



**HAL**  
open science

# Contribution à la mise au point d'un test de sensibilité variétale d'Actinidia sp. à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

Amandine Boubennec

► **To cite this version:**

Amandine Boubennec. Contribution à la mise au point d'un test de sensibilité variétale d'Actinidia sp. à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. Sciences agricoles. 2012. dumas-00737563

**HAL Id: dumas-00737563**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00737563>**

Submitted on 5 Oct 2012

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

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



**AGROCAMPUS OUEST**

**CFR Angers**

2 rue André Le Nôtre  
49045 ANGERS cedex 01

**Ctifl**

**Centre de Lanxade**

28 route des Nébouts  
24130 PRIGONRIEUX

Mémoire de Fin d'Etudes

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences  
Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2011 - 2012

Spécialisation ou option : FLAM – Fruits Légumes Alimentation et Marchés

**Contribution à la mise au point d'un test de sensibilité variétale d'*Actinidia sp.*  
à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.**

Par : Amandine BOUBENNEC



Volet à renseigner par l'enseignant responsable de l'option/spécialisation  
Ou son représentant

Bon pour dépôt (version définitive)

Date : .../.../... Signature :

Autorisation de diffusion : Oui  Non

**Devant le jury :**

Soutenu à Angers

le : 06 septembre 2012

Sous la présidence de : Mathilde BRIARD

Maîtres de stage : Bernard HENNION et Michel GIRAUD

Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE

Autres membres du jury (Nom, Qualité) : Sophie CESBRON (Ingénieur d'études - INRA)

"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent  
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".



## **Fiche de diffusion du mémoire**

A remplir par l'auteur<sup>(1)</sup> avec le maître de stage.

Aucune confidentialité ne sera prise en compte si la durée n'en est pas précisée.

### **Préciser les limites de la confidentialité<sup>(2)</sup> :**

➤ Confidentialité absolue :  oui  non

*(ni consultation, ni prêt)*

↳ Si oui  1 an  5 ans  10 ans

➤ A l'issue de la période de confidentialité **ou** si le mémoire n'est pas confidentiel, merci de renseigner les éléments suivants :

Référence bibliographique diffusable<sup>(3)</sup> :  oui  non

Résumé diffusable :  oui  non

Mémoire consultable sur place :  oui  non

Reproduction autorisée du mémoire :  oui  non

Prêt autorisé du mémoire :  oui  non

.....  
Diffusion de la version numérique :  oui  non

↳ Si oui, l'auteur<sup>(1)</sup> complète l'autorisation suivante :

*Je soussigné(e) \_\_\_\_\_, propriétaire des droits de reproduction dudit résumé, autorise toutes les sources bibliographiques à le signaler et le publier.*

Date :

Signature :

**Rennes/Angers, le**

**Le maître de stage<sup>(4)</sup>,**

**L'auteur<sup>(1)</sup>,**

**L'enseignant référent,**

---

(1) auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(2) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMBUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(3) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé.

(4) Signature et cachet de l'organisme.



# Remerciements

---

Je tiens à remercier mes maîtres de stage, Messieurs Bernard Hennion et Michel Giraud, pour leurs conseils et leurs appuis techniques, mais également pour le partage de leur expérience que ce soit en termes de connaissance de la filière kiwi ou de bactériologie.

Je souhaite également exprimer mes remerciements à Aude Moronvalle, pour son aide technique dans les manipulations de laboratoire et dans la réalisation des essais.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du Ctifl que j'ai pu côtoyer pendant ces 6 mois, ainsi que toutes les personnes que j'ai pu rencontrer ou contacter durant mon stage et qui ont participé, de près ou de loin, à la réflexion et à la mise en œuvre de ce projet.

Enfin, je remercie pour leur richesse et leur bonne humeur, les stagiaires et apprentis avec lesquels j'ai partagé cette période de stage.



# Table des matières

---

<u>Introduction</u> .....	1
<u>Première partie : étude bibliographique</u> .....	3
1. Mieux connaître le kiwi .....	3
2. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> ( <i>Psa</i> ) : une menace pour le kiwi .....	4
2.1. Une bactérie du genre <i>Pseudomonas</i> .....	4
2.2. Les caractéristiques de <i>Psa</i> .....	5
2.2.1. Des espèces et variétés dont la sensibilité diffère .....	5
2.2.2. Les différentes populations et souches de <i>Psa</i> .....	6
2.2.3. Mode de dispersion et de propagation .....	7
2.2.4. Mode de contamination et migration dans la plante .....	8
2.2.5. Symptômes .....	8
2.2.6. Identification et détection .....	10
2.2.7. Epidémiologie .....	10
3. La situation mondiale vis-à-vis de la présence de <i>Psa</i> .....	10
3.1. Le continent Asiatique, premier touché .....	10
3.2. L'arrivée de <i>Psa</i> en Europe .....	10
3.3. Plusieurs autres pays touchés .....	11
3.4. La situation française .....	11
4. Les actions mises en place : une mobilisation générale .....	12
4.1. Au niveau mondial et européen .....	12
4.2. Au niveau français .....	12
<u>Deuxième partie : matériel et méthode</u> .....	14
1. Laboratoire confiné .....	14
2. Souches bactériennes utilisées .....	14
3. Milieux de culture .....	14
4. Matériel végétal .....	15
5. Courbe de densité optique en fonction de la concentration .....	15
5.1. Etablissement de la courbe .....	15
5.2. Vérifications de points des courbes .....	16
5.2.1. Premières manipulations .....	16
5.2.2. Deuxièmes manipulations .....	16
6. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter .....	17
6.1 Préparation du matériel végétal et de laboratoire .....	17
6.2 Préparation de l'inoculum .....	17
6.3 Inoculation et incubation .....	18
6.4 Dispositif expérimental et mesure des résultats .....	18
7. Choix d'une procédure de désinfection des rameaux .....	18
7.1. Identification des champignons présents sur les rameaux .....	18
7.2. Test de différentes substances aux propriétés désinfectantes .....	18
7.3. Organismes fongiques présents dans le laboratoire .....	19
8. Test de sensibilité variétale défini .....	19
8.1. Préparation du matériel de laboratoire .....	19
8.2. Préparation du matériel végétal .....	20
8.3. Préparation de l'inoculum .....	20
8.4. Inoculation .....	21
8.5. Incubation .....	21
8.6. Dispositif expérimental .....	21
8.7. Mesure et observation des résultats .....	21
8.8. Ré-isolément de <i>Psa</i> .....	23





<u>Troisième partie : résultats</u> .....	24
1. Etapes d'élaboration du test .....	24
1.1. Matériel végétal et tests biochimiques .....	24
1.2. Etablissement d'une courbe de densité optique en fonction de la concentration bactérienne d'une suspension de <i>Psa</i> .....	24
1.2.1. Première courbe .....	24
1.2.2. Deuxième courbe .....	25
1.2.3. Vérifications de points des courbes .....	25
1.3. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter .....	26
1.3.1. Contrôle de la concentration de la solution d'inoculation .....	26
1.3.2. Résultats mesurés et analyses statistiques .....	27
1.4. Choix d'une procédure de désinfection des rameaux .....	28
1.4.1. Identification des champignons présents sur les rameaux .....	28
1.4.2. Test de différentes substances aux propriétés désinfectantes .....	28
1.4.3. Organismes fongiques présents dans le laboratoire .....	28
2. Test de sensibilité variétale défini .....	28
2.1. Premier test .....	28
2.1.1. Contrôle de la concentration bactérienne de l'inoculum .....	28
2.1.2. Résultats des mesures et observations .....	29
2.1.3. Ré-isolements de <i>Psa</i> .....	29
2.1.4. Analyse statistique .....	29
2.2. Deuxième test .....	30
2.2.1. Contrôle de la concentration bactérienne de l'inoculum .....	30
2.2.2. Résultats des mesures et observations .....	30
2.2.3. Ré-isolements de <i>Psa</i> .....	30
2.2.4. Analyse statistique .....	31
<u>Quatrième partie : discussion</u> .....	32
1. Etapes d'élaboration du test .....	32
1.1. Courbe de densité optique en fonction de la concentration bactérienne de la suspension .....	32
1.2. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter .....	33
1.3. Choix d'une procédure de désinfection des rameaux .....	35
2. Test de sensibilité variétale défini .....	36
2.1. Choix méthodologiques .....	37
2.1.1. Matériel végétal et préparation des rameaux .....	37
2.1.2. Dispositif expérimental .....	37
2.1.3. Incubation : conditions et durée .....	38
2.1.4. Mesures et observations des résultats .....	38
2.2. Résultats des tests .....	39
2.2.1. Comparaison entre les deux tests de sensibilité variétale pratiqués .....	39
2.2.2. Interprétation des tests .....	39
<u>Conclusion</u> .....	41
<u>Bibliographie</u> .....	43
<u>Sitographie</u> .....	46



## Liste des abréviations

---

Anses : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire - alimentation, environnement et travail

BIK : Bureau Interprofessionnel du Kiwi

Casdar : Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole Rural

CFBP : Collection Française de Bactéries associées aux Plantes

Cfu : Colony forming unit

Ctifl : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

KVH : Kiwifruit Vine Health

MAF : Ministry of Agriculture and Forestry (Nouvelle-Zélande)

OEPP : Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA + S : Potato Dextrose Agar + Streptomycine

Psa : *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*

*Psa-LV* (less virulent) : forme peu virulente

*Psa-V* (virulent) : forme virulente

Pss : *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

pv. : pathovar

SPV : Service de la Protection des Végétaux

SRAL : Services Régionaux de l'Alimentation



# Tables des illustrations

---

## Figures

Figure 1 : Représentation de la diversité génétique du genre *Actinidia* par la photographie de fruits issus de plusieurs espèces et variétés. 1) *Actinidia rufa* ; 2) *A. melanandra* ; 3) *A. glaucophylla* ; 4) *A. chinensis* ; 5) *A. latifolia* ; 6) *A. indochinensis* ; 7) *A. chinensis* 'Hort16A' ; 8) *A. macrosperma* ; 9) *A. arguta* ; 10) *A. fulvicoma* ; 11) *A. deliciosa* 'Hayward' ; 12) *A. arguta* var. *purpurea* ; 13) *A. guilinensis* ; 14) *A. setosa* ; 15) *A. chrysantha* ; 16) *A. eriantha*.

Figure 2 : Nouvelle diversité commerciale des kiwis. a) *A. chinensis* var. *rufopulpa* 'Hongyang' ; b) *Actinidia arguta* (kiwai) ; c) *A. chinensis* 'Hort16A' ; d) *A. deliciosa* 'Hayward'.

Figure 3 : Coupes longitudinales de fleurs d'*Actinidia* sp. a) fleur femelle ; b) fleur mâle.

Figure 4 : Ventilation variétale des 374,03 hectares de vergers de kiwis français contaminés par *Psa* au 1er janvier 2012. Estimations basées sur des tests pratiqués en laboratoire et des dires d'experts.

Figure 5 : Taux de contamination des trois principaux groupes variétaux. Estimations basées sur des tests pratiqués en laboratoire et des dires d'experts.

Figure 6 : Observation au microscope optique avec un grossissement de 37,5 de la densité de trichomes présents sur la face inférieure de feuilles de différentes espèces et variétés d'*Actinidia*.

Figure 7 : Différentes portes d'entrée et voies de migration du *Psa* au sein de plants de kiwi. Les zones fluorescentes vertes représentent les espaces colonisés par la bactérie. Cette fluorescence, observable sous lumière ultra-violette, est due au couplage de la bactérie d'intérêt avec une protéine nommée GFPuv (Green Fluorescent Protein) dont l'excitation sous lumière ultra-violette provoque la fluorescence.

Figure 8 : Lésions nécrotiques sur rameau, accompagnées de la mort des jeunes pousses, résultant de l'infection par *Psa*.

Figure 9 : Lésions nécrotiques sur bois atteint par *Psa*.

Figure 10 : Exsudat rouge-orangé sur charpentièrè résultant de l'infection par *Psa*.

Figure 11 : Exsudat blanc laiteux sur charpentièrè résultant de l'infection par *Psa*.

Figure 12 : Dégâts liés au gel. Tronc présentant des craquelures et un suintement orangé.

Figure 13 : Symptômes d'une montée de sève. Rameaux présentant différentes typologies de suintements.

Figure 14 : Taches nécrotiques entourées d'un halo jaune visibles sur la face supérieure de la feuille et résultant de l'infection par *Psa*.

Figure 15 : Taches nécrotiques de couleur brun-noir, angulaires et irrégulières visibles sur la face inférieure de la feuille et résultant de l'infection par *Psa*.

Figure 16 : Enroulement des feuilles dû à l'infection par *Psa*.

Figure 17 : Au printemps, brunissement des pétales suite à l'infection de la plante par *Psa*.

Figure 18 : Dessèchement du rameau et des pédoncules des fruits entraînant le flétrissement de ces derniers suite à l'infection du plant par *Psa*.

Figure 19 : Dessèchement de plusieurs rameaux suite à l'infection du plant par *Psa*, entraînant le flétrissement des fruits portés par ces rameaux.

Figure 20 : Cycle infectieux et symptômes de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, organisme responsable du chancre bactérien du kiwi, tels qu'observés en France et Italie.

Figure 21 : Carte de repartition des parcelles contaminées par *Psa* en région Aquitaine en date du 25 juin 2012, établie suite au plan de surveillance national.

Figure 22 : Schéma de principe des dilutions de facteur deux de la solution-mère à pratiquer en vue de la réalisation des mesures spectrophotométriques.

Figure 23 : Schéma de principe des dilutions en série de la solution-mère au dixième et des étalements sur boîte de Petri à pratiquer ensuite pour permettre le dénombrement des colonies bactériennes.



Figure 24 : Boîte en plastique rigide (23 x 23 cm) dans laquelle sont disposées verticalement 4 barquettes en aluminium (22 x 5,5 cm), chacune tapissées d'une bande de papier-filtre humectée par 3 ml d'eau déminéralisée stérile.

Figure 25 : Des incisions de 2 mm de profondeur sont réalisées au scalpel, perpendiculairement au rameau. Chaque rameau est blessé en 3 points distants l'un de l'autre de 4 cm, dont la position sur le rameau est repérée à l'aide d'une règle cartonnée.

Figure 26 : L'inoculation est réalisée par dépôt d'une goutte de 10 µl de solution bactérienne sur chacune des blessures. Les gouttes ne s'écoulent pas et restent « posées » à la surface du rameau comme indiqué par les flèches rouges.

Figure 27 : Plans d'expérience des essais visant à définir le type de blessure à réaliser et la concentration d'inoculum à utiliser. Générés par le logiciel StatBox 7, ils comportent chacun 5 répétitions des 4 modalités testées de concentration de l'inoculum.

Figure 28 : Nécrose observée sur un rameau d'*Actinidia chinensis* 'Jintao' après 19 jours d'incubation et suppression de l'épiderme supérieur. La taille de la nécrose se définit comme la longueur maximale (en mm) de la zone où les tissus sont visiblement atteints. Cette zone est ici représentée par la flèche rouge.

Figure 29 : La nécrose est mesurée manuellement à l'aide d'un pied-à-coulisse électronique, après suppression de l'écorce au scalpel sur une longueur d'environ 1,5 cm de part et d'autre de chaque blessure réalisée.

Figure 30 : Lors du test désinfection à l'aide de différentes substances aux propriétés désinfectantes, les rameaux de la modalité hypochlorite de sodium sont trempés pendant 10 minutes dans un bain d'eau de javel à 4%, avant d'être rincés par 2 bains successifs d'eau déminéralisée stérile.

Figure 31 : Lors du test de désinfection à l'aide de différentes substances aux propriétés désinfectantes, les rameaux de chacune des modalités sont séchés à l'air libre sur papier absorbant stérilisé après leur trempage.

Figure 32 : Pour chaque espèce/variété 5 portions de rameaux d'environ 20 cm sont prélevées. Elles sont ensuite placées par espèces/variétés en sacs plastiques fermés et étiquetés, puis à nouveau placées en chambre froide.

Figure 33 : La durée d'incubation est de 19 jours. Pendant cette période, les boîtes sont empilées et placées à l'obscurité en chambre climatique à 22°C.

Figure 34 : Photographies de rameaux observés à la loupe binoculaire (x 2,5), 20 jours après inoculation et 24 heures après suppression de l'écorce, montrant différentes intensités de suintement et la note qui y correspond.

Figure 35 : Observation de la fluorescence sous lumière ultra-violette de colonies bactériennes cultivées sur milieu King B gélosé. A gauche, des colonies de *Psa* ; à droite, des colonies de *Pss*.

Figure 36 : Tests oxydase effectués sur les colonies R3N (1) (2), R4N (1) (2) (3) et *Psa*. La coloration bleue de la colonie en 10 à 30 secondes indique une réaction positive.

Figure 37 : Tests esculine effectués sur les colonies R4N (1) (2) (3), avec sur la ligne du bas les témoins. A gauche, *Pss* (témoin positif) et à droite, *Psa* (témoin négatif).

Figure 38 : Tests gélatine. Après une période de développement de 48 heures à 22°C les tubes sont placés environ 10 minutes dans la glace pour assurer la solidification du milieu avant lecture des résultats. A gauche, *Psa*, avec absence de liquéfaction de la gélatine. A droite, *Pss* avec liquéfaction de la gélatine correspondant à une réaction positive.

