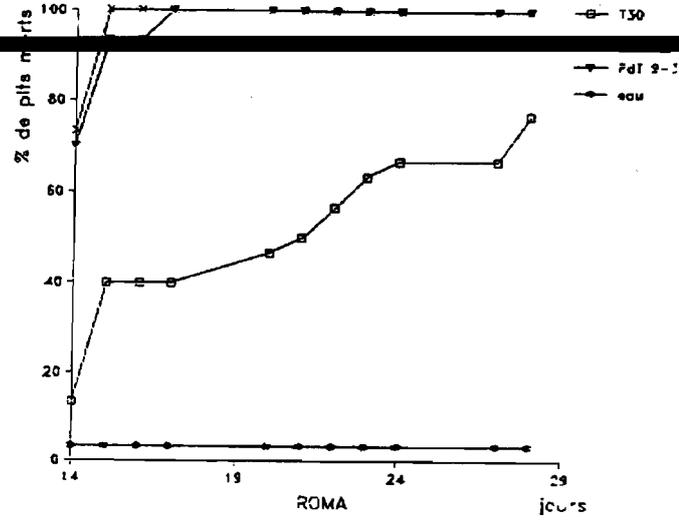


Fig. 8

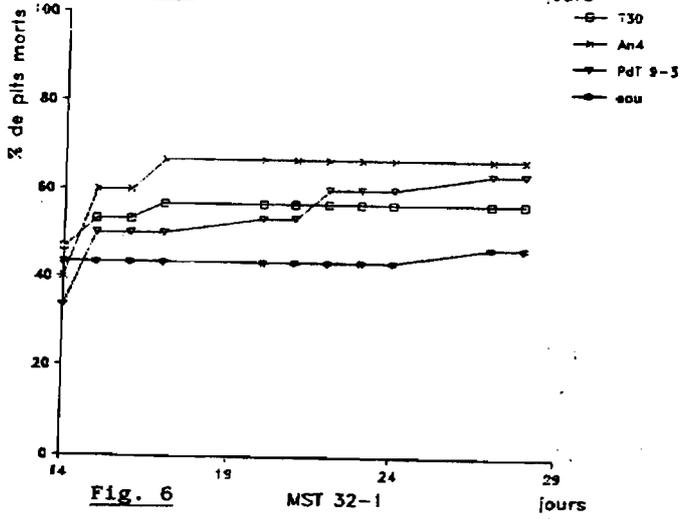


Fig. 6

Fig. 6, 7 et 8 : Evolution du pourcentage de plants morts de trois variétés de tomates en fonction du nombre de jours après inoculation avec trois souches différentes (T30, An4, PdT 9-3)

Pour cet essai, les températures ont varié de 12°C (moyennes des minima) à 29°C (moyenne des maxima) avec une moyenne d'environ 20°C. L'humidité relative a varié de 50 % (jour) à 95 % (nuit).

1.2. Résultats

Devant la difficulté de suivre l'évolution du flétrissement par la notation selon l'échelle de WINSTEAD et KELMAN (1952), nous avons préféré relever le nombre de plants atteints, en principe quotidiennement.

En effet, les conditions d'environnement, très variables sous la serre-tunnel, occasionnaient certains jours un flétrissement brutal gagnant rapidement la plante entière.

Par ailleurs, nous avons dû traiter contre de très fortes attaques de mildiou (*Phytophthora infestans*). Les traitements hebdomadaires à l'Acylon F (20 % Metalaxyl, 40 % Folpel) ont stoppé l'attaque, mais un certain nombre de plants a été perdu.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 7 (annexe 9) et les figures 6,7,8.

1.3. Discussion

L'essai a été fortement perturbé par l'attaque de mildiou; le nombre de plants morts a été relevé sans distinguer la cause -flétrissement bactérien ou mildiou- et les lectures n'ont pu commencer que le quatorzième jour.

Les variétés Caraïbo et MST 32-1 semblent avoir particulièrement souffert du mildiou, la proportion de plants morts étant comparable entre les témoins et les plants inoculés, et élevée pour les deux, ce qui souligne en contrepartie le peu d'incidence du flétrissement bactérien sur ces deux variétés.

Ainsi, le nombre de plants morts se stabilise après que l'attaque de mildiou ait été stoppée.

La variété Roma semble au contraire avoir peu souffert du mildiou si l'on s'en réfère aux plants témoins.

Ces différences de réaction face à l'attaque de mildiou entre les trois variétés viennent en grande partie de la disposition spatiale des plants sous la serre-tunnel.

Malgré le retard pris dans les lectures (le flétrissement commence en général dès la première semaine), les résultats pour la variété Roma mettent en évidence une proportion de plants morts plus faible avec la souche T30 qu'avec les deux autres souches, mais surtout une période de latence beaucoup plus importante : au quatorzième jour, seulement quatre plants

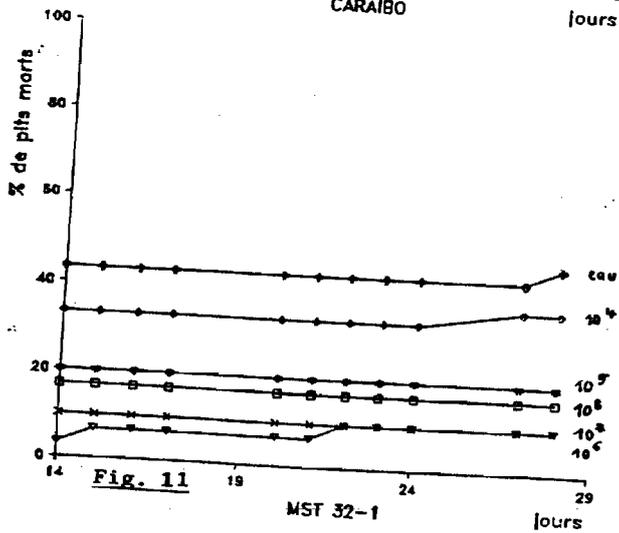
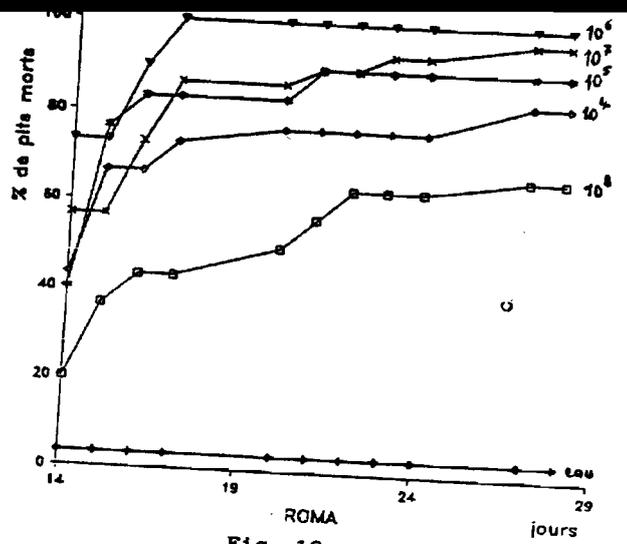
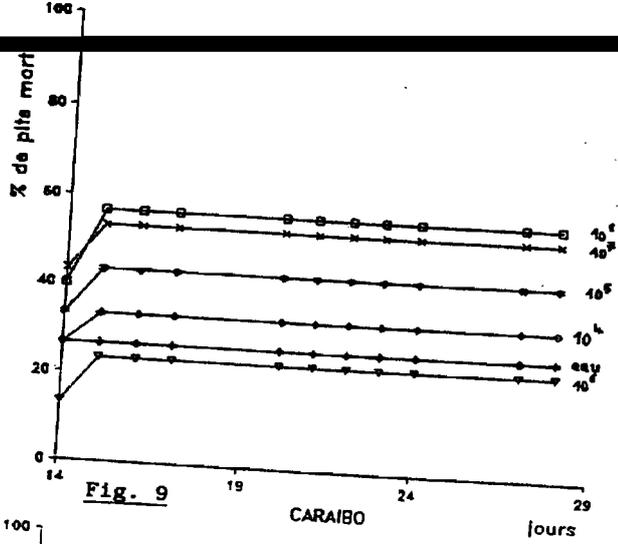


Fig. 9, 10 et 11 : Evolution du pourcentage de plants morts de trois variétés de tomates en fonction du nombre de jours après inoculation avec une souche à 5 concentrations bactériennes (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 bact/ml)

sont morts avec la souche T30, contre respectivement 21 et 22 avec les souches PdT 9-3 et An 4.

La variété Roma, malgré sa sensibilité à *Pseudomonas solanacearum*, semble donc permettre une discrimination de l'agressivité des souches dans les conditions de l'expérimentation. Dans des conditions de température plus élevée, elle aurait sans doute été trop sensible.

2 - Essai n°2 : comparaison des variétés selon la concentration de l'inoculum

Pour des impératifs de temps, sans attendre les résultats de l'essai n°1, nous avons parallèlement comparé les trois variétés Roma, MST 32-1 et Caraïbo, pour une même souche inoculée à différentes concentrations.

En effet, nous avons déjà souligné l'importance que notre variété ne soit ni trop résistante, ni trop sensible.

Or, les seules appréciations dont nous disposons sont les résultats au champ. Dans le cadre d'un criblage variétal, ceux-ci sont suffisants, puisqu'on ne cherche pas à déceler l'existence d'un certain niveau de tolérance, même faible, mais plutôt la capacité d'une variété à fournir des rendements satisfaisants en présence de la maladie. Par contre, ces appréciations des niveaux de tolérance ne sont pas assez fines pour nous permettre de choisir une variété appropriée à notre test.

En nous inspirant de la méthode d'"infectivity titrations" (cf. paragraphe 3.4. de l'étude bibliographique), nous avons cherché à nuancer nos connaissances sur le niveau de tolérance des trois variétés, notre choix se portant alors sur celle qui refléterait le mieux les différences de concentration de l'inoculum.

2.1. Matériels et méthodes

La technique d'inoculation, la conduite des semis et des repiquages, l'irrigation, les températures et humidité relative sont les mêmes que dans l'essai n°1. 30 plants de chacune des trois variétés ont été inoculés avec la souche T30, aux concentrations de 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 bact/ml.

Les plants témoins étaient communs avec ceux de l'essai n°1.

2.2. Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8 (annexe10) et les figures 9,10,11.

2.3. Discussion

L'essai n°2 a subi les mêmes perturbations dues au mildiou que l'essai n°1, notamment pour les variétés Caraïbo et MST 32-1 dont les résultats sont difficilement exploitables.

Cependant, quelle que soit la concentration, le nombre de plants morts s'est, là aussi, stabilisé après l'attaque de mildiou, pour les deux variétés Caraïbo et MST 32-1.

Aucune des deux n'a, semble-t-il, reflété les différences de concentration de l'inoculum.

Les résultats pour la variété Roma, qui, rappelons-le, a assez peu souffert du mildiou, semblent par contre refléter des différences de concentration. Le résultat pour la concentration de 10^8 bact/ml est aberrant et peut être dû à un défaut dans la préparation de l'inoculum. Par ailleurs, les résultats sont sans doute biaisés par les différences d'exposition au mildiou, qui ont malgré tout joué également pour cette variété.

Les conclusions restent cependant celles de l'essai n°1. La variété Roma, réputée sensible d'après les résultats au champ, a cependant un niveau de tolérance à *Pseudomonas solanacearum* suffisant, dans les conditions d'environnement où nous travaillons, pour que la concentration de l'inoculum se traduise sur le taux de flétrissement.

Les variétés Caraïbo et MST 32-1 ont par contre un niveau de résistance trop élevé ; la moindre résistance de MST 32-1 par rapport à Caraïbo, observée au champ, n'apparaît pas dans les conditions hivernales, même si la température est en moyenne plus élevée sous la serre-tunnel qu'à l'extérieur.

3 - Essai n°3 : amélioration de la technique d'inoculation

Nous avons constaté, lors des deux premiers essais, que la blessure occasionnée par l'insertion de l'embout conduisait à une pourriture de la tige qui risquait de fausser les résultats.

Il semblait beaucoup trop fastidieux d'envisager l'application d'un cicatrisant sur chaque blessure, ce que font BOWMAN et SEQUEIRA (1982), lorsqu'ils pratiquent l'inoculation par micropipette.

L'utilisation de plants plus âgés, donc ayant une tige plus épaisse, permettrait l'insertion de l'embout plus haut dans la tige et diminuerait les risques de pourriture ; mais les délais en seraient augmentés. Nous avons préféré expérimenter une autre technique.

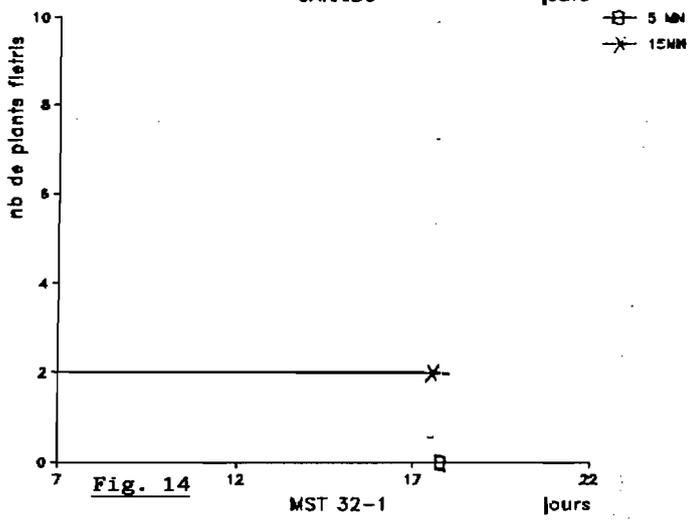
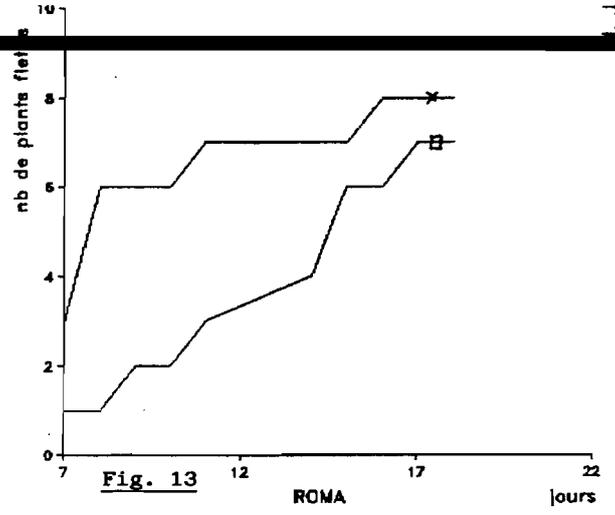
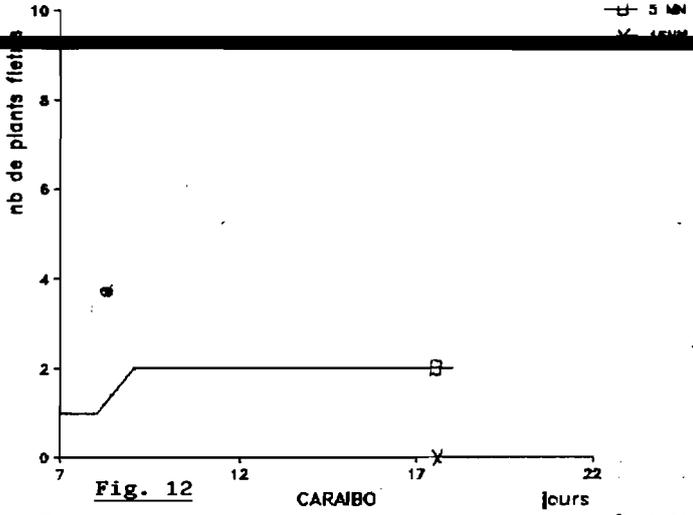


Fig. 12, 13 et 14 : Evolution du nombre de plants flétris de trois variétés de tomates en fonction du nombre de jours après inoculation avec une souche par trempage à 2 temps différents des racines de plants âgés de 2 semaines

Les trois mêmes variétés ont à nouveau été testées, malgré les résultats des deux premiers essais, pour permettre éventuellement une comparaison des deux techniques en fonction du niveau de sensibilité au flétrissement bactérien.

3.1. Matériels et méthodes

Nous avons essayé la méthode d'inoculation par trempage des racines dans la suspension bactérienne. WINSTEAD et KELMAN (1952) utilisent cette technique sur des plants de quatre semaines.

Par souci de gain de temps, et de simplification des manipulations, nous avons effectué le trempage de plants de deux semaines, au stade du repiquage, ce qui a permis de réaliser simultanément les deux opérations.

L'effectif des plants était très limité car nous courions le risque que le jeune âge des plants les rende beaucoup trop sensibles au flétrissement bactérien ; tous les exemples de techniques d'inoculation trouvés dans la littérature concernent des plants d'au moins quatre semaines.

La technique d'arrosage est la même. Les températures ont varié de 13°C (nuit, moyenne des minima) à 29°C (jour, moyenne des maxima) avec une moyenne de 21°C, et l'humidité relative de 45%(jour) à 95 % (nuit).

Les plants ont été traités préventivement contre le mildiou dès un stade suffisamment développé pour supporter le traitement, vers deux semaines.

10 plants de chacune des trois variétés ont été inoculés pour chaque temps de trempage, 5 et 15 mn, avec la souche An4.

10 plants ont été trempés 10 mn dans l'eau stérile pour chaque variété (témoin).

3.2. Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 9 (annexe 11) et les figures 12,13,14.

3.3. Discussion

Cet essai confirme que les variétés MST 32-1 et Caraïbo ont un niveau de résistance trop élevé pour qu'elles soient utilisées : 2 plants seulement sont morts pour chacune des deux variétés, le septième jour, et il n'y a ensuite aucune évolution en fonction du temps.

En revanche, la proportion de plants flétris avec la variété Roma évolue avec le temps. Conformément à ce qu'on pouvait prévoir, elle est plus élevée pour le temps de

trempage de 15 mn. Malgré le jeune âge des plants, le flétrissement ne semble pas trop brutal.

Cette technique d'inoculation, qui a l'avantage d'éviter de blesser les tiges et permet un gain de temps d'environ deux semaines, semble donc intéressante.

4 - Essai n°4 : choix de la concentration bactérienne de l'inoculum

Nous avons choisi une variété et une technique d'inoculation. Il nous faut maintenant établir si la concentration de l'inoculum a une importance significative dans nos conditions d'expérimentation, et dans l'affirmative, cerner la dose autour de laquelle une variation de la concentration a le plus d'incidence sur le flétrissement. Ainsi, une dose trop faible risquerait de faire très peu évoluer la proportion de plants flétris en fonction du temps ; une dose trop forte risquerait de tuer rapidement un grand nombre de plants. Dans ces deux cas extrêmes, la technique ne serait pas assez sensible pour permettre d'apprécier des différences d'agressivité.

Nous avons réalisé dans cette optique, un premier essai qui a été totalement perdu. Les plants ont souffert dès la levée d'une forte attaque de mildiou, d'où des pertes importantes malgré les traitements, et des plants en mauvais état au repiquage. L'inoculation a malgré tout été réalisée, mais les plants ont alors subi l'attaque d'une bactériose foliaire (peut-être *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*), qui n'a pu être stoppée parce que d'autres essais conduits sous la serre-tunnel interdisaient tout traitement au cuivre.

Nous avons donc décidé de changer la technique d'arrosage, particulièrement propice au développement de maladies foliaires.

4.1. Matériels et méthodes

L'arrosage est maintenant réalisé par trempage des pots tous les deux ou trois jours.