Figure 39 : En vert, la première courbe de densité optique à 600 nm en fonction de la concentration bactérienne en cfu/ml d'une suspension de *Psa*. En noir, sa droite de régression linéaire.

Figure 40 : En bleu, la seconde courbe de densité optique à 600 nm en fonction de la concentration bactérienne en cfu/ml d'une suspension de *Psa*. En noir, sa droite de régression linéaire.

Figure 41 : Graphique présentant les moyennes des mesures des nécroses et les écarts-types obtenus suite à l'inoculation des rameaux soit avec de l'eau déminéralisée stérile, soit avec une suspension bactérienne de *Psa* de  $10^5$ ,  $10^7$  ou  $10^9$  cfu/ml, lorsque qu'on réalise une piqûre de l'écorce à l'aiguille avant inoculation.





Figure 42 : Graphique présentant les moyennes des mesures des nécroses et les écarts-types obtenus suite à l'inoculation des rameaux soit avec de l'eau déminéralisée stérile, soit avec une suspension bactérienne de *Psa* de  $10^5$ ,  $10^7$  ou  $10^9$  cfu/ml, lorsque qu'on pratique une incision de l'écorce au scalpel avant inoculation.

Figure 43 : Photographie légendée du milieu de culture correspondant au prélèvement d'air effectué en zone 3 du laboratoire après 48 heures.

Figure 44 : Graphique présentant l'ensemble des espèces/variétés utilisées dans le premier test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*. Chaque espèce/variété est classée dans l'ordre décroissant de la valeur de son indice de sensibilité variétale moyen. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen. Les lettres et couleurs identifient les groupes ayant une moyenne homogène (test de Newman Keuls à 5%).

Figure 45 : Graphique présentant l'ensemble des espèces/variétés utilisées dans le second test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*. Chaque espèce/variété est classée dans l'ordre décroissant de la valeur de son indice de sensibilité variétale moyen. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen. Les lettres et couleurs identifient les groupes ayant une moyenne homogène (test de Newman Keuls à 5%).

Figure 46 : Coupes transversales de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' infectés par *Psa*. a) jeune rameau fortement infecté, présentant des collapses cellulaires et une colonisation des cellules du collenchyme et du parenchyme. Les vaisseaux ligneux montrent quelques collapses, mais pas de colonisation bactérienne. b) rameau moyennement infecté présentant une forte colonisation bactérienne des cellules du collenchyme et du parenchyme, mais avec seulement quelques destruction de cellules parenchymateuses au niveau des faisceaux libéro-ligneux. OC : Outer Cortex (tissus de soutien) ; F : Fibre (sclérenchyme) ; IC : Inner Cortex (faisceaux libéro-ligneux) ; X : Xylem (xylème).

Figure 47 : Observation à un fort grossissement de coupes transversales de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' infectés par *Psa*. a) Les bactéries sont uniquement présentes dans les méats intercellulaires (flèche noire) de cellules du parenchyme. b) Les bactéries sont présentes à l'intérieur de cellules du parenchyme dont les parois sont endommagées (flèche noire).



## Tableaux

Tableau 1 : produits et dosages employés pour la réalisation des milieux de culture, King B liquide, PDA+S, esculine, gélatine, King B gélosé et levane-sucrose.

Tableau 2 : Liste du matériel végétal utilisé, présenté sous la forme genre, espèce, variété.

Tableau 3 : Tableau de correspondance entre la taille moyenne des nécroses d'un même rameau et la valeur de l'indice à y attribuer.

Tableau 4 : Tableau de correspondance entre l'intensité moyenne de suintement d'un même rameau et la valeur de l'indice à y attribuer.

Tableau 5 : résultats obtenus aux tests biochimiques (fluorescence sur milieu King B gélosé, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine) pratiqués sur l'ensemble des colonies isolées à partir des 7 échantillons prélevés ainsi que sur les témoins *Psa* et *Pss*.

Tableau 6 : Densités optiques mesurées à 600 nm pour la solution mère et des dilutions de facteur 2. Pour chaque solution sa concentration bactérienne est ensuite calculée en fonction du dénombrement effectuée sur boîte de Petri.

Tableau 7 : Densités optiques mesurées à 600 nm pour la solution mère et des dilutions de facteur 2 ou de facteur 10. Pour chaque solution sa concentration bactérienne est ensuite calculée en fonction du dénombrement effectuée sur boîte de Petri.

Tableau 8 : nombre moyen de colonies dénombré suite aux étalements des différentes dilutions des suspensions bactériennes ayant servi aux premières manipulations de vérification de la seconde courbe.

Tableau 9 : nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions des suspensions bactériennes ayant servi aux secondes manipulations de vérification de la seconde courbe.

Tableau 10 : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur effectuée avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après piqûre de l'écorce à l'aiguille.

Tableau 11 : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur effectuée avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après incision de l'écorce au scalpel.

Tableau 12 : Données fournies par un test de Newman Keuls à 5% effectué avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après incision de l'écorce au scalpel.

Tableau 13 : nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions de la suspension bactérienne ayant servi à l'inoculation lors du premier test.

Tableau 14 : Tableau regroupant les résultats attendus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, levane-sucrose, esculine et gélatine, pour des colonies de *Psa*, *Pss*, *P. viridiflava* et *P. fluorescens*.

Tableau 15 : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, levane-sucrose, esculine et gélatine, menés sur les 14 colonies isolées des 8 prélèvements de suintement sur rameau réalisés lors du premier test de sensibilité variétale.

Tableau 16 : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, effectuée avec les valeurs des indices généraux (note sur 100) attribués à chacun des rameaux lors du premier test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*.

Tableau 17 : nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions de la suspension bactérienne ayant servi à l'inoculation lors du second test.

Tableau 18 : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine, menés sur les 32 colonies isolées des 15 prélèvements de suintement sur rameau réalisés lors du second test de sensibilité variétale.

Tableau 19 : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine, menés sur les 34 colonies isolées des 14 prélèvements de tissus réalisés sur rameaux lors du second test de sensibilité variétale.

Tableau 20 : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, effectuée avec les valeurs des indices généraux (note sur 100) attribués à chacun des rameaux lors du second test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*.



# Introduction

---

Le kiwi, *Actinidia sp.*, est une culture fruitière apparue très récemment dans l'univers des fruits et légumes. Bien qu'existant depuis de très nombreuses années en Chine à l'état sauvage, ce n'est qu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle qu'il est domestiqué et sélectionné par les Néo-zélandais, auxquels il doit son nom commercial. Le kiwi fait une première apparition sur le territoire national et dans le reste de l'Europe méditerranéenne dès les années 1970, mais ce n'est qu'à la décennie suivante qu'il prend son véritable essor (Hennion, 2003).

Le kiwi se cultive dans des zones de climat tempéré et ce, aussi bien dans l'hémisphère Sud, que dans l'hémisphère Nord. Bien que le kiwi soit présent sur tous les continents, seulement une dizaine de pays en ont une production significative (Hennion, 2003 ; [1]).

La superficie mondiale de plantation de kiwis est estimée à 150 000 ha en 2010 (O'Rourke, 2007 ; [1]). La France en comptant 4 300, dont près de la moitié en Aquitaine (Fritsch, 2012). Le volume de la production mondiale en 2010 est d'environ 2 millions de tonnes, la France en représentant 3,5 %, soit 70 000 tonnes environ ([1]).

Pendant longtemps l'univers du kiwi est resté monovariétal. C'est l'*Actinidia deliciosa*, autrement nommé kiwi à chair verte, variété 'Hayward' qui, pendant 30 ans, a été seul sur le marché, facilitant ainsi le progrès technique et le lancement commercial (Hennion, 2010 b). Toutefois, sur le plan commercial, 'Hayward' doit faire face à un taux moyen de pénétration dans les ménages (Hennion, 2010 b). En conséquence, le développement de la consommation de kiwis passe aujourd'hui par l'extension de l'offre et de la gamme variétale susceptible de répondre aux attentes des consommateurs non satisfaits par 'Hayward' (Hennion, 2010 a).

Le genre *Actinidia* offre une diversité génétique de plus de 60 espèces encore présentes à l'état sauvage en Chine ; ces ressources génétiques permettent ainsi d'aider la création variétale. De la sorte, à la fin des années 90 de nouvelles variétés telles que l'*A. deliciosa* 'Summer 3373' et 'Summer 4605' (Summer Kiwi<sup>®</sup>) ou bien encore l'*A. chinensis* 'Hort16A' (Zespri Gold<sup>®</sup>) ont fait leur apparition dans les vergers. Ces variétés ont été retenues pour plusieurs de leurs caractéristiques, et notamment pour leur chair moins acide et plus sucrée que 'Hayward' (Hennion, 2003), un facteur déterminant pour la consommation.

Vigoureuse et peu sensible aux ravageurs, la variété 'Hayward' a cependant largement contribué à maintenir la production de kiwis dans une situation sanitaire particulièrement préservée, limitant ainsi le nombre de traitements phytosanitaires. Toutefois, dès le début de cette diversification, il est craint que l'introduction et le développement de nouvelles variétés remettre en cause cet équilibre en raison de leurs éventuelles sensibilités aux maladies, ou plus simplement, par l'introduction en zones de production de plants porteurs de maladies contagieuses (Montahut, 2010). Il est vrai que jusqu'alors globalement privilégiée, la culture du kiwi connaît aujourd'hui des problèmes sanitaires inédits qui font l'objet d'une grande attention.

La bactériose du kiwi, causée par *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa), a été identifiée au Japon en 1984 et affecte désormais les vergers de kiwis en Chine et en Corée. La présence de la bactérie a été enregistrée pour la première fois en Europe en 1994 dans des vergers Italiens d'*Actinidia deliciosa*, puis sur *Actinidia chinensis* en 2008 (Zespri group Limited, 2009). Ainsi, la bactériose du kiwi touche plusieurs variétés, mais les dommages sont particulièrement importants sur les nouvelles variétés à chair jaune ([2]), compromettant ainsi leur développement.

Jusqu'à récemment, l'impact de la bactériose a été relativement faible sur l'économie mondiale. Toutefois, la région du Latium, en Italie, a connu une grave épidémie en 2008 (Zespri group Limited, 2009). L'année suivante, la France et la Nouvelle-Zélande recensaient leurs premiers cas de bactériose du kiwi (Fritsch, 2012).



On assiste aujourd'hui à une propagation importante de cette bactérie au niveau mondial et à une importance croissante des dégâts. En effet, les dégâts occasionnés, notamment en Italie sur la variété *A. chinensis* 'Hort16A' où plus de 90% des vergers sont aujourd'hui contaminés ([3]), et la présence avérée de la bactérie dans l'ensemble des grands pays producteurs de kiwis, justifie la mobilisation en cours de la filière. S'informer et lutter contre ce « nouveau » *Pseudomonas*, encore relativement méconnue, est devenu une priorité pour les acteurs de la filière mondiale du kiwi.

Comme pour la plupart des bactérioses, les producteurs sont particulièrement démunis, car il n'existe aucune méthode permettant de lutter efficacement contre la diffusion de cette maladie et d'en prévenir les dommages. Pour cela, et en vue de la mise en œuvre d'une gestion intégrée et raisonnée de la santé des vergers, la connaissance de la sensibilité variétale des nouvelles sélections sera donc désormais un préalable à leur développement.

C'est dans ce contexte qu'intervient le Ctifl (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes). Pilote d'un projet collaboratif français visant à l'amélioration des moyens de lutte contre *Psa*, il prend en charge l'aspect sensibilité variétale du projet avec un volet « évaluation de l'efficacité des différentes stratégies de protection du verger ». La mise au point d'un test d'évaluation de la sensibilité variétale, fait ainsi partie intégrante du projet.

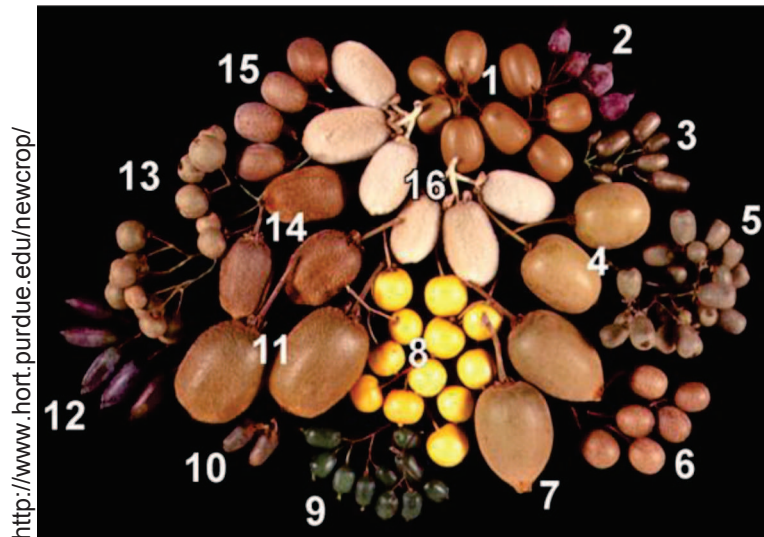
Devant le besoin d'agir vite dans l'élaboration et la validation d'un test de sensibilité variétale à *Psa*, il semble important de mettre en place un test qui soit relativement simple et rapide à mettre en œuvre. De plus, bien que *Psa* ne soit pas sur la liste des organismes de quarantaine, il n'en reste pas moins un organisme réglementé et pour des raisons évidentes l'inoculation en milieu extérieur n'est pas souhaitable. C'est ainsi que l'idée de créer un test réalisable sur matériel végétal détaché de la plante mère est née, permettant ainsi de travailler en laboratoire confiné et de s'affranchir de la préparation de pieds-mères pour la phase d'élaboration du test.

Pour débiter, un travail de recherche bibliographique est primordial afin de s'informer des pratiques courantes et du matériel végétal communément utilisé pour cette catégorie de test. Des recherches sur la physiologie du kiwi et l'épidémiologie de la maladie sont également nécessaires pour évaluer les possibilités de réussite d'un tel type de test.

Plusieurs tests de cette typologie sont d'ores et déjà utilisés au sein de la filière fruits et légumes, mais en France il s'agit d'une première sur le genre *Actinidia*. Ainsi, de nombreux éléments sont à fixer au cours des différents essais mis en place. Il s'agit donc d'un travail prospectif qui se doit d'avancer étape par étape.

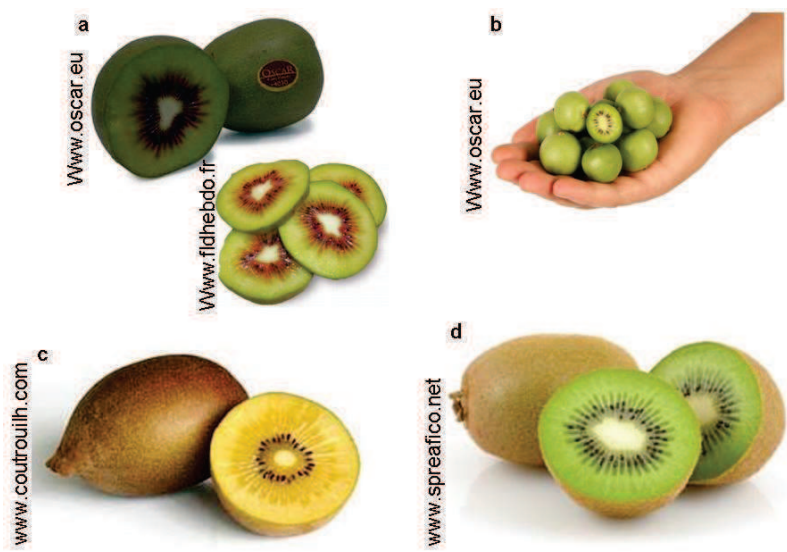
Ce rapport présente dans un premier temps une synthèse bibliographique permettant de faire le point sur les connaissances acquises sur la bactérie qu'est *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, ses caractéristiques et son impact sur la filière du kiwi. Après avoir développé la méthodologie utilisée lors des différents essais réalisés, nous analyserons les résultats obtenus, puis nous construirons une discussion pour justifier les choix qui nous ont amenés au protocole du test de sensibilité variétale d'*Actinidia* sp. tel qu'il est aujourd'hui. Enfin, nous conclurons ce travail par un rappel de ses échecs et réussites, puis nous aborderons ses limites pour enfin terminer par les perspectives de poursuite.





http://www.hort.purdue.edu/newcrop/

**Figure 1 :** Représentation de la diversité génétique du genre *Actinidia* par la photographie de fruits issus de plusieurs espèces et variétés. 1) *Actinidia rufa* ; 2) *A. melanandra* ; 3) *A. glaucophylla* ; 4) *A. chinensis* ; 5) *A. latifolia* ; 6) *A. indochinensis* ; 7) *A. chinensis* 'Hort16A' ; 8) *A. macrosperma* ; 9) *A. arguta* ; 10) *A. fulvicoma* ; 11) *A. deliciosa* 'Hayward' ; 12) *A. arguta* var. *purpurea* ; 13) *A. guilinisensis* ; 14) *A. setosa* ; 15) *A. chrysantha* ; 16) *A. eriantha*

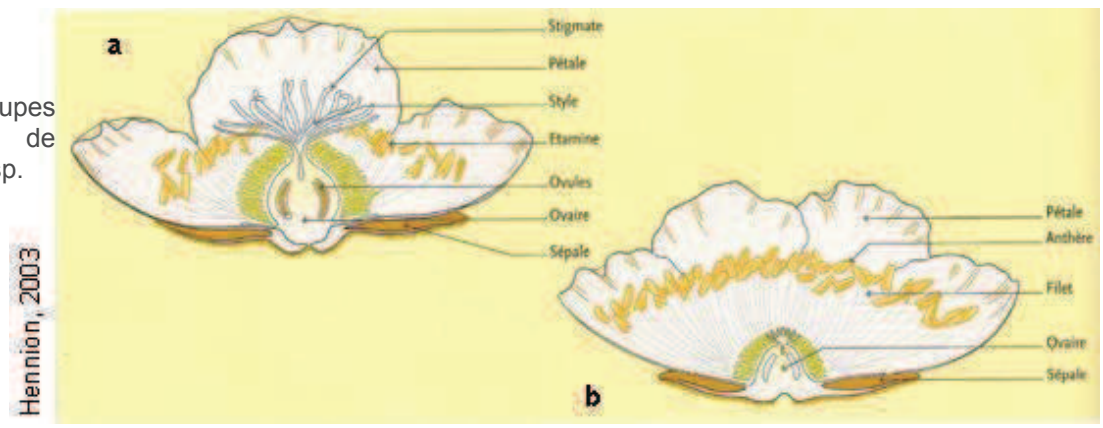


**Figure 2 :** Nouvelle diversité commerciale des kiwis.

- a) *A. chinensis* var. *rufopulpa* 'Hongyang'
- b) *Actinidia arguta* (kiwaï)
- c) *A. chinensis* 'Hort16A'
- d) *A. deliciosa* 'Hayward'

**Figure 3 :** Coupes longitudinales de fleurs d'*Actinidia* sp.

- a) fleur femelle
- b) fleur mâle



Hennion, 2003

# Première partie : étude bibliographique

---

## 1. Mieux connaître le kiwi

Issu du genre *Actinidia*, le kiwi est une liane à l'état sauvage. Se développant en buisson dense, il grimpe à la cime des arbres en s'enroulant autour de tous supports, pouvant ainsi étouffer la végétation de son habitat naturel (Hennion, 2003). La domestication de l'espèce a donc permis de structurer son développement, afin de le gérer dans le temps et l'espace, et également d'optimiser la production fruitière (Hennion, 2003).