Les semis sont réalisés en barquette, les repiquages en petits pots (par groupe de six petits pots solidaires) : cela permet un gain de place, et d'homogénéité au sein d'une parcelle de plants.

Les températures pour cet essai ont varié en moyenne de 14°C (moyenne des minima) à 31°C (moyenne des maxima), avec une moyenne de 22°C, et l'humidité relative de 40 % (jour) à 95 % (nuit).

Ne travaillant plus que sur une variété, nous avons pu passer à une échelle d'effectifs permettant un traitement statistique des données (utilisation du logiciel

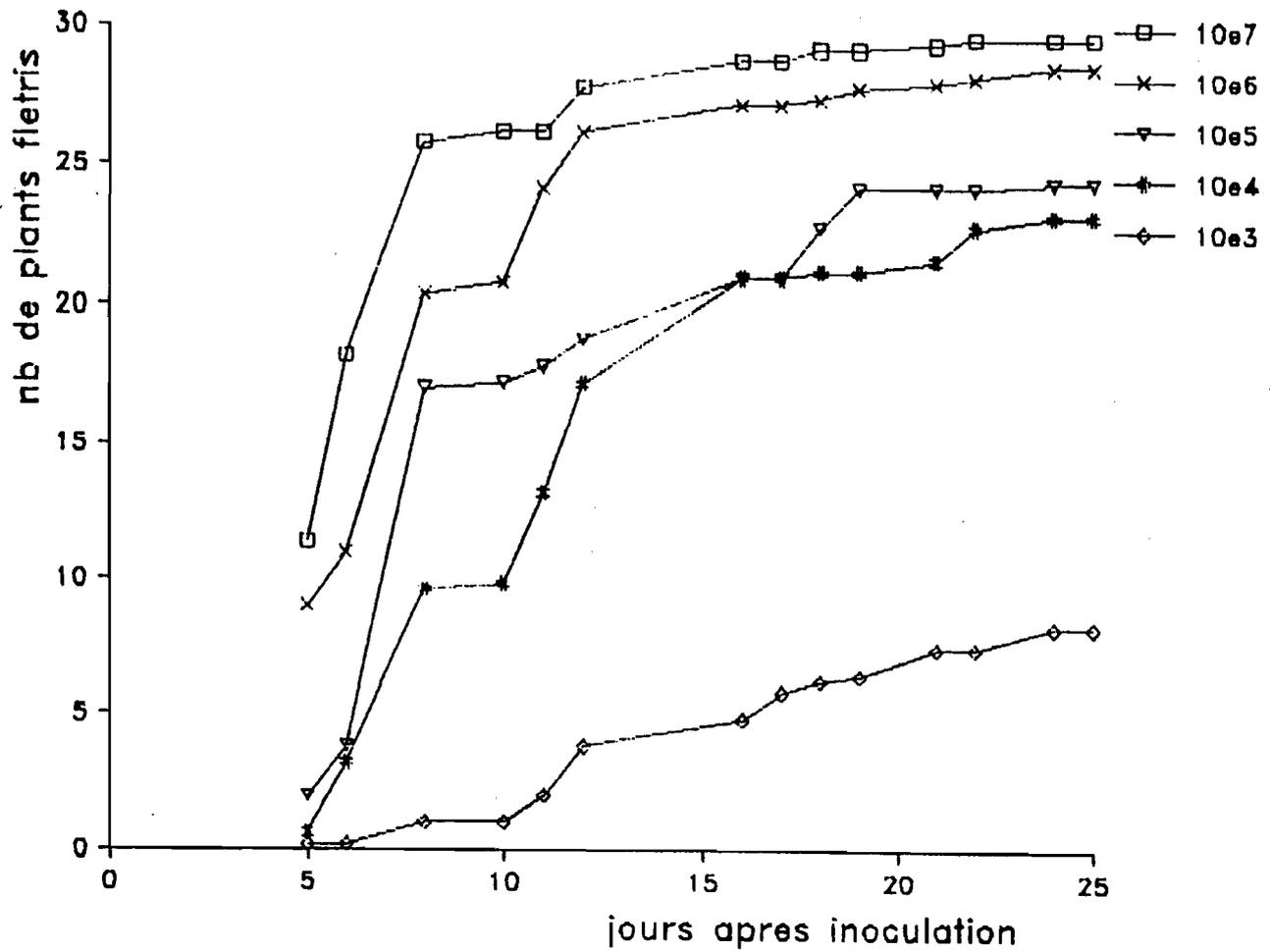


Fig. 15 : Evolution du nombre de plants flétris en fonction du nombre de jours après inoculation pour chacune des concentrations bactériennes de l'inoculum

Tableau 10 : Test de Newman Keuls de classement des traitements en groupes homogènes, repérés par une même lettre

Concentration (bact/ml)	Jours après inoculation		
	8	18	19
10 ⁷	A	A	A
10 ⁸	AB	A	A
10 ⁵	B	B	B
10 ⁴	C	B	B
10 ³	D	C	C

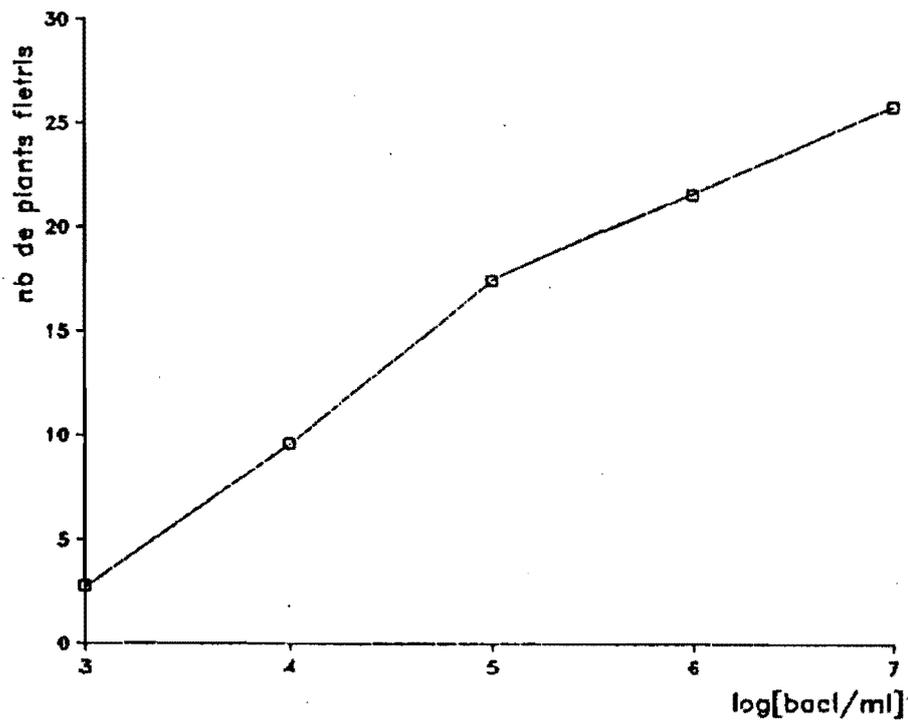


Fig. 16 : Nombre de plants flétris en fonction de la concentration bactérienne exprimée en échelle logarithmique 8 jours après inoculation

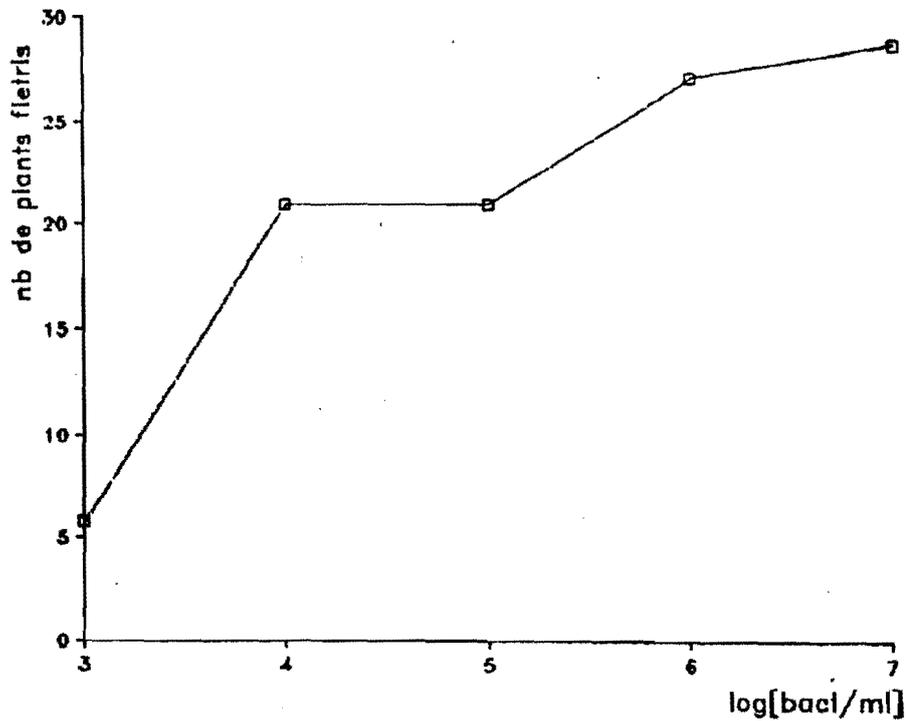


Fig. 17 : Nombre de plants flétris en fonction de la concentration bactérienne exprimée en échelle logarithmique 18 jours après inoculation

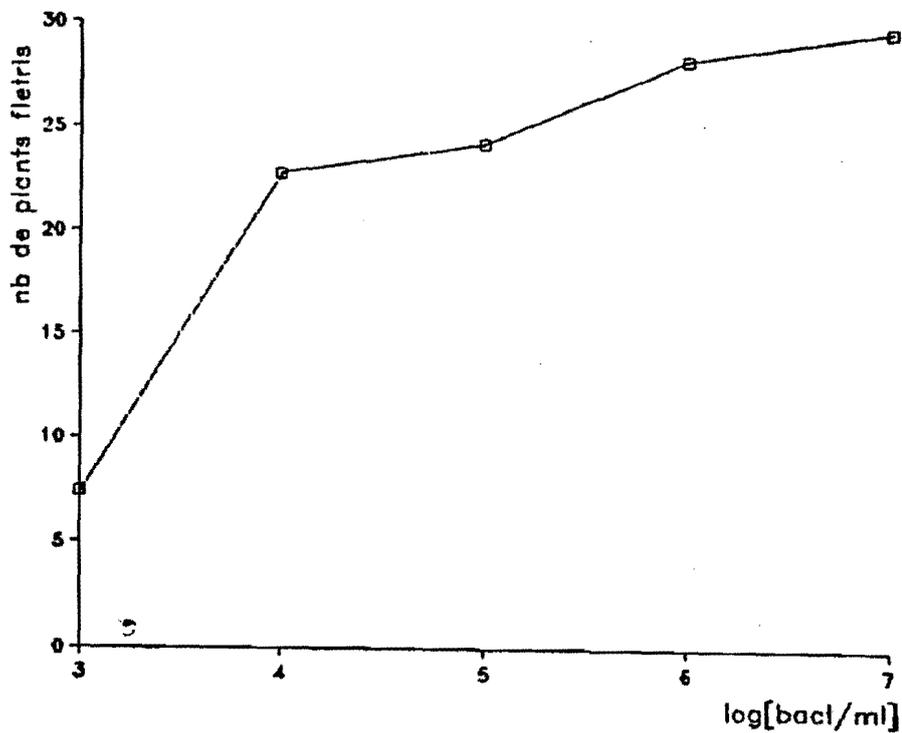


Fig. 18 : Nombre de plants flétris en fonction de la concentration bactérienne exprimée en échelle logarithmique 19 jours après inoculation

STATITCF). L'essai a été réalisé selon un plan de randomisation totale, le nombre de répétitions choisi pour un risque de première espèce de 5 %, et une puissance de test de 95 %.

Dans chaque répétition, 30 plants de la variété Roma sont inoculés par trempage de 10 mn avec la souche An4 pour chacune des concentrations : 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 bact/ml. Il y a 5 répétitions.

30 plants sont trempés 10 mn dans de l'eau stérile (témoins).

4.2. Résultats

La figure 15 représente l'évolution du flétrissement en fonction du temps, pour toutes les concentrations de l'inoculum.

Cette approche graphique nous a permis de sélectionner plusieurs dates pour lesquelles nous avons testé l'hypothèse d'égalité des cinq traitements -donc de non influence de la dose- par une analyse de variance.

Les résultats des analyses de variance sont résumés ci-dessous :

- les histogrammes des résidus répondent aux caractères de normalité pour les sept dates,

- le test de Bartlett d'égalité des variances résiduelles intratraitements nous conduit à ne pas tenir compte des résultats de l'analyse pour les dates 10, 11, 12 et 21 jours après inoculation,

- l'analyse de variance aux dates 8, 18 et 19 jours après inoculation indique des différences très significatives entre traitements,

- le test de Newman-Keuls permet le classement des traitements en groupes homogènes (tableau 10).

A partir de ces résultats, nous avons réalisé une analyse graphique du taux de flétrissement en fonction de la concentration exprimée en échelle logarithmique, à une date donnée : figures 16, 17, 18.

4.3. Discussion

Nous aurions pu tester l'hypothèse d'égalité des traitements pour chaque date, mais la figure 9 nous a permis de nous orienter sur les dates où nous risquions *a priori* le plus de mettre en évidence un effet significatif de la dose.

Il n'est pas certain que cet effet se fasse ressentir tout au long de l'évolution de la maladie. Mais s'il joue sur un

certain laps de temps, il est important que notre méthode d'inoculation en tienne compte.

Les variances résiduelles intratraitements trop importantes pour les dates 10, 11, 12 et 21 jours après inoculations ne signifient pas qu'il n'y a pas influence de la dose à ces dates, mais nos conditions d'expérimentation ne nous autorisent pas à conclure.

L'analyse graphique au 8ème jour (fig. 16) ne permet pas le choix de la dose, la pente de la courbe étant quasiment la même pour toutes les concentrations.

Par contre, pour les courbes des 18ème et 19ème jours (fig. 17 et 18), la pente la plus forte est obtenue à la concentration de 10^4 bact/ml.

C'est donc la dose autour de laquelle une variation de concentration se reflètera le plus fortement par une variation du nombre de plants flétris.

Par ailleurs, le test de Newman Keuls a montré l'homogénéité des traitements 10^4 et 10^5 bact/ml.

Cela confirme les résultats qui apparaissent dès la figure 9. Aux doses 10^7 et 10^6 bact/ml, le nombre de plants flétris atteint dès le 10ème jour une valeur élevée, et varie peu ensuite, quant à la concentration 10^3 bact/ml, elle provoque très peu de flétrissements. A ces doses, notre méthode d'inoculation risque de ne pas être assez sensible.

Il semble donc intéressant pour notre test, d'utiliser une concentration comprise entre 10^4 et 10^5 bact/ml, doses qui font flétrir les plants de façon sensible et progressive.

5 - Conclusion

Nous n'avons pas eu le temps de mener à bien la mise au point d'un test de l'agressivité des souches de *Pseudomonas solanacearum*.

Notre recherche a été très succincte. Nous avons comparé seulement deux techniques d'inoculation très différentes l'une de l'autre.

Par ailleurs, la possibilité d'utiliser la variété Roma, pourtant réputée très sensible au flétrissement bactérien, vient sûrement de ce que nous avons réalisé nos expériences à la saison la plus fraîche et donc la plus défavorable à la maladie.

Cependant, les différents problèmes que nous avons rencontrés, en particulier les attaques de mildiou et de bactériose foliaire, et les décisions qu'ils nous ont amenés à prendre, font partie des étapes préalables indispensables à une étude de ce type.

Nos résultats ouvrent malgré tout la perspective d'utiliser une technique d'inoculation qui présente plusieurs avantages. Elle est assez facile à mettre en oeuvre - beaucoup moins fastidieuse qu'une inoculation par micropipette- même sur des effectifs de plants importants. Elle permet un gain de temps notable, d'une part parce que les deux opérations de repiquage et d'inoculation se font simultanément, d'autre part parce qu'elle est réalisée sur des plants de deux semaines. Le dernier essai a permis de cerner une dose d'inoculation.

Il resterait éventuellement à choisir un temps de trempage optimal, en étant conscient qu'il est difficile, sur de grands effectifs, de travailler avec des temps très précis, pour des questions pratiques de manipulation des plants.

La dernière étape serait évidemment de tester un certain nombre des souches en collection à la station par cette méthode, afin de conclure à son efficacité.

La démarche serait d'inoculer à environ 5.10^4 bact/ml, en trempage des racines de plants de 2 semaines, plusieurs souches, puis de suivre l'évolution du flétrissement en fonction du temps pour chaque souche et de tester à quelques dates l'hypothèse d'égalité des traitements, donc d'agressivité des souches, par une analyse de variance. Le test de Newman-Keuls permettrait alors de les classer.

ANNEXES

Annexe 1

LISTE DES PAYS HEBERGEANT *P. solanacearum*

Map No. 138 Edition 5

Host key: A = potato B = tobacco C = Solanaceae other than 2 before D = Musaceae E = Other hosts

AFRICA

Algeria [C, 11:808; Kelman, 32:871]
 Angola [A, 39:555; C, E, 47, 3400]
 Canary Isl. [A, EPPO Conf. 1960, 41:57; considered free from pathogen, O. M. Suarez in litt. Apr. 1975]
 Egypt [A, 45, 1490]
 Ethiopia [A, Rep. Inst. Agric. Res., Addis Ababa, 1973-74; C, *Solanum inelongena*, R. D. Stewart in litt.; E, 13:585; D, 52, 3503]
 Gabon [C, 46, 1941]
 Kenya [A, 38:449; C, 31:136; 42:297; E, 53, 96]
 Libya [D, 43, 987; E, 10:775]
 Malagasy Republic [A, B, C, E, Dadant et al., 40:405; E, 39:719]
 Malawi [A, 38, 685; B, C, E, Wiehe, 34:548; D, 55, 3400]
 Mauritius [A, 34, 773; B, 30:373; C, 38:657; E, 29:351; 32:614; 33:059; 36:657]
 Morocco [C, 13:63; E, Itteuf, 40:08]
 Mozambique [A, C, de Carvalho, 38:397]
 Nigeria [A, C. P. News 1965 (3):1; D, litt. 10(2): 32, 1964, C, 49, 1570; D, E, 46, 1943]
 Reunion [A, Roger, 40:272; C, 46, 1179; E, *Pelargonium capitatum* in litt.]
 Rhodesia [A, 31:475; B, 35:508; C, 27:117; E, 27:117; 29:143. See also 30:79 for all hosts]
 Rodriguez Is. [A, C, Wiehe, 28:472]
 Ruanda & Burundi [A, B, C, 39:494]
 Senegal [D, 46, 576; E, Jaubert, 34:345]
 Seychelles [B, 51, 3101; C in litt. to J. F. Bradbury, Feb. 1969]
 Sierra Leone [A, B, C, ?D, E, Deighton, 35:7]
 Somalia [E, 13:585]
 South Africa [A, 24:49; 34:52; B, 6:143; C, 24:49; 26:331; 35:402; E, 27:172; Doidge et al., 34:385; 42:729]
 Tanzania [A, 27:353; C, 24:422; E, Kelman, 32:871; 28:246]