Le kiwi tel qu'on le connaît aujourd'hui, est le fruit d'un développement commercial qui s'est construit autour d'une seule et unique variété : 'Hayward'. Depuis son lancement en 1970, le 'Hayward' s'est imposé comme le standard mondial du kiwi (Montahut, 2010), si bien que pour les consommateurs il n'existe qu'un seul et unique kiwi, celui de forme ovale, à la chair verte et à l'épiderme brun et duveteux.

Il faut pourtant savoir que le genre *Actinidia* est riche d'une très grande diversité génétique (fig. 1), où il n'existe pas moins de 60 espèces ([4]).

Depuis à peine 15 ans, la diversification de l'offre est en route. C'est ainsi que de nouvelles espèces et variétés ont fait leur apparition dans les vergers, soit parce qu'elles présentent un avantage au niveau du comportement agronomique (productivité, précocité, ...), soit au niveau de l'aspect du fruit (calibre, couleur de la chair, forme, ...) (Montahut, 2010). On trouve notamment l'espèce *deliciosa*, à laquelle appartient la variété 'Hayward' et l'espèce *chinensis*, mais également des espèces mineures telles que *arguta*. Ainsi, le consommateur découvre peu à peu une offre kiwi, plus large et plus diversifiée (fig. 2) avec par exemple des fruits de formes plus ou moins ovales, une pilosité quasiment inexistante, une chair jaune ou bien encore rouge, un fruit de la taille d'une groseille, une acidité moins prononcée ...

Toutes les espèces sont fonctionnellement dioïques. Ceci signifie que les fleurs mâles et fleurs femelles sont portées par des plants différents. En effet, les fleurs mâles (fig. 3 b) possèdent en général un ovaire sans ovules et des stigmates non fonctionnels, alors que les étamines sont nombreuses et recouvrent les pièces florales femelles. Pour les fleurs femelles (fig. 3 a), c'est le contraire, elles possèdent un ovaire volumineux surmonté de nombreux styles et stigmates, et les étamines présentes produisent un pollen stérile (Hennion, 2003).

Comme de nombreux fruits, le kiwi est un fruit climactérique. En effet, après la récolte il subit une crise respiratoire ou crise climactérique, qui se traduit par une augmentation importante du métabolisme respiratoire et par la synthèse d'éthylène. Tant que la crise climactérique n'est pas déclenchée, le kiwi évolue peu et peut donc se conserver. Par contre, une fois la crise débutée, il devient difficile de bloquer l'évolution du fruit (Hennion, 2003).

Le kiwi à la réputation d'être un fruit très riche en vitamine C, et c'est vrai. Un kiwi 'Hayward' en contient en moyenne 100 mg pour 100g de fruit frais. Toutefois, il faut savoir que des fruits d'autres espèces ou variétés de kiwi moins répandues, contiennent de 3 à 20 fois plus de vitamine C qu'un 'Hayward' (Hennion, 2003).

La consommation moyenne d'un français est d'1 kg/an (Hennion, 2003).

La production mondiale de kiwis se situe aux alentours des 2 millions de tonnes, dont environ 830 000 tonnes destinées à l'exportation (O'Rourke, 2007). Bien que la production de kiwis ait connu une croissance rapide dans de nombreux pays, l'exportation demeure concentrée seulement dans les trois grands pays traditionnels. En effet, l'Italie, la Nouvelle-Zélande et le Chili, sont les seuls pays bénéficiant d'un important excédant une fois leurs besoins pour le marché intérieur couverts. La Chine, quant à elle, peut toujours absorber la plupart de sa production sur le marché intérieur, même en dépit de la croissance rapide de sa production (O'Rourke, 2007).



La France, 5<sup>ème</sup> producteur mondial avec une production de 70 000 tonnes par an, assiste depuis 1988 à une diminution du nombre d'exploitation, mais à une faible diminution des superficies. En effet, entre 1988 et 2007, le nombre d'exploitation est passé de 2 339 à 1 197 (-51%), avec une diminution des surfaces de seulement 273 ha sur cette même période (Hennion, 2003 ; [5]).

La production française, soit environ 70 000 tonnes, est concentrée dans le bassin Sud-Ouest qui représente près de 2/3 de la production nationale ([5]).

## 2. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) : une menace pour le kiwi

Les maladies bactériennes des plantes ont probablement toujours existé. Dans la Grèce Antique, Théophraste décrivait déjà des symptômes sur des végétaux, que nous savons aujourd'hui être la cause d'infections bactériennes. L'intensification de la production et des échanges internationaux, la création de matériel végétal nouveau et sa propagation géographique ont contribué à accroître l'importance des maladies bactériennes des plantes (Gaignard & Luisetti, 1993). Aujourd'hui, de nombreuses bactéries sont recensées comme étant phytopathogènes, c'est-à-dire pouvant provoquer une maladie chez les végétaux. Comme nous allons le voir, le développement de certaines d'entre-elles dans les cultures peut avoir des répercussions économiques catastrophiques.

### 2.1. Une bactérie du genre *Pseudomonas*

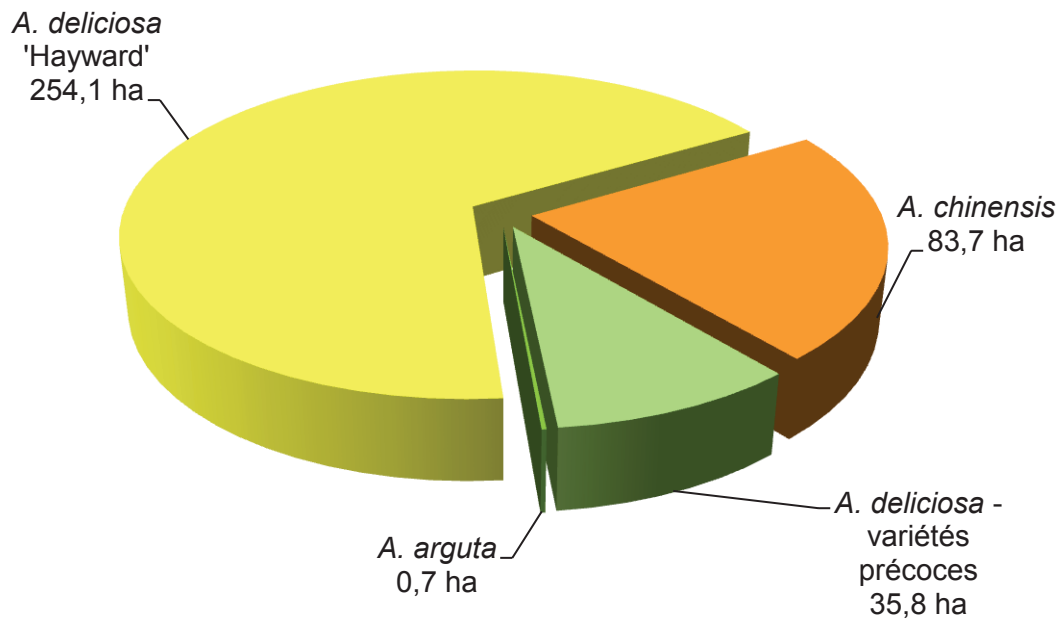
Le genre *Pseudomonas* constitue l'un des huit genres bactériens incluant des espèces phytopathogènes. Créé en 1894 par Migula, ce genre bactérien compte aujourd'hui de nombreuses espèces qui colonisent le sol, la rhizosphère, la phyllosphère, les tissus végétaux et animaux en décomposition, l'eau douce et l'eau de mer (Gaignard & Luisetti, 1993).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* appartiennent au règne des *Bacteria*, à la division des *Proteobacteria*, à la classe des *Gammaproteobacteria*, à l'ordre des *Pseudomonadales* et à la famille des *Pseudomonadaceae* (Scortichini *et al.*, 2012). Ce sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnet, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires (Smith *et al.*, 1988). Les bactéries à Gram négatif sont en général des pathogènes plus dangereux que les bactéries à Gram positif, tout d'abord parce qu'elles possèdent une paroi cellulaire dont certains composés sont souvent toxiques. Mais également parce que leur membrane externe les protège des défenses de leur hôte et entrave la pénétration des antibiotiques (Campbell & Reece, 2004).

Aujourd'hui, les *Pseudomonas* phytopathogènes sont classés en deux groupes. Le premier rassemble les bactéries qui n'accumulent pas le poly- $\beta$ -hydroxybutyrate et produisent un pigment fluorescent. C'est dans ce groupe, des *Pseudomonas* dits fluorescents que se trouve la majeure partie des espèces phytopathogènes, dont notamment celles pathogènes du kiwi, à savoir, *P. syringae* et *P. viridiflava*, ainsi que *P. fluorescens*, une espèce saprophyte, fréquente sur les plantes et dans leur environnement. Le second groupe, quant à lui, rassemble des bactéries phytopathogènes accumulant le poly- $\beta$ -hydroxybutyrate et ne produisant pas de pigment fluorescent (Smith *et al.*, 1988).

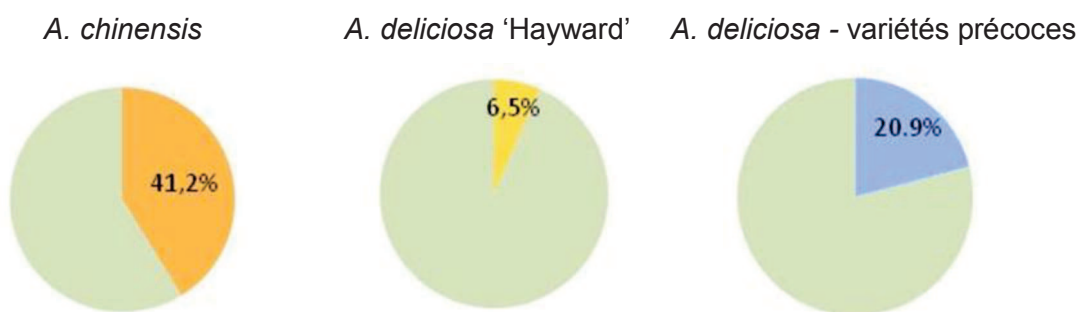
*Pseudomonas syringae* est l'une des 50 espèces bactériennes phytopathogènes. Décrit sur près de 400 espèces végétales, *Pseudomonas syringae*, est caractérisé par une grande variabilité génétique, physiologique et biologique qui s'exprime au travers des 52 pathovars qui la compose (Gaignard & Luisetti, 1993). Chaque pathovar regroupe les souches bactériennes ayant la ou les mêmes plantes hôtes et qui présentent un certain nombre de caractères identiques.

*P. syringae* est un organisme aérobic strict. Il doit donc obligatoirement utiliser de l'O<sub>2</sub> pour sa respiration cellulaire. De plus, en tant que bactérie chimio-organotrophe, *Pseudomonas* pénètre



Modifié de Fritsch, 2012

**Figure 4 :** Ventilation variétale des 374,03 hectares de vergers de kiwis français contaminés par *Psa* au 1er janvier 2012. Estimations basées sur des tests pratiqués en laboratoire et des dires d'experts.



Modifié de Fritsch, 2012

**Figure 5 :** Taux de contamination des trois principaux groupes variétaux. Estimations basées sur des tests pratiqués en laboratoire et des dires d'experts.

dans les plantes pour obtenir les composés organiques nécessaires à sa production d'énergie (Smith *et al.*, 1988).

*P. syringae* possède 3 propriétés principales, à savoir : un pouvoir pathogène, un pouvoir glaçogène et une aptitude à la vie épiphyte.

Le pouvoir pathogène de *Pseudomonas syringae* montre en règle générale une spécificité d'hôte liée au pathovar considéré. Le développement de l'infection est conditionné par l'existence de voies de pénétration naturelles ou artificielles offertes à l'inoculum. Les conditions climatiques pendant les phases initiales de l'infection et durant l'incubation apparaissent capables de moduler l'intensité de l'infection (Gaignard & Luisetti, 1993).

Le pouvoir glaçogène a été montré comme étant impliqué dans la gélivité des plantes au printemps et comme étant l'un des facteurs favorisant les premières phases de l'infection bactérienne (Gaignard & Luisetti, 1993). Cependant, cette propriété n'existe pas chez *Psa* (Rees-Gorge, 2010).

L'aptitude épiphyte de *Pseudomonas syringae* s'exprime par une capacité à coloniser la surface des organes aériens des plantes et à s'y multiplier de façon importante. Ces populations épiphytes constituent un réservoir d'inoculum et sont essentielles pour l'initiation de l'infection. Toutefois, la nature de l'interaction entre l'hôte et les bactéries épiphytes reste inconnue (Gaignard & Luisetti, 1993).

## 2.2. Les caractéristiques de *Psa*

L'émergence récente de la maladie et ainsi le manque de recul et de résultats issus des recherches, ne permettent malheureusement pas encore de connaître l'ensemble des caractéristiques de *Psa*. Toutefois, certaines d'entre elles ont pu être mises en évidence. Nous savons notamment quelles sont les voies de propagation les plus courantes, ainsi que les portes d'entrée privilégiées de la bactérie dans le végétal. Néanmoins, des zones d'ombre persistent encore concernant l'épidémiologie de la bactérie et la génétique des différentes populations de *Psa* identifiées.

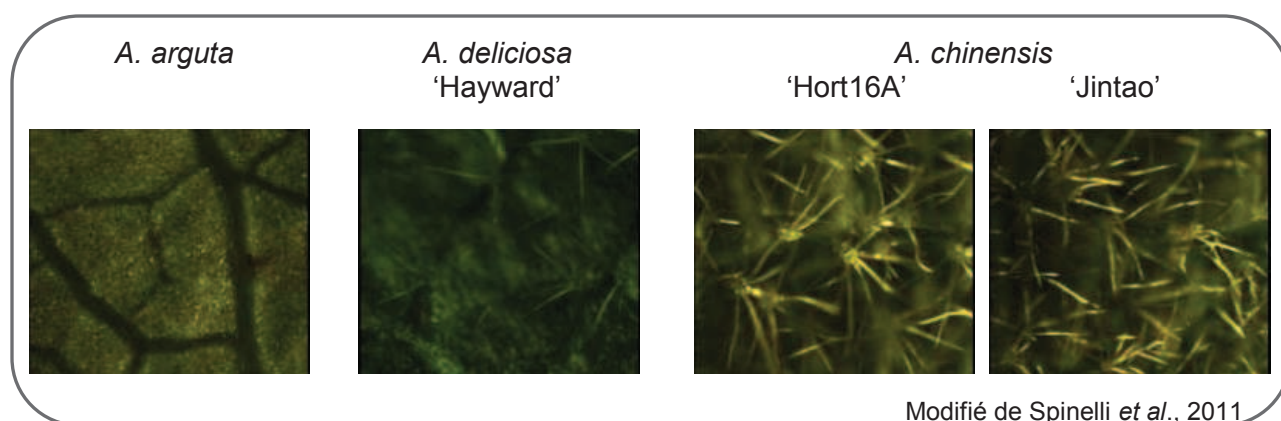
### 2.2.1. Des espèces et variétés dont la sensibilité diffère

Le pathovar *actinidiae* est uniquement pathogène du genre *Actinidia*, mais on retrouve *Psa* sur plusieurs espèces de ce genre. Ainsi, la bactérie a d'ores et déjà pu être identifiée dans différents pays sur *Actinidia deliciosa* et *A. chinensis* qui sont les espèces les plus cultivées, mais également sur *A. arguta* et *A. kolomikta* qui sont des espèces mineures (Marcelletti *et al.*, 2011).