ASIA

Uganda [A, in litt.; B, C, E, 56, 116]
 Upper Volta [E, 1469]
 Zaïre [A, 37, 447; B, 36, 309; C, 39, 494]
 Zambia [A, C, E, Riley, 30:3; 39:759; B, 44, 85]
 Bangladesh [C, 22:228]
 Brunel [C, 42:656]
 Durma [A, 6:398; B, 45, 2781]
 Cambodia [C, Liltzenberger et al., 41:641]
 China [A, 45, 2441; B, 40:764; C, Kelman, 32:871; Wang, 25:525; E, 45, 2441]
 Hong Kong [C, E, 48, 2857]
 India [A, general with crop, Mundkur, 20:632; 8:201; 24:430; 26:440; 31:574; 34:517; 30:274; B, (Mynore) 34:517; (Punjab) 16:050; C, (Bengal) 20:230; D, (W. Bengal) 48, 230; E, (W. Bengal) 49, 2495]
 Indonesia ((Celebes) A, 17:162; E, 1:327; (Java) A, 30:186; D, 29:125; C, 8:390; E, 14:153; 17:162; 34:340, 672; (Sumatra) A, 8:226; B, 17:032; C, 5:053; E, 4:318; 8:74; 14:153; 17:301; 20:416; 28:163; (W. Irian) C, E, 32:540]
 Iran [E, 52, 2544]
 Israel [A, C, 40:14; A, 28:79]
 Japan [A, B, C, Kelman, 32:671; C, 33:576; E, 20:9 and many records by Fujitaka, 32:728]
 Korea [B, E, 7:121; Kelman, 32:671; C, 52, 1801]
 Lebanon [B, 49, 2395]
 Malaysia [(W) A, C, 39:537; B, 15:78; C, 29:12; ?D, 33:524; E, 32:367; ginger in litt. and many records by Thompson & Johnston, 34:548; (Sabah) B, C, E, Johnston, 40:151; D, Williams & Liu, Phytopath. Pag. 19, 1976]
 Philippines [A, Kelman, 32:671; B, 15:80; C, 2:261; 18:370; D, 49, 3579; E, 2:261; 5:671]
 Sri Lanka [A, B, 15:180; B, 13:78; C, 14:140; 19:364; 21:66; E, Anon., 15:632]

Map No. 138 Edition 5 (contd.)

Taiwan [B, 26:422; C, 17:303; D, 45, 1328; E, 27:450]
 Thailand [B, C, 43, 985; D, 45, 3508]
 Turkey [B, 38:396, around Maras only]
 USSR (Siberia) [E, 45, 3320]
 Vietnam [A, 42:296; B, 14:128; D, Q. Newsl. Pl. Prof. Comm. S.E. Asia & Pac. 15:6, 1972; E, 46, 3031]

NORTH AMERICA

Canada [(Ont.) C, 46, 3383]
 Mexico [A, C, 55, 5647; E, 49, 3740]
 USA [(S., E. & Central States) A, B, C, E, Agric. Handb. USDA 105, 1900 (40:511); Kelman 32:671; (Fla.) D, 40:511]

CENTRAL AMERICA & WEST INDIES

Costa Rica [A, 30:217; D, 37:493; C, D, E, Buddenhagen, 40:235; D, 40:551]
 Cuba [A, 51, 4761; B, C, Kelman, 32:671; D, 52, 3993]
 Dominica [A, 51, 3250; C, 34:84]
 Dominican Republic [A, 49, 2396; B, Kelman, 32:671; C, 51, 4761; ?D, 19:158]
 French Antilles [A, D, C, E, 34:518]
 Guadeloupe [A, C, 48, 1470; D, Kelman, 32:671]
 Guatemala [A, C, D, 49, 3185; E, 49, 3740]
 Haiti [D, Kelman, 32, 671; 53, 2317]
 Honduras [C, 49, 3740; D, 40:661]
 Jamaica [C, D, C. E. Henry in litt.]
 Martinique [A, C, 48, 1470]
 Nicaragua [C, D, 49, 3740]
 Panama [A, C, 49, 3740; B, 38:162; D, 40:551]
 Puerto Rico [A, 11:29; B, C, Kelman, 32:671]
 Salvador [A, C, Kelman, 32:671; D, 49, 3740]
 St. Lucia [A, 49, 2396; C, 51, 4761]
 St. Vincent [C, Kelman, 32:671]
 Trinidad [A, 49, 2396; C, 29:84; D, 40:551]

AUSTRALASIA & OCEANIA

Australia [(NSW) A, 28:123; B, 32:175; 37:133; C, 19:69; 34:285; D delete record, Walker in litt., 1971; (Qd) A, 33:209; C, 29:62; E, 39:372; 47, 280; (NT) C, 47, 2844; E, 50, 1142; (Vict.) A, 28:538; 33:507; C, 54, 5349; (S. Aust.) A, B, C, 52, 1839; (W. Aust.) A, Kelman, 32: 671; B, 42:746; C, 22:503]
 Fiji [A, C, 37:205; B, 16:196; E, 45, 940]
 Guam [C, 54, 392]
 Hawaii [A, B, E, Parrie, 19:432; Kelman, 32:671; C, 22:343; E, 43, 181]
 New Zealand [A, 16:631]
 Papua New Guinea [B, C, 43, 968]
 Samoa (W) [C, 45, 946; 54, 4400]
 Tahiti [48, 1469]

EUROPE

(For many doubtful records see Kelman, 32:671 and later EPPO reports)
 Bulgaria [B, C, E, 47, 2594]
 Cyprus [A, Georghlou & Papadopoulos, 37:7]
 Greece [A, 37:678]
 Italy [A, E, Kelman, 32:671; D, 37:421; C, 19:582]
 Poland [?A, 41:57; B, 41, 698; S, 41:568]
 Portugal [A, 29:581; C, Kelman, 32:671; (Madeira) A, 46, 1490]
 Rumania [?A, 41:57; B, 46, 1490]
 USSR [(Astrakhan) C, 10:493; (Krasnodar, Ukraine) E, 18:780; 43, 625]

SOUTH AMERICA

Brazil [A, 34:243, 314; B, C, E, Robbs, 35:752; C, 26:335; 40:75; D, Rev. Soc. Brasil. Fitopat. 5:191, 1972]
 Colombia [A, 29:528; B, C, D, E, 46, 3020; D, 45, 1445]
 French Guiana [C, 46, 2314]

Annexe 1bis

Map No. 138 Edition 5 (contd.)

Guyana [A, E, 45, 2442; C, 35:750; D, 40, 551]
Peru [A, 50, 2109; 52, 2718; D, 47, 1933]
Surinam [C, 35:727; Del Prado et al., 36:720; D, Surinam Agric. 24:85, 1976]
Venezuela [A, C, Standen, 32:38; D, 40:551]

NOTE: See CMI Descript. 15. Also: Kelman, 32:671; EPPO Conf. Rep., Bacterial Dis. of Palatoes, Paris, May, 1961; Duddenhagen (40:551) for bacterial wilt of banana and other Musaceae (French Guiana, 26:457; Ecuador, 37:362; Sierra Leone, 15:778; Malaysia, 33:524); for strains in S. & Central America, 49, 2735; for territories previously known as French West Africa, B, D, E, Mallemaire, 36:382.
Granada (D) 60/406

Numbers in square brackets e.g. [54, 1234] refer to
abstracts in the Review of Plant Pathology

d'après le C.A.B International Mycological Institute

Liste des plantes hôtes de *Pseudomonas solanacearum*

- Hosts: The host range is wide and the following have been recorded as hosts, mostly natural. Many were listed by Elliott (1951) and these appear without references. The numbers preceded by "B" are the numbers of cultures examined at CMI: *Acalypha boehmerioides*, *Acacia difficilis* (61,3858), *A. moulfordiae* (61,3858), *Ageratum boustanianum* (51,3089), *A. conyzoides*, *Althaea rosea*, *Amaranthus graecizans* (27:17), *Ambrosia artemisiifolia*, *A. elatior*, *A. trifida*, *Anthurium andraeanum* (B6760, B7808, B7116), *Arachis hypogaea*, *Arachis nambyquarae*, *Asclepias curassavica* (51,2706), *Aster pilosus*, *Atropa belladonna*, *Barleria lupulina*, *Beta vulgaris* var. *cicla* (63,3168), *Hidrens bipinnata*, *B. pilosa* (47,280), *Blumea balsamifera*, *Brassica chinensis* (=chinese cabbage) (63,3168), *Brassica oleracea* var. *capitata* (=cabbage) (44,1373a), *Browallia demissa*, *Calendula officinalis* (Mycological Paper 52) (34:548), *Calopogonium mucronoides* (4:638), *Canavalia ensiformis* (63,3168), *C. gladiata* (61,3858), *Canna* sp. (38:657), *C. glauca*, *C. indica*, *Capsicum annuum*, *C. longum*, *Cassia mimosaoides* (= *C. leschenaultiana*), *C. spectabilis* (63,3168), *Castanea dentata* (55,4587), *Casuarina equisetifolia* (44,51373), *Catharanthus roseus* (63,3168), *Cecropia peltata* (51,2706), *Chrysanthemum coronarium*, *C. morifolium* (33,355), *C. sinense*, *Citrullus lanatus* (58,4096), *Cleome speciosissima* (B9260-1, B1004), *Citibadium* sp. (40:235), *Codiaeum variegatum* var. *platum* (63,3168), *Colocasia esculenta* (B9849), *Commelina nudiflora*, *Corchorus acutangulus*, *C. capsularis* (49,2495), *C. olitorius* (49,2495), *Cosmos bipinnatus*, *C. coudatus* (B9406), *Crotalaria juncea* (63,3168), *Croton glandulosus* (19:123), *Croton glandulosus* var. *septentrionalis*, *C. hirsutus* (60,4167), *Cucurbita moschata* (61,3858), *C. pepo* (zucchini) (61,3858), *Cucurbita longa* (= *C. domestica*) (B8700, B7805), *Cyclamen persicum* (55,4132), *Cyphomandra betacea*, *Dahlia* sp. (63,3168), *D. rosea*, *D. plumata* (*D. variabilis*) (55,4587), *Datura metel* (*D. fastuosa*, *D. cornucopia*), *D. meteloides*, *D. stramonium*, *Dodonaea lanceolata* (47,280), *Eclipta alba* (44,1373), *Elentheranthera ruderalis*, *Erigeron canadensis* (*Leptilon canadense*), *Eugenia caryophyllus* (*E. aromatica* B8719), *Eupatorium odoratum* (43,1373), *Euphorbia hirta* (B10052), *E. metaus*, *E. prunifolia* (60,4167), *Fleurya interrupta*, *Foeniculum vulgare* (59,3088), *Fuchsia hybrida* (*F. speciosa*), *Galphimia glauca* (= *Thryallis glauca*) (63,3168), *Gaillardia* (63,3168), *Gerbera* sp., *Glycine max* (63,3168; 61,949), *Gossypium hirsutum* (55,1271), *Gymna crepidioides* (*Crassocephalum crepidioides*, *Cynura crepidioides*), *Hedychium coronarium* (44,2812), *H. flavum* (44,2812), *H. gardnerianum* (44,2812), *Helianthus* spp., (40:511), *H. annuus*, *Heliconia* spp. (44,1373), *H. acuminata* (40:699), *H. bida* (*H. caribaea*) (40:235), *H. imbricata* (40:699), *Heliconia latispatha* (40:235), *Hellotroptum cannabinum*, *H. indicum*, *Hevea brasiliensis* (34:672), *Hibiscus* spp., *H. cannabinum*, *Hydrangea arborescens*, *Hyoscyamus niger*, *Hyptis brevipes*, *H. capitata* (B9397, B9398, B9840), *H. suaveolens* (58,5682), *Impatiens balsamina*, *I. sultanii*, *Indigofera arrecta*, *Ipomoea batatas* (61,4621), *I. setosa* (B9410-1), *I. triloba*, *Lablab purpureus* (*L. niger* 56,3786), *Lantana aculeata*, *L. camara*, *L. trifolia* (3:107), *Leonurus sibiricus* (B9832), *Leucas linifolia*, *Lupinus* spp. (56,5415), *Lycopersicon* spp. (144 wild spp. and crosses 36:622), *L. cerasiforme*, *L. esculentum*, *L. pyriforme*, *Macadamia ternifolia* (B6108), *Mucuna* (*Mucuna*) sp., *Mauhot glazovii*, *M. esculenta* (*M. utilis*), *Maranta arundinacea* (Thompson & Johnston 34:548), *Martynia tinctoria* (= *Probasidea jussieu*), *Medicago sativa* (54,1778), *Melampodium perfoliatum* (59,1376), *Melochia carchorifolia*, *Milleria quinqueflora* (59,103), *Morus alba* (61:621), *Musa acuminata* ssp. *errans* (= *M. acuminata* ssp. *banksii*) (45,1113), *M. acuminata* ssp. *microcarpa* (45,1113), *M. angustigemma* (45,1113), *M. bahisiana* (49,2735), *M. cavendishii*, *M. ornata* (45,1113), *M. paradisica*, *M. sapientum*, *M. textilis* (47,1933), *Nicotiana* spp. 8 crosses with *N. tabacum* (10:561), *Nicotiana alata* (*N. affinis*), *N. alata* var. *grandiflora*, *N. atropurpurea* var. *grandiflora*, *N. glauca*, *N. glutinosa* (29:582), *N. macrophylla*, *N. quadrivalvis*, *N. rustica*, *N. saundersae*, *N. suaveolens*, *N. sylvestris*, *N. tabacum*, *N. tomentosa*, *Olea europaea* (61,4621), *Onobrychis viciaefolia* (*O. sativa*) (54,1778), *Oxalis latifolia* (B6761), *Papaver somniferum* (55,4232), *Pelargonium capitatum* (44,1373), *P. hortorum* (60,5970), *Petunia hybrida* (19:153), *P. vulgaris* (44,1373), *Phaseolus vulgaris* var. *nanus*, *Phlox drummondii* (Thompson & Johnston 34:548), *Phyllanthus niruri*, *Physalis* spp. (45,701a), *P. alkekengi*, *P. angulata*, *P. crassifolia*, *P. minima*, *P. peruviana*, *P. philadelphica*, *P. pruinosa*, *P. pubescens* (40:235), *Phytolacca octandra* (8:74), *Piper arifolium* (51,2706), *P. peltatum* (51,2706), *Pisum sativum*, *Poinciana regia* (38:657), *Polanisia viscosa*, *Polygonum tinctorum*, *Pongamia pinnata* (63,3168), *Psophocarpus tetragonolobus* (60,4128), *Pultenaea villosa* (63,3168), *Rapistrum rugosum* (47,280), *Rheum raphaniticum*, *Ricinus communis*, *Ruellia tuberosa*, *Rumex sagittatus*, *Sainpaulia* sp. (32:382), *Salpiglossis sinuata*, *Salvia farinacea* (34:548), *S. privoides*, *S. reflexa* (63,3168), *Santiaea magnifica* (61,3858), *Schizanthus pinnatus*, *Scoparia dulcis*, *Senecio* × *hybridus* (63,3168), *Senecio sonchifolius*, *Sesamum indicum* (= *S. orientale*), *Sesbania grandiflora*, *Sida spinosa* (51,3089), *Solanum aculeatissimum*, *S. andigenum* (47,1955), *S. antipoviczii* (27:35), *S. auriculatum* (47,280), *S. caldasii* (27:35), *S. carolinense*, *S. charnense* (27:35), *S. cinereum* (58,4658), *S. citrifolium*, *S. demissum* (27:35), *S. dulcamara* (56,4167), *S. hirtum* (51,2706), *S. incanum* (B7554), *S. integrifolium* (*S. texanum* 12:488), *S. macrocarpon*, *S. mammosum*, *S. mauritianum* (51,3089), *S. melongena*, *Solanum melongena* var. *hreviviolaceum*, *S. nigrum*, *S. nodiflorum* (40:235), *S. panduraforme* (44,1373), *S. phureja* (50,1575), *S. pyracanthum* (16:271-272), *S. quitoense*, *S. sisymlirii* (16:271-272), *S. torvum* (40:235), *S. tuberosum*, *Solanum tuberosum* var. *eigenheimer*, *S. scaphothianum* (61,3858), *S. umbellatum*

Annexe 2bis

(51,2706), *S. verbascifolium* (51,2706), *Stachytarpheta indica*, *Stizolobium niveum*, *Strelitzia reginae* (44,1373), *Stylosanthes humilis* (63,3168), *S. mucronata* (63,3168), *Symphytum peregrinum* (44,1373), *Symphytum uplandicum* (63,3168), *Synedrella nodiflora*.

Tagetes erecta, *Tagetes minuta* (45,958), *T. patula* (63,3168), *Tectona grandis* (44,1373), *Tephrosia vogelii*, *Tithonia* sp. (Johnston 40:28), *Tournefortia angustiflora* (40:235), *Trachyspermum ammi* (59,3088), *Trichosanthes anguina* (63,3168), *Trifolium* spp. (seeds 53,4017), *Tropaeolum lobbianum*, *T. majus* (63,3168), *T. minus* (19:123), *T. peregrinum*.

Vanilla planifolia, *Verbena ermoloides*, *V. hybrida*, *Vicia faba* (44,1373), *Vigna radiata* (*Phaseolus radiatus*), *V. umbellata* (*Phaseolus calcaratus*), *V. unguiculata* (56,1826), *Xanthium chinense*, *X. pennsylvanicum*, *X. pungens* (47,280), *Xanthosoma roseum* (51,2706), *Zingiber officinale* (44,1373), *Zinnia elegans*.

The following have been successfully inoculated, but are unlikely to be natural hosts. Some are symptomless carriers after inoculation. For those without a reference see 48,692: *Brassica campestris*, *Capsella bursa-pastoris*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. ambrosioides*, *C. paniculatum*, *Cercopis speciosus* (1:328), *Daucus carota* (1:328), *Erodium moschatum*, *Galinsoga parviflora*, *Gnaphalium elegans*, *Hibiscus subdariffa* (1:328), *Hypochoeris radicata*, *Lanana asplenifolia* (59,3526), *Linum usitatissimum* (1:328), *Mucuna deeringiana* (19,123), *Petroselinum crispum* (*P. sativum* 1:328), *Phaseolus coccineus* (*P. multiflorus* 29:582), *P. lunatus* (19:123), *Rumex abyssinicus* (1:328), *R. acetosella*, *R. crispus*, *R. obtusifolius*, *Sitona gallica*, *Sonchus arvensis*, *Solanum caripense*, *Sallya anthemidifolia*, *Spergula arvensis*, *Tagetes signata* (1:328), *Tallium racemosum* (1:328), *Verbena brasiliensis*, *Verbesina alata* (1:328).

Indirect or incomplete evidence suggests that the following may also be hosts: *Albizia falcata* (6:759), *Ensete ventricosa* (*Musa ensete*, 18:693), *Leucaena glauca* (6:759), *Samanea saman* (*Pithecolobium saman* 4:638), and *Portulaca oleracea* (18:478).

BRADBURY, J.F., 1986 - Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB Mycological Institute, pp : 150-153.

Annexe 3

MILIEUX DE CULTURE

* Milieu de KELMAN

- Bactopeptone	10 g/l	
- Caseino hydrolysat	1 g/l	(en boites)
- Glycerine	6,25 g/l	
- Agar	18 g/l	

* P.Y.D.A.C.

- Bactopeptone	3 g/l	
- Extrait de levure	3 g/l	(en tubes)
- Glucose	5 g/l	
- Ca CO ₃	40 g/l	
- Agar	15 g/l	

* L.P.