Les observations faites en Italie sur les variétés cultivées montrent qu'il existe des différences en termes de sensibilité variétale. En effet, les dommages sont plus sévères sur les kiwis à chair jaune (*A. chinensis* 'Hort 16A' et 'Jintao') que sur la variété à chair verte la plus largement cultivée, l'*A. deliciosa* 'Hayward'. En France, comme en Italie, les variétés à chair jaune et à chair verte sont toutes deux atteintes (fig. 4), mais les dégâts observés sont plus sévères sur les variétés à chair jaune ([2]). En France, la contamination des variétés à chair jaune est de 2 à 6,4 fois plus importante que celle des kiwis à chair verte (fig. 5) (Fritsch, 2012).

De même, des observations menées en Nouvelle-Zélande et en Europe ont pu montrer que les plants mâles et femelles ne sont pas atteints dans des proportions égales. En effet, la contamination d'un verger commence bien souvent par les plants mâles avant de se propager aux plants femelles proches (Pentreath, 2012).

Les jeunes vergers (moins de 5 ans) semblent également plus sensibles à la maladie (Bru, 2011). Cela pourrait s'expliquer par un système racinaire peu développé, une mobilisation des ressources énergétiques pour la croissance au détriment de mécanismes de défense et aussi par la finesse de l'écorce des jeunes plants ([6]).



**Figure 6** : Observation au microscope optique avec un grossissement de 37,5 de la densité de trichomes présents sur la face inférieure de feuilles de différentes espèces et variétés d'*Actinidia*.

La sensibilité variétale à *Psa* est encore mal connue chez le kiwi, toutefois, les trichomes, (excroissances épidermiques), semblent avoir un rôle à jouer dans cette sensibilité. En effet, tout comme chez la tomate, il existerait une corrélation entre le nombre de trichomes par unité de surface foliaire et la sensibilité de la variété à *Psa* (fig. 6) ou au *P. syringae* pv. *tomato* dans le cas de la tomate (Bashan *et al.*, 1985 ; Spinelli *et al.*, 2011). Ces poils seraient le lieu de latence (vie épiphyte) de la bactérie et le site d'entrée privilégié (Bashan *et al.*, 1985). Ainsi, le nombre de trichomes présent à la surface de la feuille est un premier facteur mis en évidence permettant d'expliquer la variation de sensibilité variétale.

### 2.2.2. Les différentes populations et souches de *Psa*

Un des résultats les plus frappants récemment mis en évidence par des études génétiques approfondies est la présence de plusieurs populations bien différentes du pathovar *actinidiae* qui sont capables de contaminer les espèces d'*Actinidia* à des degrés divers. En effet, il existe actuellement au moins quatre populations de *Psa* génétiquement distincte répandues à travers le monde. Cela représente un cas remarquable d'évolution convergente de populations génétiquement différentes autour d'une plante hôte du même genre (Scortichini *et al.*, 2012). Présentes sur une ou plusieurs espèces d'*Actinidia*, il existe d'ores et déjà plus de 100 souches de *Psa* identifiées à travers le monde (Ferrante & Scortichini, 2010).

Une étude approfondie menée début 2012 par une équipe italienne a permis de mieux comprendre la structure des populations de *Psa* et de la sorte de proposer un classement des populations, ceci dans le but de pouvoir ensuite mieux adapter les méthodes de lutte.

- La première population comprend les souches associées aux épidémies initiales de bactériose du kiwi observées au Japon (1984-1989) et en Italie (1992). Les souches de cette population, isolées dans ces deux pays à partir d'*A. deliciosa* 'Hayward', sont presque identiques génétiquement, mais, fait intéressant, elles ont causé de graves pertes économiques au Japon, avec des dégâts sporadiques et mineurs en Italie pendant une période de près de 20 ans (Ferrante & Scortichini, 2010 ; Marcelletti *et al.*, 2011 ; Takikawa *et al.*, 1989 – in Scortichini *et al.*, 2012). Ce comportement remarquablement diversifié suggère clairement que les différents paramètres climatiques et/ou techniques agronomiques peuvent jouer un rôle fondamental dans la détermination de la virulence de l'agent pathogène bactérien même. Toutes les souches de cette population possèdent le groupe de gènes codant pour la phaséolotoxine (Sawada *et al.*, 1997, 1999 - in Scortichini *et al.*, 2012), une toxine responsable de chloroses.

- La deuxième population a uniquement été isolée en Corée du Sud et se caractérise par la présence d'un gène plasmidique supposé producteur de coronatine (toxine entraînant des chloroses) et par l'absence du groupe de gènes codant pour la production de phaséolotoxine (Han *et al.*, 2003 – in Scortichini *et al.*, 2012). En Corée du Sud, cette population a provoqué de graves pertes économiques chez l'*A. deliciosa* 'Hayward' à la fois dans le passé et le présent, ainsi que récemment chez l'*A. chinensis* 'Hort16A' (Koh *et al.*, 1994, 2010 – in Scortichini *et al.*, 2012).

Après quelques années de traitements phytosanitaires par pulvérisation, les souches de ces deux premières populations ont développé une résistance à la fois au cuivre et à la streptomycine, un antibiotique (Goto *et al.*, 1994 - in Scortichini *et al.*, 2012 ; Han *et al.*, 2003, 2004 - in Scortichini *et al.*, 2012 ; Nakajima *et al.*, 1995, 2002 – in Scortichini *et al.*, 2012).

- La troisième population est la forme pandémique, actuellement responsable de très graves pertes économiques à travers le monde. En Nouvelle-Zélande, elle a d'abord été nommée comme «Italienne», pour ensuite être renommée *Psa-V* (V=Virulent). Cette troisième population a pu être identifiée comme différente des deux populations précédentes (Ferrante & Scortichini, 2010 ; Chapman *et al.*, 2011 - in Scortichini *et al.*, 2012 ; Scortichini *et al.*, 2011 ; Gallelli *et al.*, 2011 - in Scortichini *et al.*, 2012 ; Marcelletti *et al.*, 2011). En outre, les souches appartenant à cette population ne possèdent pas les gènes codant pour la production de coronatine et de phaséolotoxine (Scortichini *et al.*, 2012).





Après sa première apparition en 2008 en Italie dans la région du Latium, cette population s'est ensuite étendue à toutes les principales zones de production Italiennes de kiwis. Différents tests et analyses ont permis de montrer que cette population est clonale et a apparemment totalement remplacé la population précédente (Marcelletti *et al.*, 2011). Cette population est également présente en Nouvelle-Zélande (Chapman *et al.*, 2011 – in Scortichini *et al.*, 2012), en France (Vanneste *et al.*, 2011 a), en Espagne (Abelleira *et al.*, 2011 – in Scortichini *et al.*, 2012) et au Portugal (Balestra *et al.*, 2010) où des souches aux caractéristiques moléculaires identiques ont été identifiées.

- La quatrième population est la forme nommée *Psa-LV* (LV=Less Virulent). Cette forme, ne causant apparemment que des symptômes foliaires, a seulement été détectée dans quelques vergers du Sud de la Nouvelle-Zélande. Une nouvelle fois, tests et analyses ont pu prouver que cette population est bien distinctes des trois précédentes (Chapman *et al.*, 2011 – in Scortichini *et al.*, 2012). Une souche de *Psa* apparemment semblable, caractérisée par une faible virulence, a également été signalée en Australie (Grant, 2011).

Les souches provenant de la précédente épidémie de chancre bactérien avaient une interaction plus spécifique avec l'*A. deliciosa*, alors que les données collectées sur le terrain en Italie ont montré que la population pandémique actuelle de *Psa* est pathogène pour les deux espèces, *A. chinensis* et *A. deliciosa*. Cette nouvelle population présente une très bonne croissance sur les feuilles d'*A. chinensis*, ce qui a probablement largement contribué à la dissémination très rapide de l'agent pathogène dans les zones de production de kiwis à chair jaune, agissant aussi comme un important réservoir d'inoculum pour l'*A. deliciosa* (Marcelletti *et al.*, 2011).

### 2.2.3. Mode de dispersion et de propagation

Le transfert du *Psa* entre les plants peut se faire par différents biais. Ainsi, les éléments naturels (air, eau, insectes/animaux) et artificiels (résultant de l'activité humaine) sont les acteurs de la dispersion et de la propagation de la bactérie.

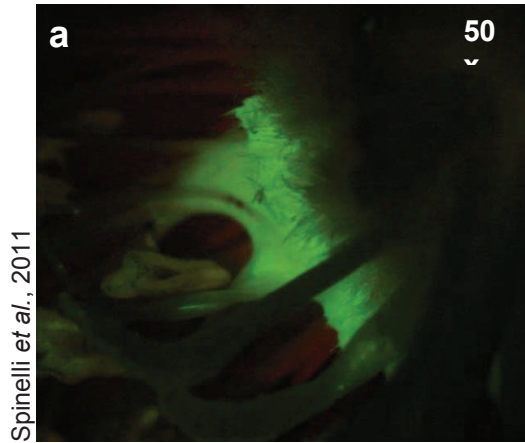
*Psa* ne « flotte » pas dans l'air, il lui faut donc un support, tel que l'eau ou seulement une humidité atmosphérique importante (Max, 2011). Une forte pluie accompagnée d'un fort vent permet le transport à longue distance (plusieurs centaines de mètres). En l'absence de vent, la pluie entrainera tout de même une propagation de *Psa* de feuille en feuille sous forme d'éclaboussures (Bru, 2011).

D'une façon moins importante la bactérie peut être disséminée d'une parcelle à une autre via les équipements et les outils. Ainsi, des mesures d'hygiène de base doivent être respectées lors de l'utilisation et du déplacement des outils et engins, notamment lors des opérations de récolte et de taille ([7]).

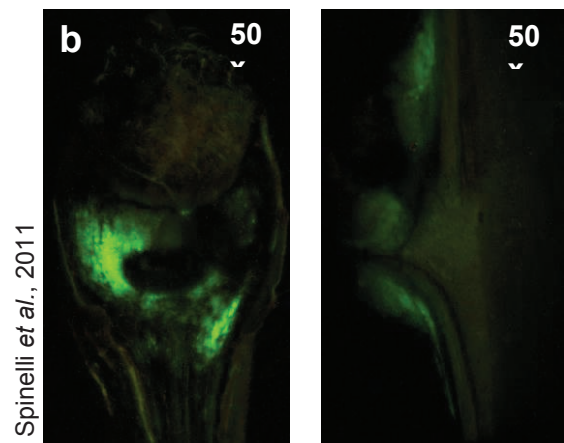
Le matériel végétal est généralement considéré comme étant le plus grand facteur de risque concernant la propagation à longue distance de nouveaux ravageurs et maladies. C'est d'ailleurs très probablement de cette façon que la bactériose est arrivée en France et que la forme *Psa-V* a pu atteindre la Nouvelle-Zélande (MAF, 2010).

La production d'un kiwi de qualité exige qu'un grand nombre de grains de pollen viables soit déposé sur le stigmate d'une fleur femelle car un kiwi de bon calibre commercial contient entre 1000 et 1400 graines, où chaque graine est le résultat d'une fécondation réussie par un seul grain de pollen (Vanneste *et al.*, 2011 b).

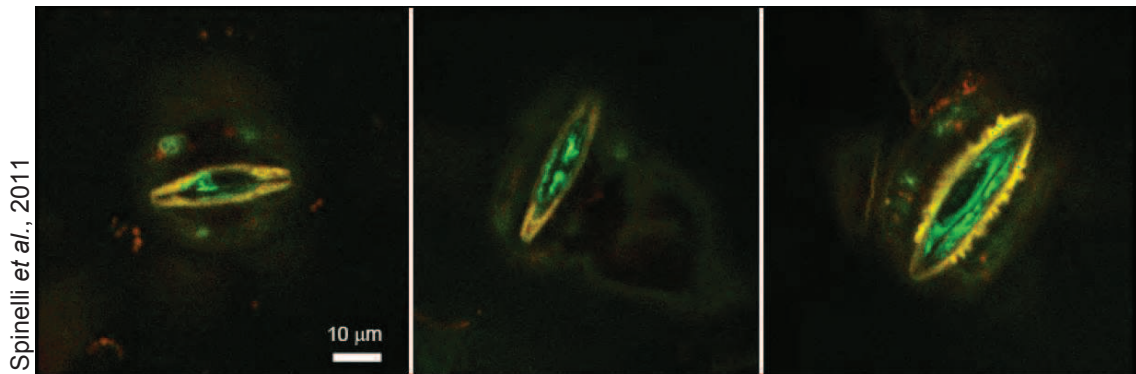
Bien qu'il n'ait pas encore été démontré comme étant vecteur de *Psa*, le pollen fait l'objet de beaucoup d'attention. A l'heure actuelle, seule la présence de *Psa* à la surface du stigmate, sur les anthères et au niveau des nectaires a pu être détectée (Spinelli *et al.*, 2011). Toutefois, la sensibilité supérieure des plants mâles par rapport aux plants femelles (Pentreath, 2012) et les pratiques courantes de pollinisation artificielle, font craindre que le pollen soit une voie de dissémination de masse du *Psa* et une source d'inoculum, comme c'est par exemple le cas



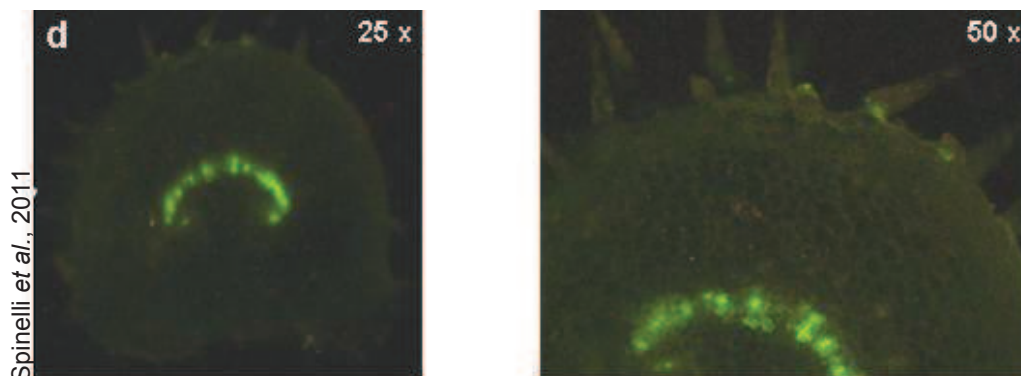
Observation au microscope électronique, sous lumière UV, des nectaires d'une fleur d'*A. deliciosa* 'Hayward' montrant la présence de *Psa*.



Observation au microscope électronique, sous lumière UV, de la zone d'abscission foliaire montrant la colonisation de la sève par *Psa* chez l'*A. deliciosa* 'Hayward'.



Observation au microscope électronique, sous lumière UV, de stomates infectés par *Psa* chez *A. deliciosa* 'Hayward'.



Coupe transversale d'un pétiole foliaire d'*A. deliciosa* 'Hayward' observé au microscope électronique sous lumière UV montrant la présence de *Psa* dans les vaisseaux du xylème.

**Figure 7** : Différentes portes d'entrée et voies de migration du *Psa* au sein de plants de kiwi. Les zones fluorescentes vertes représentent les espaces colonisés par la bactérie. Cette fluorescence, observable sous lumière ultra-violette, est due au couplage de la bactérie d'intérêt avec une protéine nommée GFPuv (Green Fluorescent Protein) dont l'excitation sous lumière ultra-violette provoque la fluorescence.

pour *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, l'agent causal du chancre bactérien de la noix (Ark, 1944 – in Vanneste *et al.*, 2011 b ; Garcin *et al.*, 2001 – in Vanneste *et al.*, 2011 b).

*Psa* est capable de survivre dans différents milieux et environnements favorisant ainsi sa dispersion.

En effet, différents essais conduits sur *Psa-V* ont mis en évidence sa capacité à survivre pendant plusieurs semaines sur des surfaces inorganiques et inanimées telles que le plastique. *Psa* peut former des biofilms protecteurs le rendant plus résistant aux substances désinfectantes. Il peut également maintenir une population viable en se nourrissant de bactéries mortes ou même entrer dans un état de vie ralentie ([8]).

*Psa* peut aussi survivre sur de longues périodes de temps sur des substrats organiques fournissant des éléments nutritifs, tels que le bois ou la litière de feuilles ([8]).

Diverses sources d'eau ont également été testées pour connaître la capacité du *Psa* à survivre dans ce milieu. Les populations de *Psa* ont diminué très rapidement dans l'eau courante, sans doute du fait du traitement de l'eau. Par contre, *Psa* a pu survivre dans l'eau de pluie pendant de très longues périodes (au moins 6 mois) en l'absence de stérilisation. Ceci suggère que l'eau de pluie a suffisamment d'éléments nutritifs pour assurer la survie de *Psa*. Toutefois, dans l'eau de pluie non stérilisée, la population de *Psa* a diminuée rapidement reflétant probablement la compétition avec d'autres micro-organismes adaptés à la survie dans cet environnement. *Psa* n'a pas pu être détecté dans les bassins et étangs testés appartenant à des parcelles hautement contaminées (Horner, 2011).