- Bactopeptone	7 g/l	(en tubes)
- Extrait de Levure	7 g/l	

Annexe 4

MILIEU DE CULTURE POUR LA DETERMINATION DES BIOVARS

Milieu d'AYERS (ARJ) modifié HAYWARD

- Bactopeptone	1 g/l
- $\text{NH}_4 \text{H}_2\text{PO}_4$	1 g/l
- KCl	0,2 g/l
- $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g/l
- Bleu de Bromothymol	0,003 g/l
- Agar	1,5 g/l

Les solutions d'hydrate de carbone :

- Glucose	solution à 10 %
- Saccharose	" à 10 %
- Lactose	" à 10 %
- Maltose	" à 10 %
- Cellobiose	" à 10 %
- Mannitol	" à 10 %
- Sorbitol	" à 10 %
- Dulcitol	" à 10 %

Annexe 5

Milieu pour le test de dénitrification

Na ₂ HPO ⁴	2,8 g	
K H ₂ PO ₄	2,7 g	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g	
Yeast extract	5,0 g	
Glycérol	10,0 g	
KNO ₃	10,0 g	
Agar	2,0 g	
Eau distillée	1 000 cc	Couler en tubes

Milieu Tyrosine

Saccharose	5 g	
Hydrolysate de caséine dévitaminé	10 g	
K ₂ H PO ⁴	0,5 g	
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,25g	
L-TYR	1 g	
Agar	15 g	
Eau distillée pH 7,2 à 7,4	1 000 cc	Couler en tubes inclinés

Annexe 6

AGGLUTINATION SEROLOGIQUE DES BACTERIES

en plaque de microtitration

tampon phosphate K 0,1 M à pH 7,2

2 vol $K_2 HPO_4$ (17,41 g/l) + 1 vol $KH_2 PO_4$ (13,09 g/l)

antigènes

suspensions bactériennes dans le tampon

- à 10^9 B/ml si plaque à fond rond U et lecture à l'oeil nu

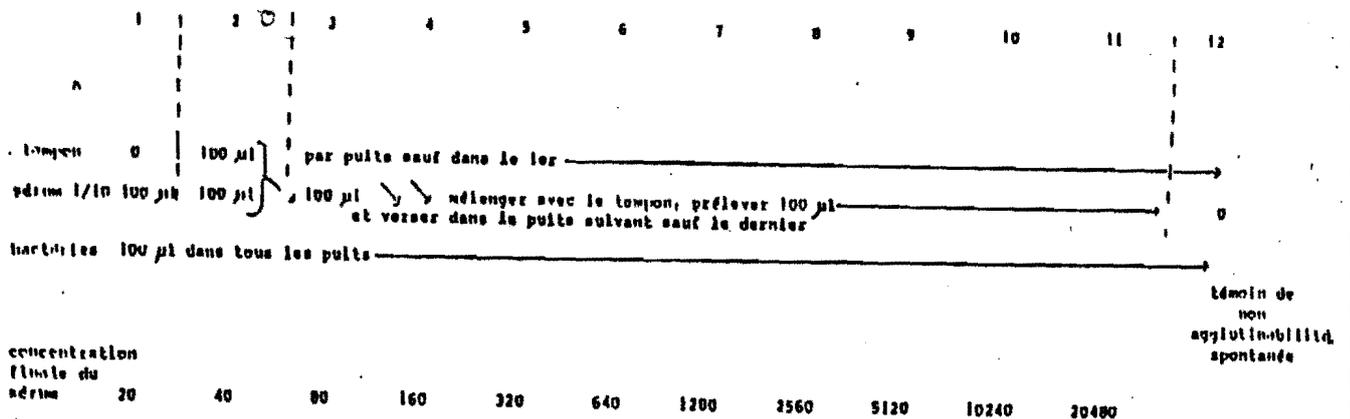
- à $3 \cdot 10^8$ B/ml " plat U et lecture au GX40

distribution des réactifs

exemple de titrage d'un sérum

distribution des réactifs

exemple de titrage d'un sérum

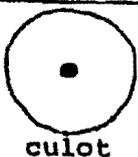


Agiter 1h à la température du labo
ou bien placer 2h à 37° la plaque couverte

Laisser reposer 24h.

lecture

fond U oeil nu



culot

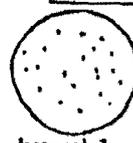
-



crêpe

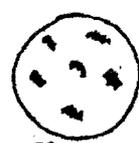
+

fond U GX40



trouble homogène

-



flocons

+

Le titre est la dernière dilution du sérum donnant encore une réaction positive. Il dépend de la méthode utilisée.

Annexe 7

Mélange pour les semis et repiquages

4/12 Pouzzolane

3/12 Magaline (Terreau local)

3/12 Terre

2/12 Sable

Annexe 8

Tableau 6 : Nombre de plants flétris/20 après inoculation en chambre à température contrôlée (jour/nuit = 20°C/18°C)

		JOURS APRES INOCULATION						
Espèce	Souche	7	8	9	12	15	20	26
Tomate	T30	2	4	7	14	14	16	17
	7-7	7	10	12	16	18	19	20
	7-8	3	5	10	16	18	18	20
Pomme de terre	T30	0	0	0	0	1	7	10
	7-7	0	0	0	16	20	20	20
	7-8	0	0	0	15	19	20	20

Annexe 11

Tableau 9 : Essai n°3
Nombre de plants flétris après inoculation
par trempage des plants âgés de 2 semaines

Variété	Temps de trempage	JOURS APRES INOCULATION									
		7	8	9	10	11	14	15	16	17	18
CARAIBO	5 mn	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	15 mn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MST32-1	5 mn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15 mn	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
ROMA	5 mn	1	1	2	2	3	4	6	6	7	7
	15 mn	3	6	6	6	7	7	7	8	8	8

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AKIEW E.B., 1985. Influence of soil moisture and temperature on the persistence of *Pseudomonas solanacearum*. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p77-79. Persley G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

AUTRIQUE A., 1982. Bacterial wilt of potato in Burundi. In : Research for the potato in the year 2000. Proceedings international congress. CIP Lima. Peru. p63-64.

AVERRE C.W., KELMAN A., 1963. Severity of bacterial wilt as influenced by ratio of virulent to avirulent cells of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology (1964). Vol. 54, p779-783.

AVRDC. 1984. Progress Report. Taiwan. p77-80.

BEREAU M., MESSIAEN C.M., 1975. Réceptivité comparée des sols à l'infestation par *Pseudomonas solanacearum*. Annales de Phytopath. 1975, 7 (3), p191-193.

BOWMAN J.E. and SEQUEIRA L., 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Potato : Infectivity titrations in relation to multiplication and spread of the pathogen. American potato Journal. 1982, Vol. 59, p155-164.

BUDDENHAGEN I.W. and KELMAN A., 1964. Biological and Physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Pl. Patho. Vol. 2, p203-230.

BUDDENHAGEN I.W., 1985. Bacterial wilt revisited. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p126-143. Persley G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

BUDDENHAGEN N.I., SEQUEIRA L., KELMAN A., 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. Vol. 52, p726 . Abstract.

CIAMPI L. & SEQUEIRA L., 1980a. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. American Potato J. Vol. 57, p307-317.

CIAMPI L. & SEQUEIRA L., 1980b. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. American Potato J., Vol. 57, p319-329.

CIP, 1984. Thrust III. Bacterial and Fungal Diseases. p53.

DIGAT B. et CAMBRA M., 1976. Specificity of antigens in *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith and application of serology for studying Bacterial Wilt. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p38-57, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

EL-GOORANI M.A., 1976. Current status of the potato brown rot research in Egypt. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p30-37, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

ERCOLANI G.L., 1976. Assessment of plant resistance by infectivity titration. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p30-37, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

ERINLE I.D., 1976. Bacterial wilt of potato and tomato in the Northern States of Nigeria. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p73-74, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

ESCOLANT-TAUZIER M.C., 1982-1983. Essai de caractérisation de souches de *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith isolées des îles de La Réunion, de Grenade et de Haïti. DEA Phytopathologie.

ESCUDE A., DIGAT B., 1965. Diagnostic rapide de flétrissement bactérien des solanées par le test de séro-agglutination. Agro. Trop(1965), n°6-7, p640-642.

FAHY P.C. and HAYWARD A.C., 1983. In : Plant bacterial diseases, a diagnostic guide, FAHY P.C. et PERSLEY G.J. Ed., Academic Press, p337-374.

FELIX S., 1973. Une méthode de lutte contre le flétrissement bactérien et les anguillules de la tomate. Revue agricole et sucrière de l'île Maurice. Vol. 52. Janvier-Mars, 1973, n°1.

FRENCH E.R. and DE LINDO L., 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Potato : specificity and temperature sensitivity. Phytopathology. Vol. 72, n° 11 , p1408-1412.

FRENCH E.R. et SEQUEIRA L., 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America : a comparative study. *Phytopathology*, 60 : p506-512.

FRENCH E.R., 1979. Classification, distribution and origin of *Pseudomonas solanacearum*. In : Developments in control of Potato Bacterial diseases. Report of a planning conference held at CIP Lima. Peru. June 12-15. 1979.

FRENCH E.R., 1979. Progress in the integrated control of bacterial wilt. In : Developments in control of Potato Bacterial Diseases. CIP, p72-81. Report of a planning conference held at CIP Lima. Peru. June 12-15, 1979.

FRENCH E.R., 1985; Interaction between strains of *Pseudomonas solanacearum*, its hosts and the environment. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p99-104. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

FRENCH E.R., 1986. Evaluation au champ des clones du CIP sélectionnés pour la résistance au flétrissement bactérien. Centre International de la Pomme de terre (CIP). Série d'évaluation des technologies n°2.

GARDAN L. et LUISETTI J., 1983. Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes. INRA, Angers, 32 p.

GRAHAM J. and LLOYD A.B., 1978. *Solanum cinereum* R. Br., a wild host of *Pseudomonas solanacearum* Biotype II. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, June 1978, p124-126.