L'ensemble des connaissances naissantes abordées ci-dessus doivent aider les producteurs à évaluer les sources de risque au sein de leurs vergers, et de les aider dans le développement de nouvelles pratiques de gestion du verger visant à réduire les nouvelles infections ou réinfections et d'alimenter les futures recherches sur l'épidémiologie et le contrôle du *Psa*.

#### 2.2.4. Mode de contamination et migration dans la plante

*Psa* pénètre la plante par les fleurs (fig. 7 - a), les blessures mécaniques (abscision des feuilles (fig. 7 - b) et fleurs, vent) ou les blessures causées par le gel (Zespri group Limited, 2009), les insectes (Jones, 2012), les opérations culturales (Zespri group Limited, 2009) ; mais également par les ouvertures naturelles telles que les stomates (fig. 7 - c), les hydathodes, les lenticelles (Serizawa ; Ichikawa, 1993 - in Tyson *et al.*, 2012) ou bien les trichomes présent à la surface inférieure des feuilles (Spinelli *et al.*, 2011).

*Psa* semble être en mesure d'infecter et de voyager dans le système vasculaire des arbres (fig. 7 - d) (Zespri group Limited, 2009). Ainsi, l'agent pathogène peut se déplacer par voie systémique de la feuille aux rameaux par l'intermédiaire du pétiole de la feuille (Spinelli *et al.*, 2011) en empruntant les vaisseaux xylémiens (Spinelli *et al.*, 2011). Ceci représente une voie de migration dans la plante relativement peu commune pour un pathovar de *P. syringae*, bien que la migration systémique via le xylème ait aussi été décrite pour *P. syringae* pv. *syringae* chez le *Prunus salicina* (Roos ; Hattings, 1987 - in Scortichini *et al.*, 2012).

#### 2.2.5. Symptômes

##### **SUR BOIS**

*Psa* est connu pour pouvoir rester sous forme latente sur les feuilles et rameaux. Ce n'est qu'une fois les conditions optimales de développement réunies, que la pénétration et le développement de la bactérie auront lieu, entraînant le blocage des tissus vasculaires (Max, 2011).

L'Informatore Agrario 25/2010



**Figure 8** : Lésions nécrotiques sur rameau, accompagnées de la mort des jeunes pousses, résultant de l'infection par *Psa*.

L'Informatore Agrario 25/2010



**Figure 9** : Lésions nécrotiques sur bois atteint par *Psa*.

www.kvh.org.nz



**Figure 10** : Exsudat rouge-orangé sur charpentière résultant de l'infection par *Psa*.

www.kvh.org.nz



**Figure 11** : Exsudat blanc laiteux sur charpentière résultant de l'infection par *Psa*.

Photographie personnelle



**Figure 12** : Dégâts liés au gel. Tronc présentant des craquelures et un suintement orangé.

Photographie personnelle



Photographie personnelle



**Figure 13** : Symptômes d'une montée de sève. Rameaux présentant différentes typologies de suintements.

Une fois que la bactérie a pénétré dans le système vasculaire, cela peut provoquer le flétrissement des rameaux, puis leur mort (fig. 8) ([9]). Des lésions brunâtres (fig. 9) généralement visibles au niveau des tissus sous épidermiques à la fin de l'hiver (ZESPRI Group Limited, 2010) sont le signe du transport systémique de l'agent pathogène ([9]).

Des exsudats rouge-orangés (fig. 10) ou blancs (fig. 11) s'écoulant des rameaux peuvent apparaître, signifiant alors que le plant est infecté. Toutefois, ces symptômes ne sont pas uniques à *Psa* (Max, 2011) et peuvent notamment être confondus avec des dégâts liés au gel (fig. 12) ou encore avec des montées de sève (fig. 13).

Les exsudats rouge-orangés que l'on peut observer toute l'année, mais plus fréquemment de la fin de l'hiver au début du printemps, sont des écoulements de sève dus à un mécanisme de défense de la plante contre l'infection. Ces écoulements peuvent provenir de blessures ou d'ouvertures naturelles et être localisées aussi bien sur le tronc, que les branches ou les rameaux (Mazzaglia *et al.*, 2010). Ces symptômes sont facilement observables et s'accompagnent souvent de la formation d'un chancre (Balestra *et al.*, 2009).

A la même période des exsudations blanches peuvent apparaître. Elles forment soit des plages colorées (blanches et jaunes), soit un écoulement par gouttes (Mazzaglia *et al.*, 2010). Ces exsudations blanches correspondent à un stade avancé de l'infection et sont connues pour apparaître lorsque le développement des bactéries exerce une pression telle, qu'elles sortent des tissus en colonies pures (Mazzaglia *et al.*, 2010). Comme pour les suintements rouge-orangés, les blancs apparaissent sur le tronc, les charpentières, les rameaux latéraux, à la base des bourgeons et des pédoncules des fruits ([9]). Les suintements blancs sont considérés comme une forte source d'inoculum.

### **SUR FEUILLES**

Une fois qu'une bactérie infecte une feuille de kiwi, cela entraîne le déclenchement d'un système d'auto défense de la feuille visant à réduire la propagation de la bactérie à l'intérieur de la feuille. Ainsi, la zone atteinte se nécrose (Max, 2011).

Les bactéries produisent également des phytotoxines sous forme de métabolites secondaires. Ces derniers peuvent être des pigments, à l'origine de l'apparition d'un halo clair entourant la zone nécrosée (fig. 14) (Max, 2011). Un symptôme fréquent d'infection bactérienne.

Les symptômes foliaires suivant sont considérés comme typiques du *Psa* ([9]) :

- présence de taches de couleur brun-noir, angulaires et irrégulières qui suivent généralement les nervures de la feuille (fig. 15)
- apparition de nécroses au centre des feuilles, rarement en périphérie. Cette apparition étant plus fréquente sur les feuilles matures situées à l'extrémité des rameaux
- possible enroulement des marges des feuilles (fig. 16)
- les plus petites taches sont bien souvent entourées d'un halo jaune

Généralement visibles au printemps, les symptômes foliaires sont usuellement le premier signe extérieur de l'infection (Scortichini *et al.*, 2011).

Les taches sur feuilles sont en général peu préjudiciables pour l'arbre, mais elles sont la source principale d'inoculum de la saison suivante ([7]).

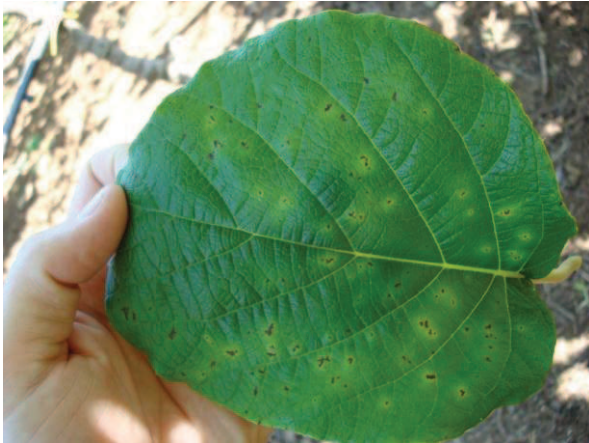
### **SUR FLEURS**

Les anthères prennent une couleur foncée, puis se nécrosent. La maladie peut ensuite s'étendre à l'ensemble de la fleur (fig. 17). Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques et restent difficiles à détecter (Zespri group Limited, 2009).

### **SUR FRUITS**

Sur fruit, on observe un flétrissement (fig. 18), qui s'accompagne quasi-inévitablement d'autres symptômes sur le végétal (fig. 19) (Zespri group Limited, 2009).

www.kvh.org.nz



**Figure 14** : Taches nécrotiques entourées d'un halo jaune visibles sur la face supérieure de la feuille et résultant de l'infection par *Psa*.

www.kvh.org.nz



**Figure 15** : Taches nécrotiques de couleur brun-noir, angulaires et irrégulières visibles sur la face inférieure de la feuille et résultant de l'infection par *Psa*

www.kvh.org.nz



**Figure 16** : Enroulement des feuilles dû à l'infection par *Psa*.

www.kvh.org.nz



**Figure 17** : Au printemps, brunissement des pétales suite à l'infection de la plante par *Psa*.

L'Informatore Agrario 38/2008



**Figure 18** : Dessèchement du rameau et des pédoncles des fruits entraînant le flétrissement de ces derniers suite à l'infection du plant par *Psa*.

www.kvh.org.nz



**Figure 19** : Dessèchement de plusieurs rameaux suite à l'infection du plant par *Psa*, entraînant le flétrissement des fruits portés par ces rameaux.

### 2.2.6. Identification et détection

Les symptômes peuvent être souvent confondus avec d'autres symptômes de *Pseudomonas* (*P. syringae* pv. *syringae* et *P. viridiflava*) ou bien même avec des phénomènes physiologiques (montée de sève). Ainsi, il est souvent nécessaire de coupler les observations faites sur le terrain avec des tests de laboratoire pour affirmer la présence de *Psa* au sein d'un verger.

Deux techniques sont utilisées pour mettre en évidence la présence de *Psa* :

- Les tests biochimiques : ils constituent une approche classique pour l'identification des bactéries et sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces et sous-espèces de bactéries phytopathogènes. Ces tests permettent notamment de connaître des caractéristiques du métabolisme des bactéries isolées et d'ainsi pouvoir les discriminer en croisant les résultats obtenus aux différents tests.

- La PCR (Polymerase Chain Reaction), est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments (annexe I). Cette technique présente l'avantage de pouvoir permettre l'identification des souches et non seulement de l'espèce et du pathovar auxquels l'agent pathogène appartient. En France, seul le laboratoire de la santé des végétaux de l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), basé à Angers, est à même de pratiquer ce test et d'identifier l'agent pathogène qu'est *Psa* par des techniques moléculaires.

### 2.2.7. Epidémiologie

*Psa* peut coloniser ses plantes hôtes tout au long de l'année (fig. 20).

Au printemps, des températures comprises entre 12 et 18°C accompagnées de conditions climatiques humides, peuvent grandement favoriser la multiplication de la bactérie, lui permettant ainsi de se déplacer par voie systémique des feuilles aux jeunes pousses.

Pendant l'été, des températures très élevées peuvent réduire la multiplication et la dispersion de la bactérie (Scortichini *et al.*, 2012).

Comme nous l'avons déjà vu, certaines techniques agronomiques, ainsi que le gel, le vent et la pluie, peuvent également contribuer à favoriser sa dissémination (Scortichini *et al.*, 2012).

## 3. La situation mondiale vis-à-vis de la présence de *Psa*

### 3.1. Le continent Asiatique, premier touché

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* a été décrit pour la première fois au Japon en 1984 dans la préfecture du Shizua (Serizawa *et al.*, 1989 – in Rees-Gorge, 2010) où il continu de contaminer environ 5% des plants par an ([10]). Dans le même temps, la bactériose a été décrite en Chine dans la seule province du Hunan (Fang, 1990 – in Mazzaglia *et al.*, 2012), avant d'être disséminée dans les provinces du Sichuan, du Anhui, et du Shaanxi. C'est quelques années plus tard que *Psa* fût détecté en Corée du Sud (Koh & Lee, 1992 – in Rees-Gorge, 2010) où il a sévèrement impacté l'industrie du kiwi jusqu'à la fin des années 90 ([10]).

### 3.2. L'arrivée de *Psa* en Europe

*Psa* fût identifié en Europe pour la première fois en 1992 dans le Nord de l'Italie sur *Actinidia deliciosa* 'Hayward' causant des dégâts de faible importance pendant une quinzaine d'années (Scortichini, 1994 – in Rees-Gorge, 2010). Toutefois, c'est en 2008 que débute la grave épidémie de chancre bactérien qui touche actuellement l'Italie, en atteignant d'abord les plantations d'*Actinidia chinensis* 'Hort16A' (Balestra *et al.*, 2009), avant d'atteindre les cultivars d'*A. deliciosa* (Mazzaglia *et al.*, 2012). Les pertes économiques engendrées par l'épidémie de *Psa* en Italie sont estimées à 2 millions d'euros en 2009 ([2]).





**Figure 20** : Cycle infectieux et symptômes de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, organisme responsable du chancre bactérien du kiwi, tels qu'observés en France et en Italie.

Dans la région du Latium, première région italienne productrice de kiwi, la situation est désastreuse. Fin 2008, plus de 50%, soit 350 ha d'*A. chinensis* 'Hort16A' avaient déjà dû être arrachés. En mars 2011, on estimait que pas moins de 95% des plants de 'Hort16A' présents dans cette région étaient infectés par *Psa*, si bien que plusieurs hectares continuent d'être arrachés régulièrement ([3]) ne laissant seulement en place que 28 ha de 'Hort16A' en production pour 2012 ([11]). L'arrachage de ces nouvelles plantations représente un coût énorme pour les producteurs au regard de l'investissement important occasionné par l'implantation d'un verger. En effet, en 2010, le coût moyen d'implantation d'un verger d'*Actinidia chinensis* 'Hort16A' était estimé à 27 000 €/hectare (Simonin, 2010).

Les 7 400 ha d'autres variétés (majoritairement 'Hayward') présentent pour 50% d'entre eux des symptômes d'infection ([11]).

Alors que l'Italie est le premier producteur mondial de kiwis, quasiment 416 000 tonnes en 2012 ([1]), l'impact de la maladie met en réel danger la production italienne qui devrait être considérablement réduite dans les 3 à 5 prochaines années ([3]), notamment au niveau des parcelles où sont implantées les nouvelles variétés.

En France, c'est en juin 2010, que les premiers symptômes sont observés. De jeunes plants de kiwis cultivés dans les régions françaises du Rhône-Alpes (*Actinidia deliciosa* 'Summer') et d'Aquitaine (*A. chinensis* 'Jintao') ont montré de petites taches foliaires anguleuses et nécrotiques, associées à des chancres et parfois à la production d'exsudat rouge (Vanneste *et al.*, 2011 a).

C'est également en 2010 que la présence de la bactérie est détectée au Portugal. Le premier verger touché était une jeune plantation d'*A. deliciosa* 'Summer Kiwi' située dans le Nord du pays (Balestra *et al.*, 2010).

En Espagne, c'est un an plus tard, au cours du printemps, que la maladie a été observée dans des vergers de deux ans d'*A. deliciosa* 'Hayward' et d'*A. chinensis* 'Jintao' (Balestra *et al.*, 2011).

### 3.3.Plusieurs autres pays touchés

En Nouvelle-Zélande, des symptômes ressemblant à ceux causés par *Psa* ont d'abord été observés sur *Actinidia chinensis* en novembre 2010, dans la grande région productrice du Te Puke. Début décembre 2010, des symptômes similaires ont été observés sur les fleurs et les feuilles d'*A. deliciosa* 'Hayward' (Everett *et al.*, 2011).

La situation a très vite empirée. A la fin juin 2012, *Psa* a été identifié dans pas moins de 1 222 vergers. De la sorte, ce sont 46% des vergers qui sont atteints par la bactérie ([12]). Une situation très alarmante pour les Néo-Zélandais quand on sait que le kiwi occupe en valeur, le premier rang des exportations de fruits et légumes du pays ([1]) et dégage annuellement 1 milliard de dollar néo-zélandais (Everett *et al.*, 2011).

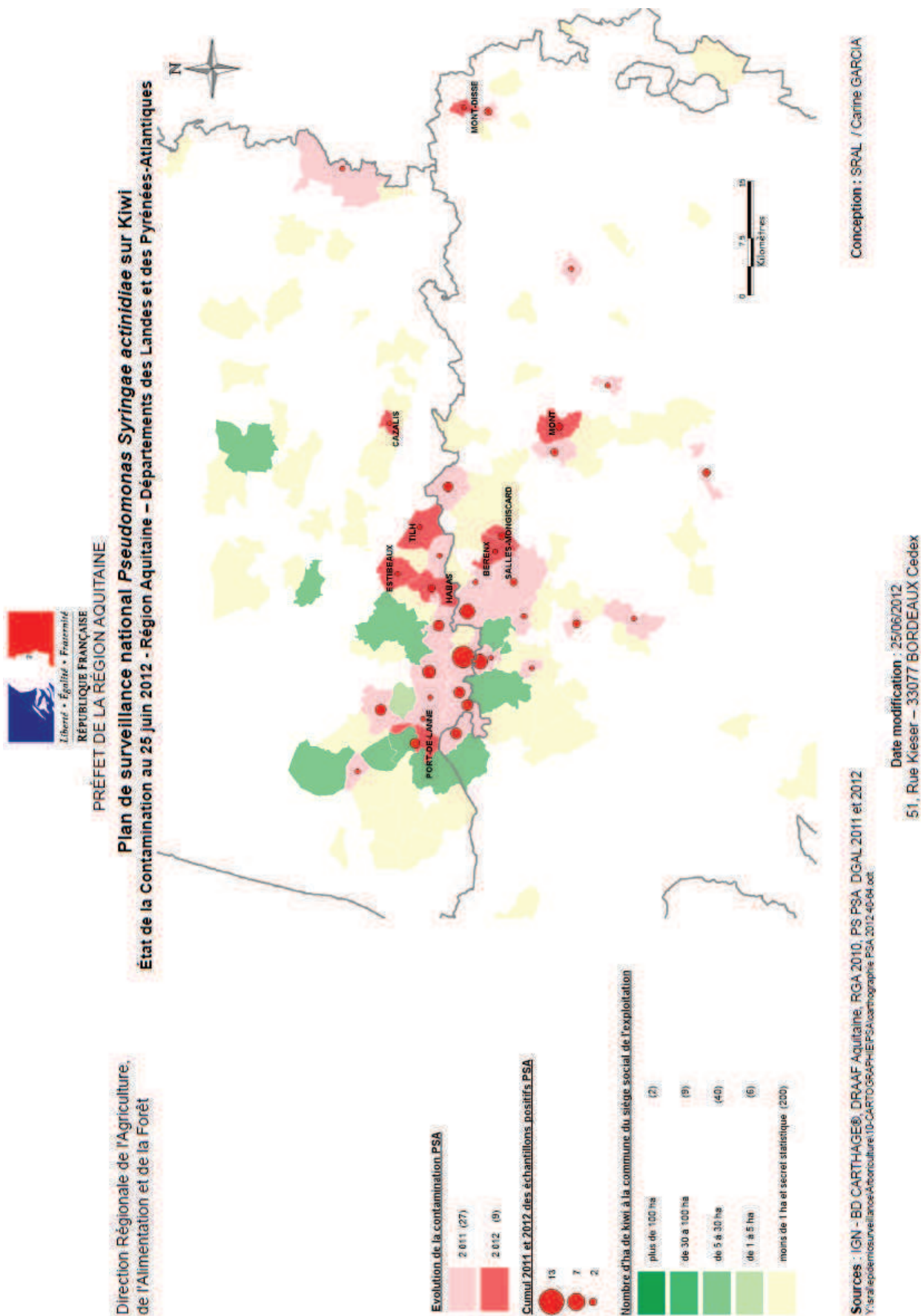
D'autres pays tels que la Turquie (Bastas & Karakaya, 2012) et le Chili ([13]) ont pu détecter la présence de la bactérie sur leur territoire respectivement en 2009 et 2012.

### 3.4.La situation française

L'étendue des zones infectées par la bactérie est relativement importante puisque la présence de *Psa* a été avérée dans l'ensemble des régions françaises productrices ([11]) et notamment en région Aquitaine (fig. 21).

En deux ans, 254 ha de 'Hayward' ont été déclarés positifs à *Psa*, soit à partir de tests de laboratoire, soit par des dires d'experts. Ainsi, en France, ce sont 6,5% de la superficie totale de 'Hayward' qui sont contaminés.

Des contaminations ont également été observées sur les variétés 'Summer Kiwi' (36 ha, soit environ 21% des surfaces françaises), 'Jintao' (30 ha, représentant ainsi la grande majorité des vergers nationaux) et 'Hort16A' (72 ha, soit environ la moitié des plantations) ([11]).



**Figure 21** : Carte de repartition des parcelles contaminées par *Psa* en région Aquitaine en date du 25 juin 2012, établie suite au plan de surveillance national.

## 4. Les actions mises en place : une mobilisation générale

### 4.1. Au niveau mondial et européen

Aujourd'hui, les principaux pays producteurs ont mis en place des moyens pour faire face à l'extension de la maladie, à commencer par la Nouvelle-Zélande où l'industrie du kiwi, portée par Zespri, leader sur le marché du kiwi, mène des actions focalisées sur un programme de recherche et de développement engagé pour limiter l'impact de la maladie.

Face à l'ampleur du problème, la filière néo-zélandaise a pris la décision de créer une organisation à but non lucratif et indépendante : le Kiwifruit Vine Health (KVH). Financée par la filière kiwi et par le gouvernement, ce sont déjà 20 millions d'euros qui ont été engagés dans la bataille contre *Psa* par cet organisme.

En complément, Zespri a redéfini les priorités de son programme de recherche et développement, afin de se concentrer sur la maladie. En conséquence, plus de 70 programmes de recherche sont engagés et certains ont déjà apporté des réponses dans les domaines de la détection, de la compréhension et du contrôle de la maladie (Montahut, 2011).

Au niveau italien, la situation est un peu différente. En effet, l'industrie italienne du kiwi est très fragmentée et la gestion des parcelles diffère d'un verger à l'autre et également d'une région à l'autre. La plupart des vergers sont placés dans de petites exploitations et la kiwiculture ne représente pas l'activité principale. Ainsi, les plants ne reçoivent pas la même attention que dans des exploitations en monoculture. En Italie, il n'existe pas de plan d'action pour lutter contre la propagation de la bactérie. De la sorte, de nombreux producteurs ne prennent aucune mesure de lutte, entraînant une progression rapide des symptômes secondaires et la propagation rapide de la maladie au sein d'un verger et à travers les exploitations voisines ([3]). Néanmoins, il existe plusieurs chercheurs basés au département des cultures fruitières de l'université de Bologne qui travaillent sur le sujet *Psa*, et notamment en collaboration avec des chercheurs néo-zélandais.

Depuis novembre 2009, *Psa* est inscrit sur la liste d'alerte de l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP), notamment suite aux dégâts observés dans les vergers italiens durant l'hiver 2007-2008 (Fritsch, 2012). Cette première inscription peut marquer une première étape vers l'inscription sur la liste de recommandation de classement de *Psa* en tant qu'organisme de quarantaine ([2]).

### 4.2. Au niveau français

L'apparition de premiers foyers de *Psa* dans les vergers français a déclenché un plan de surveillance nationale, initié et coordonné par le ministère français en charge de l'agriculture et les services régionaux de l'alimentation (SRAL) des régions concernées, à savoir : Aquitaine, Corse, Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées, Pays de la Loire, Poitou-Charentes, Rhône-Alpes (Fritsch, 2012).

Ce plan de surveillance lancé en 2011 consistait en une prospection visant à préciser l'état d'infestation du verger de kiwi français afin de prévoir les mesures appropriées. La version 2012 du plan de surveillance prolonge le plan de 2011, en y ajoutant des objectifs pour cette nouvelle campagne. Ainsi, le plan 2012 a pour objet de surveiller les établissements producteurs ou revendeurs de matériels d'*Actinidia* destiné à la plantation, et leur environnement, ainsi que de consolider la vision nationale des contaminations en verger, tout en y observant les premières évolutions épidémiologiques (Direction Générale de l'Alimentation, 2012).

*Psa* est inscrit depuis peu en annexe B de l'arrêté du 31 juillet 2000 modifié, établissant la liste des organismes nuisibles aux végétaux, produits végétaux et autres objets soumis à des mesures de lutte obligatoire sous certaines conditions (Fritsch, 2012).



La nécessité de coordonner l'ensemble des actions à mettre en place et de rassembler toutes les compétences scientifiques sur le sujet apparaît également sur le sol français comme une priorité. C'est dans cette optique qu'un comité scientifique de pilotage réunissant le BIK (Bureau Interprofessionnel du Kiwi), le Ctifl, l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), le SPV (Service de la Protection des Végétaux), les responsables professionnels et techniques a été mis en place (Montahut, 2011).

De plus, un dossier Casdar vient d'être déposé. Il s'agit en fait d'une participation au programme national de développement agricole proposé par le ministère de l'agriculture et financé par le Casdar (Compte d'Affectation Spéciale pour le Développement Agricole Rural). Les objectifs de ce projet intitulé « amélioration des moyens de lutte contre *Psa*, agent de la bactériose du kiwi : biologie du ravageur, étude épidémiologique, outils de diagnostic et moyens de lutte », sont multiples. Deux principaux objectifs sont définis, à savoir, d'une part évaluer l'efficacité d'une gamme d'options de lutte contre la maladie et d'autre part d'estimer la durabilité de ces différentes stratégies à travers une compréhension de leurs impacts sur la biologie et l'épidémiologie de la bactérie.

Ce tour d'horizon est particulièrement inquiétant car nous avons pu voir qu'en quelques années la bactérie a pu atteindre les plus grandes zones de production de kiwi de la planète et causer d'importants dégâts dans les vergers. En effet, le manque de connaissance sur ce « nouveau » pathogène et une détection tardive de la bactérie due à une épidémiologie spécifique et à des symptômes que l'on peut confondre avec d'autres, ont occasionné un important délai entre les premières infections et la mise en place de plans d'action.

Les évidentes différences de sensibilités observées sur les espèces et variétés d'*Actinidia* font penser qu'une solution au problème *Psa* se trouve dans le choix des nouvelles variétés cultivées. De la sorte, des recherches sont en cours pour évaluer la sensibilité à *Psa* des obtentions déjà existantes. En effet, la nécessité d'agir rapidement dans la recherche de variétés peu sensibles, oblige les acteurs de la filière à chercher parmi les variétés déjà créées ou bien parmi celles présentes dans les collections ou à l'état sauvage, car la mise en place d'un programme de création variétal est un processus long qui ne pourra sans doute pas apporter de solutions à la filière kiwi mondiale, avant 8 à 10 ans.

Ainsi, c'est dans le cadre du volet d'évaluation de l'efficacité des différentes stratégies de protection du verger du projet Casdar précédemment évoqué, et notamment dans une phase de recherche de variétés peu sensibles à *Psa* parmi celles existantes, que s'inscrit l'objectif de mon stage. Mon thème de travail étant le suivant :

**Contribution à la mise au point d'un test d'évaluation de la sensibilité variétale d'*Actinidia* sp. à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.**

**Tableau 1** : Produits et dosages employés pour la réalisation des milieux de culture, King B liquide, PDA+S, esculine, gélatine, King B gélosé et levane-sucrose.

<b>Milieu</b>	<b>Produits et dosages</b>
<b>King B liquide</b>	Glycérol : 12,6 g Digestion pancréatique de caséine : 10 g Peptone de protéose n°3 : 10 g Phosphate dipotassique : 1,5 g Sulfate de magnésium : 1,5 g
<b>PDA + S (Potato Dextrose Agar + Streptomycine)</b>	PDA Difco™ déshydraté : 39 g Agar : 5 g Sulfate de streptomycine : 100 mg
<b>Esculine</b>	Agar : 20 g Peptone : 10 g Citrate de fer ammoniacal : 1 g Esculine : 1 g
<b>Gélatine</b>	Difco™ Gélatine nutritive : 128 g
<b>King B gélosé</b>	Pseudomonas Agar F Dico™ : 38 g Glycérol : 10 g
<b>Levane-sucrose</b>	Sucrose : 50 g Agar : 20 g Chlorure de sodium : 5g Peptone : 5 g Extrait de levure : 2 g Céphalexine : 60 mg Nystatine : 40 mg

## Deuxième partie : matériel et méthode

---

L'objectif de l'ensemble des essais décrit ci-après et réalisés dans le cadre de mon stage, est de paramétrer une méthode pour inoculer, observer les symptômes et quantifier la sensibilité variétale à *Psa* sur rameaux détachés. Le tout devant permettre d'aboutir à un classement des espèces et variétés d'*Actinidia* en fonction de leur sensibilité à cet organisme bactérien.

### 1. Laboratoire confiné

Bien que *Psa* ne soit pas un organisme de quarantaine, sa manipulation requière de prendre certaines précautions. Ainsi, l'ensemble des manipulations faites avec la bactérie, qui bien que non classée comme parasite de quarantaine bénéficie du statut de bactérie réglementée, ont été réalisées dans les locaux confinés, accrédités par le Ministère de l'Agriculture, dont le centre Ctifl de Lanxade est équipé.

La partie laboratoire est soumise à des procédures strictes d'entrée et sortie du personnel, du matériel végétal et des organismes fongiques, bactériens et viroïdes.

Les manipulations avec le matériel végétal ont été réalisées en module NS2 (confinement standard) et celles de microbiologie en module NS3 (haut confinement biologique) car seul ce module est équipé d'une hotte à flux laminaire.

### 2. Souches bactériennes utilisées

*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* : pour l'ensemble des essais nous avons utilisé une seule souche de *Psa*, cette dernière appartenant à la population de *Psa-V*. La souche utilisée a été isolée dans la région de Trévise (Italie) en 2008 par Giorgio M. Balestra sur un plant d'*Actinidia chinensis* 'Jintao' présentant des chancres sur rameaux et des taches nécrotiques sur feuilles. Transmise à la collection française de bactéries phytopathogènes en 2010, elle y fût nommée souche CFBP 7285.

La souche achetée a été fournie par l'INRA d'Angers sous forme lyophilisée. Dès réception les bactéries ont été mises en culture sur milieu King B à 22°C pendant 48 heures, avant d'être congelées à -80°C dans une solution de glycérol à 80%.

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* : Une souche de *Pss* a été utilisée comme témoin positif lors de tests biochimiques. Il s'agit de CFBP 4702 ; souche type de l'espèce.

### 3. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture et milieux pour la réalisation de tests biochimiques ont été préparés et utilisés. Les doses et ingrédients destinés à la préparation de ces 6 milieux sont reportés ci-contre (tab. 1) et la méthodologie de préparation est en annexe (annexe II).

Milieux de culture utilisés :

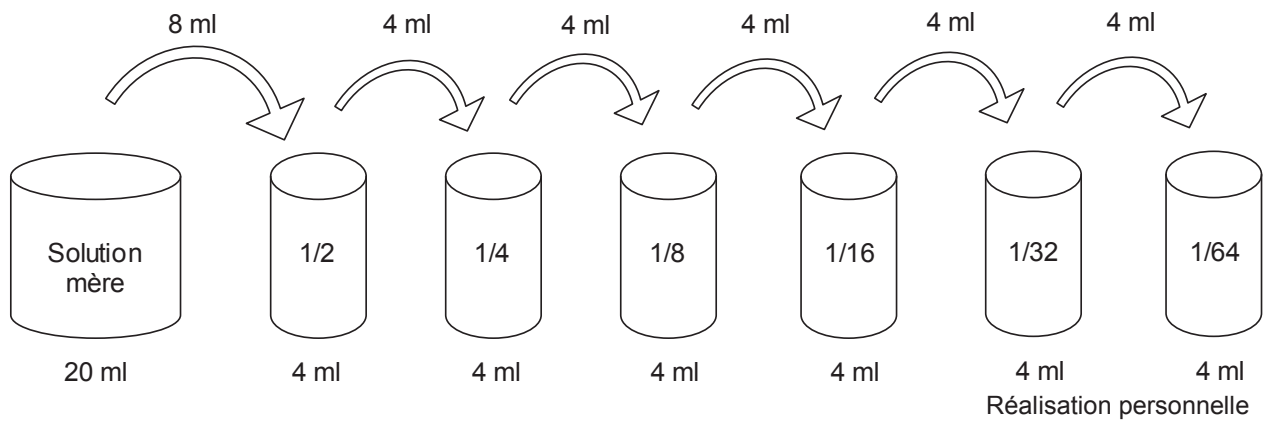
- King B liquide : milieu pour la culture des bactéries
- PDA+S : milieu pour la culture et le développement des champignons.

Pour ces deux milieux les conditions d'incubation sont spécifiées lors de chacune des manipulations.

Milieux utilisés pour les tests biochimiques :

- Esculine : mise en évidence d'une enzyme esculine hydrolase.
- Gélatine : dégradation d'une molécule complexe (liquéfaction de la gélatine)





**Figure 22** : schéma de principe des dilutions de facteur deux de la solution-mère à pratiquer en vue de la réalisation des mesures spectrophotométriques.

- King B gélosé : milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas* fluorescents permettant de rechercher la production de pyoverdine.
- Levane-sucrose : milieu spécifique permettant l'identification des *Pseudomonas* fluorescents, par la mise en évidence de la polymérisation du fructose en polyfructose.

L'incubation pour les tests biochimiques est de 48 heures à 22°C avant lecture des résultats.

Une solution prête à l'emploi est utilisée pour effectuer le test biochimique dit « test oxydase », afin de déterminer la présence de l'enzyme cytochrome c oxydase par oxydation de cette dernière par le phénylènediamine contenu dans la solution.

#### 4. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé pour l'élaboration du test est issu de la collection variétale du Ctifl. Les rameaux utilisés ont été collectés en semaine 9. Il s'agit de rameaux lignifiés de l'année, d'une longueur d'environ 60 cm. Les rameaux, soit une dizaine par espèce/variété, ont été liés entre eux par espèce/variété et doublement étiquetés pour éviter les mélanges, puis placés en sacs plastiques perforés. Un sac contenant plusieurs variétés.

L'ensemble des sacs plastiques a été placé en chambre froide à une température de 1°C et une humidité relative d'environ 85%.