GRAHAM J. and LLOYD A.B., 1979. Survival of Potato strain (Race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the Deeper Soil Layers. *Aust. J. Agric. Res.*, 1979, 30, p489-496.

GRAHAM J., JONES D.A., LLOYD A.B., 1979 Survival of *Pseudomonas solanacearum*(Race 3) in Plant Debris and in Latently Infected Potato tubers. *Phytopathology*, Vol. 69, n°10, 1979, p1100-1103.

GRANADA G.A. & SEQUEIRA L., 1983a. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil rhizosphere and plant roots. *Can. J. Microbiol.* 29, p433-440.

HARRIS D.C., 1971. Intra-specific variation in *Pseudomonas solanacearum*. Conf. Plant. Path. Bact. Wageningen. Proc. 3rd. W (1971) p289-292.

HARRIS D.C., 1976. Bacterial wilt in Kenya with particular reference to potatoes. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p84-88, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

HARRISON D.E., 1961. Bacterial wilt of potatoes. Australian J. of Agricultural Research, 1961, Sept., Vol. 12, n°5.

HAYWARD A.C., 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. appl. Bact. 27 (2), p265-277.

HAYWARD A.C., 1976. Systematics and relationship of *Pseudomonas solanacearum*. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p6-21, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

HAYWARD A.C., 1983. The non-fluorescents Pseudomonads. In : Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. FAHY P.C. et PERSLEY G.J. Ed., Academic Press, p107-135.

HAYWARD A.C., 1985. Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in Asia and Australia : an overview. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October 1985, p15-24. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

HE L.Y., SEQUEIRA L. and KELMAN A., 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease (1983). Vol. 67, n°12, p1357-1361.

HUSAIN A. and KELMAN A., 1958. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. Vol. 48, march 1958, p155-165.

JANSE J.D., 1988. A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 18, 000 000.

JATALA P., MARTIN C. and MENDOZA H., 1982. Relationships of resistance to *Meloidogyne incognita* and *Pseudomonas solanacearum* in potatoes. In : Research for the potato in the year 2000. Proceedings international congress, p106.

JENKINS S. et KELMAN A., 1976. Techniques for the study of *Pseudomonas solanacearum*. In: Proc. 1th. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p143-147, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

KATAYAMA K. & KIMURA S., 1984. Prevalence and temperature Requirements of Biovar II and IV strains of *Pseudomonas solanacearum* from potatoes. Annals Phytopath. Soc. Japan 50, p476-482.

KELMAN A. & SEQUEIRA L., 1965. Root to root spread of *Pseudomonas solanacearum*, Phytopathology, 55, p304-309. Résumé.

KELMAN A. and HRUSCHKA J., 1973. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. Journal of General Microbiology (1973), 76, p177-188.

KELMAN A. and JENSEN J.H., 1951. Maintaining virulence in isolates of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology. Vol. 41, p185-187.

KELMAN A. and PERSON L., 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. Phytopathology. Vol. 51, march 1961, p158-161.

KELMAN A., 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a Tetrazolium medium. Phytopathology, Vol. 44, p693-695.

KELMAN A., 1981. Brown rot. In: Compendium of Potato diseases W.J. HOOKER Ed., The American Phytopathological Society, p29-31.

KEMPE J. and SEQUEIRA L., 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes : attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. Plant disease. Vol. 67, n°5, p499-503.

KESHWAL R.L., 1977. On the inoculation techniques with bacterial wilt pathogen, *Pseudomonas solanacearum*. Indian J. Mycol. and Pl. Pathol. Vol. 7, n°2, p153-154.

KLOOS J.P., 1985. Effect of planting depth and hilling on bacterial wilt in potato. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p80-83. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

LALLMAHOMED G.M.K. & RICAUD C., 1978. Root versus stem inoculation in pathogenicity tests and in the assessment of resistance to bacterial wilt in tobacco and tomato. Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact., Angers, 1978, p857-872.

LLOYD A.B., 1976. Bacterial wilt in a cold-temperature climate of Australia. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p134-135, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

LLOYD A.B., 1978. Survival of the potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. Proc. 4th. Int. Conf. Plant Path. Bact., Angers, 1978, p875-878.

LOZANO J.C. and SEQUEIRA L., 1970. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by a Leaf Infiltration Technique. Phytopathology 58 (1970), p833-838.

LUM K.Y. and KELMAN A., 1981. Infectivity titrations of *Pseudomonas solanacearum* on tomato. Phytopath. Vol. 71, n°8, 1981, p891.

MARTIN C. & FRENCH E.R., 1985. Bacterial wilt of potato. Technical Information Bulletin 13. International Potato Center (CIP), 16p, 2nd ed.

MARTIN C. and NYDEGGER U., 1982. Susceptibility of *Cyphomandra betacea* to *Pseudomonas solanacearum*. Plant disease. Vol. 66, N° 11, p1025-1027.

MARTIN C. et al., 1981. Bacterial wilt of potatoes in the Amazon Basin. Plant Disease 65, p246-248.

MARTIN C., 1979. Sources of resistance to *Pseudomonas solanacearum*. In : Developments in control of potato bacterial diseases. Report of a Planning Conference held at CIP Lima. Peru. June 12-15, p49-53.

MATEO N., AGUILAR D., FIALLOS W., TREJO J., SALGADO J., 1982. Efecto de periodos de desando de suelo en el redimiento e incidencia de *Pseudomonas solanacearum* en papa en Honduras. Fitopatologia (1982) 17 (1), p24-29.

MESSIAEN C.M., 1975. Le potager tropical. Tome 2, Paris, P.U.F., p205-212.

MEW T.W. and HO W.C., 1976. Varietal resistance to bacterial wilt in tomato. Plant Dis. Reprt. Vol. 60, p264-268, n°3. March 1976.

MEW T.W. et HO W.C., 1977. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. Phytopathology, 67, p909-911.

NYANGERI J.B., GATHURW E.M. & MUKUNYA D.N., 1984. Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. Tropical Pst Management 30 (2), p162-165.

OKABE N. et GOTO M., 1961. Studies on *Pseudomonas solanacearum*. XI Pathotypes in Japan. RPP Vol. 43, résumé 669.

OLSSON K., 1976. Overwintering of *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p105-109, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

OSTLE A. & HOLT J.G., 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 44, p238-241.

PEREGRINE W.T.H. and KASSIMBBBIN A., 1982. Grafting : a simple technique for overcoming bacterial wilt in tomato. 1982 march. Tropical Pest Management 28 (1), p71-76.

PERSLEY G.J., 1985. Ecology of *Pseudomonas solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p71-76. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

PRIOR P., 1987. Modulation de l'infection à *Pseudomonas solanacearum* dans les sols réceptifs par amendements organiques riches en azote. In : Compte rendu de l'atelier de travail du 8 septembre 1987 sur *Pseudomonas solanacearum*, ROTT P., NOTTEGHEM J.L., BAUDIN PCIRAD. Mission Défense des Cultures. p13-14.

SCHAAD N.W., TAKATSU A., DIANESE J.C., 1978. Serological identification of strains of *Pseudomonas solanacearum* in Brazil. In : Proceedings of the Fourth International Conference of plant pathogenic bacteria. Angers, France, p295-300.

SCHMIEDICHE P., 1985. Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In : Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p105-111. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

SCHMIT J. et ROBERT M., 1984. Action des argiles sur la survie d'une bactérie phytopathogène *Pseudomonas solanacearum* E.F.S. C.R. Acad. Sc. Paris, p299. Série II, n°11, 1984.

SEQUEIRA L. & ROWE P.R., 1969. Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. American Potato J., Vol. 46, p451-462.

SEQUEIRA L., 1982. New approaches for control of bacterial wilt of potato. In : Research for the potato in the year 2000. Proceedings international congress. CIP Lima. Peru, p174-175.

SHAMSUDDIN N., 1978. Survival of potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. Journal of the Australian Institute of Agricultural Science. Sept-Dec, 1978, p212-215.

SLY L.I., 1983. Preservation of microbial cultures. In : Plant bacterial diseases, a diagnostic guide, FAHY P.C. et PERSLEY G.J. Ed., Academic Press, p275-295.

SUATMADJI R.W., 1985. Complex diseases involving nematodes and *Pseudomonas solanacearum* in potatoes in the tropics and subtropics. In Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 october 1985, p120-125. PERSLEY G.J. Ed. ACIAR Proceedings.

SUSLOW T.V., SCHROTH, M.N., ISAKA M., 1982. Application of a rapid method for GRAM differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72, 7, p917-918.

SWANEPOEL A.E., 1988. Characteristics of South African Strains of *Pseudomonas solanacearum*. Plant disease 72, p403-405.

TANAKA Y., 1976. Factors affecting survival of *Pseudomonas solanacearum*. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p122, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

THURSTON H.D., 1963. Bacterial wilt of potatoes in Colombia. American Potato J., Vol. 40, p381-390.

THURSTON H.D., 1976. Task force committee report. Breeding for resistance to bacterial wilt. In : Proc. Ith. Int. Conf. Ecol. Control. Bact. Wilt, Raleigh, July 18-July 23, p150-155, SEQUEIRA and KELMAN Ed.

TORRES E.M., FRENCH E.R., MARTIN C., 1985. Differential reaction of potato clones to *Pseudomonas solanacearum* at two sites in Peru. *Fitopatologia* (1985) 20 (1), p1-6.

VAN DER PLANK J.E., 1968. Résistance des plantes aux maladies. Traduction française, 1974. Paris, Agence de coopération culturelle et technique, 223 p.

VOLCANI Z. & PALT J., 1960. *Pseudomonas solanacearum* in Israël. *Plant disease Reprtr.* 44, p448-449. Résumé.

WELZ G., 1987. Analysis of virulence in pathogen populations. IN : *Experimental techniques in plant disease epidemiology*, KRANZ J. et ROTEM J. Ed., Springer-Verlag, p165-176.

WINSTEAD N.N. and KELMAN A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, Vol. 42, p628-634.