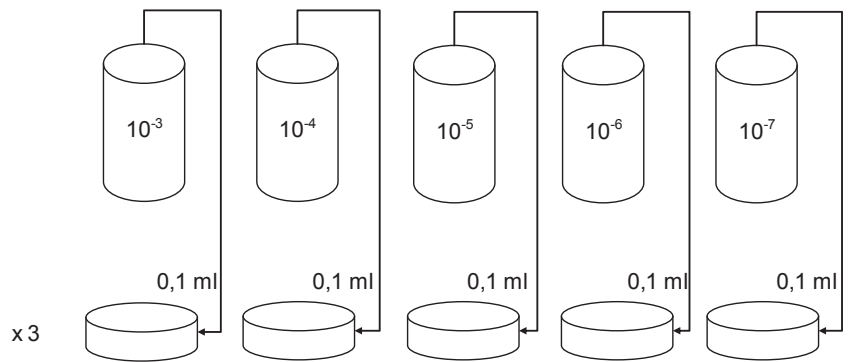
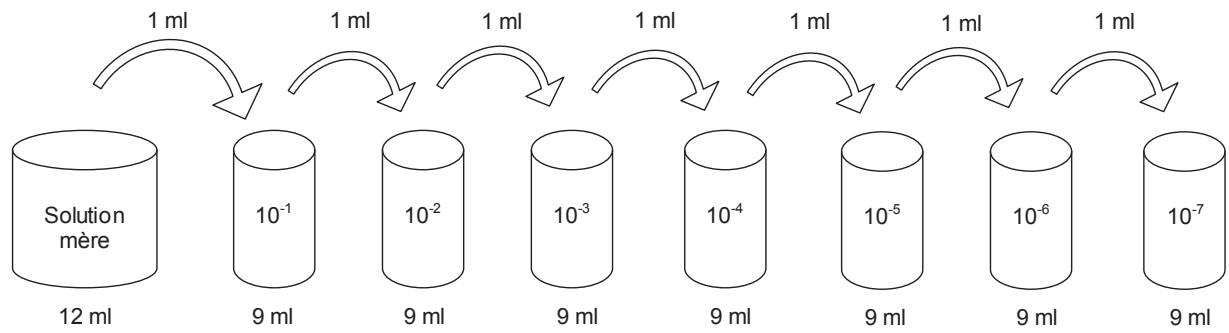
Afin de confirmer l'absence de *Psa* sur le matériel végétal, des suintements apparus au verger au niveau des troncs et rameaux, fin mars, dès la reprise de végétation, ont été collectés et analysés. Les exsudats ont été dilués dans l'eau déminéralisée stérile, puis 100 µl ont été étalés en boîte de Petri sur milieu King B gélosé. Après 24 heures de culture à 25°C, les colonies bactériennes ont été prélevées à l'aiguille, puis de nouveau mises en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile avant que 100 µl soient étalés sur milieu King B gélosé. Les colonies supposées pures ainsi obtenues ont été testées biochimiquement pour leur réponse à la fluorescence sur milieu King B gélosé, ainsi qu'aux tests dits oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine, dont la réalisation et les principes sont décrits en annexe (annexe II). Les souches CFBP 4702 (*P. syringae* pv. *syringae*) et CFBP 7285 (*P. syringae* pv. *actinidiae*), ont été utilisées respectivement comme témoin négatif et positif. Ces dernières ont auparavant été testées pour la correspondance de leur réponse à ces tests et l'adéquation avec les résultats attendus.

#### 5. Courbe de densité optique en fonction de la concentration

##### 5.1. Etablissement de la courbe

Dans un premier temps (première courbe), la solution-mère utilisée a été réalisée par dilution dans de l'eau déminéralisée stérile d'une culture fraîche (48 heures) de *Psa*, obtenue après une croissance à 22°C sur milieu King B gélosé. Dans un deuxième temps (deuxième courbe), cette méthodologie a été changée au profit d'une culture de la bactérie en milieu King B liquide. La bactérie est inoculée dans le milieu, lui-même placé sous agitation à 150 tr/minute et maintenu à la température ambiante du laboratoire (environ 20°C). Pour permettre les échanges gazeux, la fermeture des bouteilles est réalisée avec du parafilm. Après 48 heures de culture, la solution bactérienne est centrifugée à 4 000 tr/min pendant 10 minutes, afin de récupérer le culot qui est ensuite mis en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile, pour ainsi former la solution-mère.

On réalise ensuite des dilutions en série de facteur 2 de la solution-mère, jusqu'au 1/64, afin de procéder à des mesures de densité optique (fig. 22). Trois mesures sont effectuées pour chacune des solutions où chaque fois 2 ml de solution sont placées dans des cuves stériles. On détermine ainsi l'absorbance des différentes solutions à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BioMate™ 3). Le blanc est réalisé avec 2 ml d'eau déminéralisée stérile.



Réalisation personnelle

**Figure 23** : schéma de principe des dilutions en série de la solution-mère au dixième et des étalements sur boîte de Petri à pratiquer ensuite pour permettre le dénombrement des colonies bactériennes.

Une dilution en série au dixième de la solution-mère est ensuite réalisée de façon à obtenir des solutions diluées jusqu'à  $10^{-7}$  cfu/ml (fig. 23). Trois étalements de 100  $\mu$ l des solutions allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-7}$  sont réalisés sur milieu King B gélosé et maintenu à 22°C. La détermination de la concentration de la solution-mère est effectuée au bout de 48 heures suite à un dénombrement des colonies sur boîte de Petri. La densité optique des solutions à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  sont également mesurées.

Il est également important de noter qu'entre chaque manipulation les solutions sont placées dans la glace afin de limiter au maximum la croissance bactérienne entre les mesures de densité optique et les étalements sur boîte de Petri.

## 5.2. Vérifications de points des courbes

### 5.2.1. Premières manipulations

La mise en culture de l'inoculum et la méthodologie de préparation de la solution-mère sont les mêmes que celles définies ci-dessus.

On va ensuite préparer quatre solutions en se basant sur la deuxième courbe et son équation de droite.

- Solution A : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique la plus proche possible de 0,980 (soit  $2,408 \cdot 10^9$  cfu/ml) par dilutions aléatoires successives de 5 ml de solution-mère avec de l'eau déminéralisée stérile. La solution ainsi obtenue est ensuite diluée grâce à la relation  $C_i \times V_i = C_f \times V_f$  pour obtenir 10 ml d'une solution d'une concentration de  $10^9$  cfu/ml. On réalisera également une mesure spectrophotométrique de la solution finale ainsi obtenue.
- Solution B : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique la plus proche possible de 0,417 (soit  $10^9$  cfu/ml) par dilutions aléatoires successives de 5 ml de solution-mère avec de l'eau déminéralisée stérile. On réalise également une mesure spectrophotométrique de la solution obtenue supposée à  $10^8$  cfu/ml.
- Solution C : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique la plus proche possible de 0,134 (soit  $3 \cdot 10^8$  cfu/ml) par dilutions aléatoires successives de 5 ml de solution-mère avec de l'eau déminéralisée stérile. On réalise également une mesure spectrophotométrique de la solution obtenue supposée à  $3 \cdot 10^8$  cfu/ml.
- Solution D : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique de 0,136 (soit  $10^8$  cfu/ml) par dilutions de la solution C avec de l'eau déminéralisée stérile. On utilisera la relation  $C_i \times V_i = C_f \times V_f$ . On réalise également une mesure spectrophotométrique de la solution obtenue supposée à  $10^8$  cfu/ml.

Pour les solutions B, C et D on pratique des dilutions en série au dixième pour réaliser des étalements sur milieu King B gélosé en boîtes de Petri. On étalera ainsi 100  $\mu$ l des dilutions de  $10^4$  à  $10^2$  (2 répétitions). Les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. Les boîtes sont placées en chambre climatique 48 heures à 22°C avant dénombrement des colonies.

### 5.2.2. Deuxièmes manipulations

La mise en culture de l'inoculum et la méthodologie de préparation de la solution-mère sont les mêmes que celles définies précédemment.

On va ensuite préparer deux solutions en se basant sur la deuxième courbe modifiée et la nouvelle équation de droite obtenue.

Photographie personnelle



**Figure 24 :** Boîte en plastique rigide (23 x 23 cm) dans laquelle sont disposées verticalement 4 barquettes en aluminium (22 x 5,5 cm), chacune tapissées d'une bande de papier-filtre humectée par 3 ml d'eau déminéralisée stérile.

Photographie personnelle



**Figure 25 :** Des incisions de 2 mm de profondeur sont réalisées au scalpel, perpendiculairement au rameau. Chaque rameau est blessé en 3 points distants l'un de l'autre de 4 cm, dont la position sur le rameau est repérée à l'aide d'une réglette cartonnée.

Photographie personnelle



**Figure 26 :** L'inoculation est réalisée par dépôt d'une goutte de 10  $\mu$ l de solution bactérienne sur chacune des blessures. Les gouttes ne s'écoulent pas et restent « posées » à la surface du rameau comme indiqué par les flèches rouges.

- Solution a : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique la plus proche possible de 0,501 (soit  $10^9$  cfu/ml) par dilutions aléatoires successives de 5 ml de solution-mère avec de l'eau déminéralisée stérile.
- Solution b : On cherche à obtenir une solution-fille d'une densité optique la plus proche possible de 0,051 (soit  $10^8$  cfu/ml) par dilutions aléatoires successives de 5 ml de solution-mère avec de l'eau déminéralisée stérile.

Pour ces deux solutions on pratique ensuite des dilutions en série au dixième pour réaliser des étalements sur milieu King B gélosé en boîtes de Petri. On étalera ainsi 100  $\mu$ l des dilutions de  $10^4$  à  $10^{-3}$  (2 répétitions). Les manipulations sont réalisées sous hotte à flux laminaire. Les boîtes sont placées en chambre climatique 48 heures à 22°C avant dénombrement des colonies.

## 6. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter

### 6.1. Préparation du matériel végétal et de laboratoire

Les boîtes destinées au test sont en plastique rigide translucide et possèdent un couvercle. La dimension de ces boîtes est de 23x23 cm pour une hauteur de 2 cm.

Boîtes et couvercles sont lavés à l'eau savonneuse, puis 4 barquettes en aluminium (22 x 5,5 cm) tapissées d'une bande de papier-filtre sont disposées à l'intérieur (fig. 24). Chaque bande est individuellement humectée par 3 ml d'eau déminéralisée stérile avant d'y placer les rameaux.

Un ensemble de 40 portions de rameaux d'*Actinidia deliciosa* 'Hayward' de 20 cm ont été prélevées parmi les rameaux présents en chambre réfrigérée. Ces portions ont ensuite été désinfectées par immersion dans un bain d'éthanol à 70% pendant 1 minute, suivi de 3 rinçages successifs à l'eau déminéralisée stérile. Le séchage a lieu à l'air libre sur papier absorbant stérile.

Les rameaux sont ensuite retailés pour obtenir une longueur totale de 15 cm et chaque extrémité est trempée l'espace de quelques secondes dans de la cire chaude de paraffine sur environ 1,5 cm.

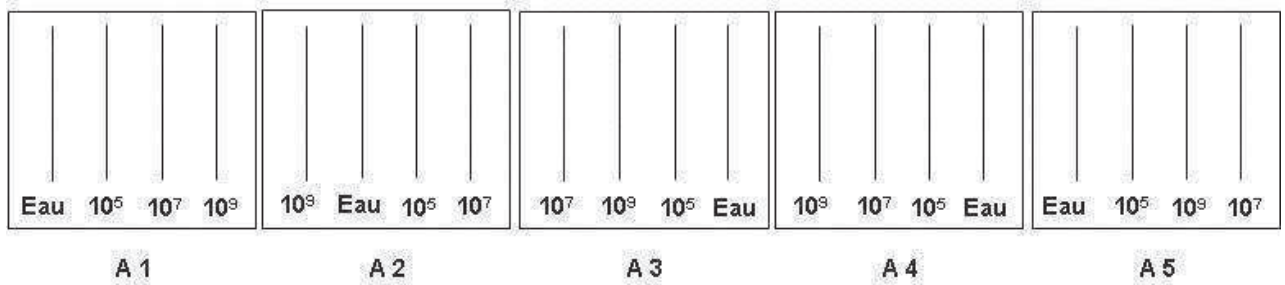
### 6.2. Préparation de l'inoculum

L'inoculum est obtenu par la mise en suspension d'une culture fraîche de *Psa* dans de l'eau déminéralisée stérile. Les paramètres de densité optique en fonction de la concentration précédemment établis sont utilisés pour pratiquer des inoculations avec trois solutions de concentrations différentes et définies à  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^9$  cfu/ml. Ainsi, on cherche l'obtention d'une solution d'une densité optique de 0,377 à 600 nm, correspondant à une concentration de  $10^9$  cfu/ml. Cette première solution-fille est ensuite diluée en série au dixième pour obtenir les solutions à  $10^5$  et  $10^7$  cfu/ml.

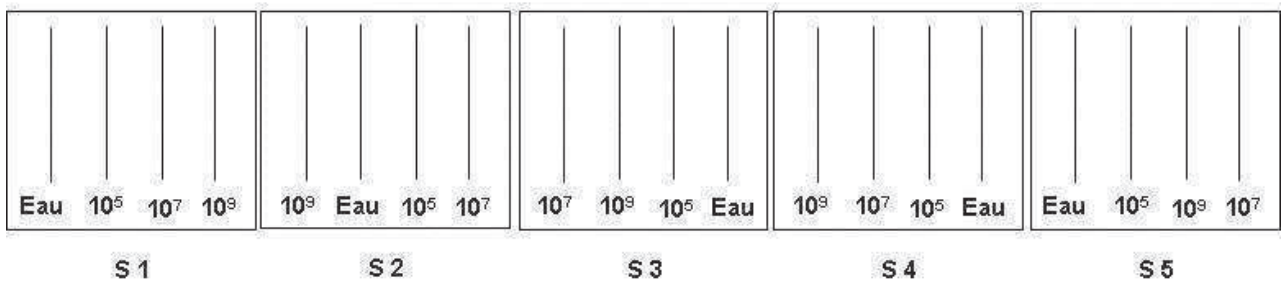
100  $\mu$ l des dilutions en série correspondant aux concentrations théoriques de  $10^8$  à  $10^2$  cfu/ml sont étalées sur boîte de Petri pour pratiquer un dénombrement des colonies après 48 heures à 22°C.

L'ensemble des solutions est conservé dans la glace pendant toute la durée des manipulations.

**Blessure : piqûre à l'aiguille**

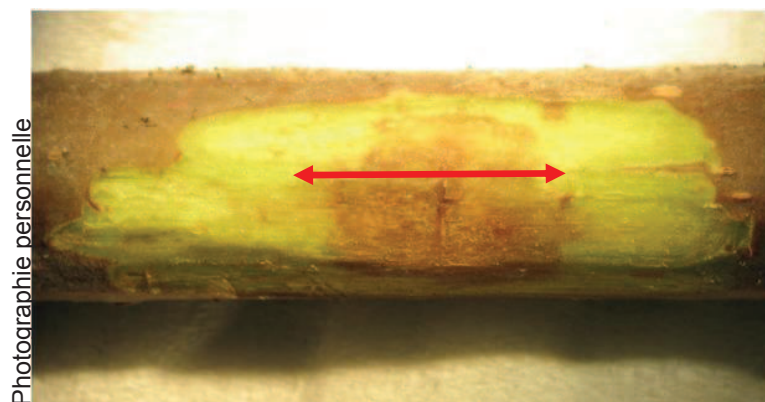


**Blessure : incision au scalpel**



Réalisation personnelle

**Figure 27 :** Plans d'expérience des essais visant à définir le type de blessure à réaliser et la concentration d'inoculum à utiliser. Générés par le logiciel StatBox 7, ils comportent chacun 5 répétitions des 4 modalités testées de concentration de l'inoculum.



**Figure 28 :** Nécrose observée sur un rameau d'*Actinidia chinensis* 'Jintao' après 19 jours d'incubation et suppression de l'épiderme supérieur. La taille de la nécrose se définit comme la longueur maximale (en mm) de la zone où les tissus sont visiblement atteints. Cette zone est ici représentée par la flèche rouge.

### 6.3. Inoculation et incubation

L'inoculation a été conduite de deux façons différentes, correspondant à deux types de blessures. Dans le premier cas, il s'agit d'une piqûre de 2 mm de profondeur réalisée à l'aide d'une aiguille stérile. Dans l'autre cas, d'une incision de 2 mm de profondeur réalisée au scalpel, perpendiculairement au rameau (fig. 25). Le matériel, scalpel ou aiguille, est désinfecté à l'éthanol 70% entre chaque rameau. Chaque rameau est blessé, et donc inoculé, en 3 points distants l'un de l'autre de 4 cm.

Une goutte de 10 µl de solution bactérienne est déposée sur chacune des blessures. Pour le témoin eau, il s'agit d'une goutte du même volume d'eau déminéralisée stérile. On veillera à ce que la goutte ne s'écoule pas et reste donc bien « posée » à la surface du rameau (fig. 26).

La durée d'incubation est de 19 jours. Pendant cette période, les boîtes sont placées à l'obscurité en chambre climatique à 22°C. Au bout de 7 jours, 1 ml d'eau déminéralisée stérile a été ajoutée à chacune des bandes de papier-filtre.

### 6.4. Dispositif expérimental et mesure des résultats

L'essai « scalpel » et l'essai « aiguille » sont indépendants. Il s'agit donc de deux essais à 5 blocs chacun. Ainsi, pour un essai nous disposons de 5 boîtes de 4 rameaux où l'on teste pour chacun une concentration différente d'inoculum (pour mémoire, un témoin eau et  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^9$  cfu/ml). Les plans d'expérience (fig. 27) sont réalisés par le logiciel StatBox 7.

Les données recueillies consistent en une mesure de la longueur de la nécrose. Cette dernière se définit comme la longueur maximale (en mm) de la zone où les tissus sont visiblement atteints (fig. 28). La mesure s'effectue manuellement à l'aide d'un pied-à-coulisse électronique, après suppression de l'écorce au scalpel sur une longueur d'environ 1,5 cm de part et d'autre de chaque blessure réalisée (fig. 29).

On réalise ensuite une analyse de variance à l'aide du logiciel StatBox 7, où l'on considère que la taille de la nécrose de chaque rameau est en fait la moyenne de la taille des 3 nécroses mesurées sur chacun d'entre eux.

Il est à noter que la suppression de l'écorce et la mesure de la taille de la nécrose doivent être réalisées de manière quasi simultanée car l'oxydation des tissus est rapide et provoque une distinction moins nette des contours de la nécrose.

## 7. Choix d'une procédure de désinfection des rameaux

### 7.1. Identification des champignons présents sur les rameaux

Différents organismes fongiques ont été prélevés à l'aiguille sur les rameaux utilisés dans l'essai précédent et décrit ci-avant. Ces organismes ont été repiqués sur un milieu de culture PDA+S, puis mis en culture à l'obscurité en chambre climatique à 22°C pendant 3 jours avant d'être identifiés.

### 7.2. Test de différentes substances aux propriétés désinfectantes

Le matériel de laboratoire et sa préparation sont les mêmes que ce qui a été utilisé et pratiqué pour l'essai de détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter. Ainsi, les boîtes plastiques destinées au test et leur couvercle sont lavés à l'eau savonneuse, puis 4 barquettes en aluminium tapissées d'une bande de papier-filtre sont disposées à l'intérieur. Chaque bande est humectée par 3 ml d'eau déminéralisée stérile avant que les rameaux y soient placés.

Un ensemble de 16 portions de rameaux d'*Actinidia deliciosa* 'Hayward' de 20 cm ont été prélevées parmi les rameaux présents en chambre réfrigérée. Ces portions ont ensuite été désinfectées par immersion dans différents bains selon la substance considérée.





Photographie personnelle

**Figure 29** : La nécrose est mesurée manuellement à l'aide d'un pied-à-coulisse électronique, après suppression de l'écorce au scalpel sur une longueur d'environ 1,5 cm de part et d'autre de chaque blessure réalisée.



Photographie personnelle

**Figure 30** : Lors du test désinfection à l'aide de différentes substances aux propriétés désinfectantes, les rameaux de la modalité hypochlorite de sodium sont trempés pendant 10 minutes dans un bain d'eau de Javel à 4%, avant d'être rincés par 2 bains successifs d'eau déminéralisée stérile.



Photographie personnelle

**Figure 31** : Lors du test de désinfection à l'aide de différentes substances aux propriétés désinfectantes, les rameaux de chacune des modalités sont séchés à l'air libre sur papier absorbant stérilisé après leur trempage.

Les modalités d'essai étaient les suivantes :

- Témoin eau : trempage de 5 minutes dans un bain d'eau déminéralisée stérile.
- Ethanol : trempage de 10 minutes dans un bain d'éthanol à 70% + succession de 2 rinçages dans des bains d'eau déminéralisée stérile.
- Hypochlorite de sodium : trempage de 10 minutes dans un bain d'eau de Javel à 4% (fig. 30) + succession de 2 rinçages dans des bains d'eau déminéralisée stérile.

Fongicide : trempage de 5 minutes dans un bain de thiabendazole à 45 g/hl + succession de 2 rinçages dans des bains d'eau déminéralisée stérile. La spécialité commerciale utilisée était Tecto 500 SC (Syngenta Agro S.A.S.) ; 500 grammes de matière active par litre de spécialité commerciale.

Après un séchage à l'air libre sur papier absorbant stérilisé (fig. 31), les rameaux sont retaillés pour obtenir une longueur totale de 15 cm. Chaque extrémité est ensuite trempée l'espace de quelques secondes dans de la cire chaude de paraffine, puis placée dans la boîte correspondante.

Chaque modalité d'essai correspond à une boîte. Ainsi, l'essai comporte 4 boîtes de 4 rameaux chacune.

Les boîtes contenant les rameaux ont été placées pendant 5 jours à l'obscurité en chambre climatique à 22°C, avant observation des organismes fongiques présents, soit à la loupe binoculaire, soit au microscope optique après un montage entre lame et lamelle.

Les résultats sont une mesure subjective du degré de développement des organismes fongiques, suite à une observation sous loupe binoculaire et une appréciation de l'état physiologique des rameaux.

### 7.3. Organismes fongiques présents dans le laboratoire

Des prélèvements microbiologiques d'échantillons d'air ont été conduits dans le laboratoire en 3 zones différentes et dans la chambre climatique. Ces tests réalisés avec un aérobiocollecteur portatif (AIRTEST OMEGA) consistent à aspirer et canaliser un échantillon d'air à travers une grille de prélèvement et de l'accélérer pour le diriger sur la surface d'une boîte (BBL™ RODAC™) de gélose nutritive. Ainsi, les organismes fongiques présents dans l'air ambiant entrent en contact avec le milieu de culture. Un échantillon d'air représente un volume de 200 litres collectés en 2 minutes.

Les boîtes sont conservées dans une boîte hermétiquement fermée et placée dans les conditions de température et de lumière ambiante du laboratoire. Le dénombrement et l'identification des organismes fongiques présents sont effectués 48 heures après la réalisation des tests.

## 8. Test de sensibilité variétale défini

*Deux essais ont été conduits suivant ce protocole. Le premier a été initié en date du 23 mai 2012 et le second le 26 juin 2012.*

### 8.1. Préparation du matériel de laboratoire

Les boîtes destinées au test sont en plastique rigide translucide et possèdent un couvercle. La dimension de ces boîtes est de 23x23 cm pour une hauteur de 2 cm.

Boîtes et couvercles sont lavés à l'eau savonneuse, puis essuyés à l'éthanol à l'aide d'un papier absorbant imbibé. Chaque boîte et couvercle sont ensuite numérotés de 1 à 28.



Photographie personnelle

**Figure 32** : Pour chaque espèce/variété 5 portions de rameaux d'environ 20 cm sont prélevées. Elles sont ensuite placées par espèces/variétés en sacs plastiques fermés et étiquetés, puis à nouveau placées en chambre froide.

Cinq barquettes en aluminium (22 x 4,5 cm) tapissées d'une bande de papier-filtre de même dimension sont disposées à l'intérieur de chacune des boîtes dans le sens vertical. Ainsi, les boîtes plastiques contiennent 5 rameaux chacune. L'ensemble barquette en aluminium et papier-filtre est à autoclaver à 121°C pendant 15 minutes avant d'être placé dans les boîtes plastiques.

Les bandes de papier-filtre sont individuellement humectées par 2 ml d'eau déminéralisée stérile avant d'y placer les rameaux.

### 8.2.Préparation du matériel végétal

La première étape consiste en la sélection des portions de rameaux qui seront utilisées pour le test. Ainsi, le matériel végétal est sorti de la chambre froide où il était conservé afin de prélever les portions de rameaux nécessaires.

Pour chaque espèce/variété 5 portions de rameaux d'environ 20 cm sont prélevées. On cherchera dans la mesure du possible à prélever des portions de diamètre homogène, ne présentant pas de blessures ou nécroses visibles et étant les plus rectilignes possibles.

Les 5 portions par espèces/variétés ainsi prélevées sont placées en sacs plastiques fermés et étiquetés (fig. 32), puis à nouveau placées en chambre froide dans les mêmes conditions.

Le lendemain, les portions de rameaux (140 au total) sont sorties de la chambre froide puis entrées en module de laboratoire confiné NS2, où la première opération réalisée est une désinfection.

Cette dernière consiste en un trempage de 10 minutes dans un bain d'éthanol à 70%, puis en une succession de 2 rinçages dans des bains d'eau déminéralisée stérile. Le séchage des rameaux est réalisé par tapotement des rameaux avec du papier absorbant stérile. Le temps de terminer leur séchage, les rameaux sont enveloppés dans du papier absorbant stérile pour ne pas être directement au contact de l'air ambiant du laboratoire.

S'en suit une opération de retaille des portions de rameau à une taille définitive de 15 cm. C'est à ce moment que chaque extrémité de rameau (environ 1,5 cm) est plongée pendant quelques secondes dans de la cire chaude de paraffine.

Les rameaux sont ensuite placés dans les boîtes à l'emplacement attribué par le plan d'expérience préalablement réalisé.

### 8.3.Préparation de l'inoculum

La mise en culture de l'inoculum est réalisée en parallèle de la préparation du matériel végétal. La souche bactérienne est sortie du congélateur à -80°C, puis mise en culture en milieu King B liquide, placé sous agitation à 150 tr/minute. Le tout étant maintenu à la température ambiante du laboratoire (environ 20°C). Pour permettre les échanges gazeux, la fermeture des bouteilles est réalisée avec du parafilm.

Après 48 heures de culture, la solution bactérienne est centrifugée à 4 000 tr/min pendant 10 minutes. Le culot récupéré, suite à la suppression du surnageant par pipetage, est ensuite mis en suspension dans de l'eau déminéralisée stérile, pour ainsi former la solution-mère.

L'absorbance de cette solution est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. On réalise alors 3 répétitions de la mesure, pour lesquelles 2 ml de solution-mère sont placés en cuve stérile.

Par dilution, on cherche ensuite à obtenir une solution-fille d'une densité optique de 0.417 nm, devant correspondre à une concentration de  $10^9$  cfu/ml. Cette solution est ensuite diluée en série au dixième pour obtenir une nouvelle solution d'une concentration de  $10^7$  cfu/ml, qui sera la solution inoculée. Dans les conditions de cet essai, on veillera à préparer un volume minimal de cette solution de 4 ml, permettant ainsi de mener à bien toutes les inoculations et les étalements de contrôle.

L'ensemble des solutions est conservé dans la glace pendant toute la durée des manipulations.



**Figure 33** : La durée d'incubation est de 19 jours. Pendant cette période, les boîtes sont empilées et placées à l'obscurité en chambre climatique à 22°C.

**Tableau 2** : Liste du matériel végétal utilisé, présenté sous la forme genre, espèce, variété.

<b>Genre espèce</b>	<b>Variété</b>
<b><i>Actinidia chinensis</i></b>	'13-04'
	'13-11'
	'Chinabelle'
	'First Emperor'
	'Jintao'
	'Pollichina'
	'Sélection 403'
	'Sélection 423'
	'Sélection 505'
	'Sélection 513'
<b><i>Actinidia deliciosa</i></b>	'Abbott'
	'Greensill W08'
	'Hayward'
	'Jones W09'
	'M54'
	'Montcap'
	'Monty'
	'N8'
	'Petit Homme'
	'Sola'
	'Summer 3373'
'Summer 4605'	

<b>Genre espèce</b>	<b>Variété</b>
<b><i>Actinidia arguta</i></b>	'43-13'
<b><i>Actinidia eriantha</i></b>	'68-2'
<b><i>Actinidia giraldi</i></b>	'W36'
<b><i>Actinidia melanandra</i></b>	'W35'
<b><i>Actinidia rubricaulis</i></b>	'W46'

#### 8.4. Inoculation

Trois blessures au scalpel d'une profondeur de 2 mm et d'une longueur de 5 mm environ, sont réalisées par portion de rameau. Distantes l'une de l'autre de 4 cm, elles doivent être perpendiculaires au rameau et réalisées sur la partie supérieure. Le scalpel utilisé est désinfecté à l'éthanol 70% entre chaque rameau.

Une goutte de 10 µl de solution bactérienne ( $10^7$  cfu/ml) est déposée sur chaque blessure. On estime donc déposer 100 000 cellules bactériennes sur chacune des blessures. Pour le témoin eau, il s'agit d'une goutte du même volume d'eau déminéralisée stérile. On veillera à ce que la goutte ne s'écoule pas et reste donc bien « posée » à la surface du rameau.

Ensuite, des étalements en boîte de Petri sur milieu King B gélosé sont réalisés, afin de déterminer la concentration réelle de l'inoculum. Ainsi, 100 µl des dilutions en série correspondant aux concentrations théoriques de  $10^4$  à  $10^{-2}$  cfu/ml sont étalées. Le dénombrement est pratiqué après une mise en culture de 48 heures à 22°C.

#### 8.5. Incubation

La durée d'incubation est de 19 jours. Pendant cette période, les boîtes sont empilées et placées à l'obscurité en chambre climatique à 22°C (fig. 33). Au bout de 10 jours, entre 1 et 2 ml d'eau déminéralisée stérile ont été ajoutés à chacune des bandes de papier-filtre selon le degré d'humectation de ces dernières, afin de garantir le maintien d'une hygrométrie élevée dans les boîtes.

#### 8.6. Dispositif expérimental

Généré par le logiciel StatBox 7, le type de plan d'expérience utilisé est un plan en randomisation totale à 5 répétitions. Différents pour les deux essais réalisés, ils sont placés en annexe (annexes III et IV).

L'essai comporte 27 espèces/variétés (tab. 2) et également un témoin eau pratiqué sur la variété de référence *A. deliciosa* 'Hayward'. Cet essai à 5 répétitions se compose donc de 28 facteurs, soit 140 rameaux. On place 5 rameaux par boîte, ainsi 28 boîtes sont nécessaires.

#### 8.7. Mesure et observation des résultats

Après la période d'incubation, deux types de données vont être recueillies.

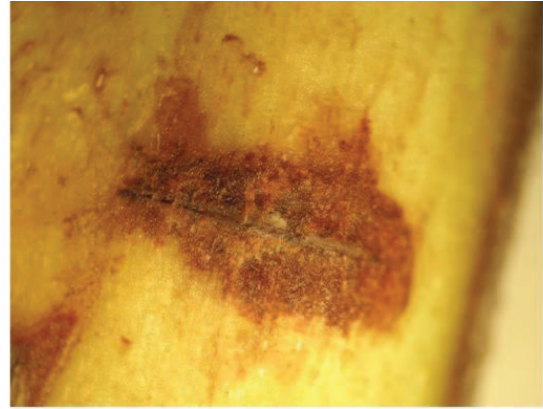
La première, réalisée après suppression de l'écorce au scalpel sur une longueur d'environ 1,5 cm de part et d'autre de chaque blessure, consiste en une mesure de la longueur de la nécrose. Rappelons que la nécrose se définit comme la longueur maximale (en mm) de la zone où les tissus sont visiblement atteints. Cette mesure s'effectue manuellement à l'aide d'un pied-à-coulisse électronique.

Il est rappelé que la suppression de l'écorce et la mesure de la taille de la nécrose doivent être réalisées de manière quasi simultanée car l'oxydation des tissus est rapide et provoque une moins nette distinction des contours de la nécrose.

On calcule ensuite la taille moyenne des trois lésions mesurées sur un même rameau, ce qui correspond donc à la moyenne des trois mesures effectuées sur chacun d'entre eux. Cette valeur à deux décimales est ensuite convertie en un indice d'une valeur entière comprise entre 0 et 50, selon le barème suivant (tab. 3) :



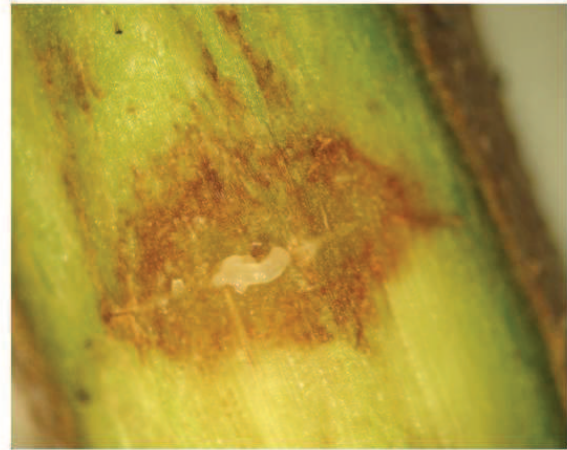
Note 0 :  
Absence de suintement. Blessure et nécrose sèches.



Note 1 :  
Suintement faible et limité à la zone incisée.



Note 2 :  
Suintement moyen et limité à la zone nécrosée.



Note 3 :  
Suintement important accompagné de la formation de plaques discontinues au niveau de la zone nécrosée et/ou présence de colonies formant des boudins au niveau de la zone incisée.

Photographies et réalisation personnelles



Note 4 :  
Suintement présentant l'une ou les deux caractéristiques de la note 3, et s'accompagnant en plus de la présence de colonies en dehors de la zone nécrosée. C'est-à-dire au niveau de tissus visiblement sains.

**Figure 34** : photographies de rameaux observés à la loupe binoculaire (x 2,5), 20 jours après inoculation et 24 heures après suppression de l'écorce, montrant différentes intensités de suintement et la note qui y correspond.

**Tableau 3 :** Tableau de correspondance entre la taille moyenne des nécroses d'un même rameau et la valeur de l'indice à y attribuer.

Taille moyenne de la nécrose (mm)	Indice
Inférieure ou égale à 1,00	0
Comprise entre 1,01 et 3,00	10
Comprise entre 3,01 et 5,00	20
Comprise entre 5,01 et 10,00	30
Comprise entre 10,01 et 20,00	40
Supérieure à 20,00	50

La seconde mesure est subjective et résulte d'une observation sous loupe binoculaire au grossissement 2,5. Pour cela, 24 heures après la première mesure, une note est attribuée à chaque blessure en fonction du degré de prolifération des bactéries à la surface du rameau. Cette note est une valeur entière comprise entre 0 et 4 (fig. 34), selon les critères suivants :

0 : Absence de suintement. Blessure et nécrose sèches.

1 : Suintement faible et limité à la zone incisée (blessure).

2 : Suintement moyen et limité à la zone nécrosée.

3 : Suintement important accompagné de la formation de plaques discontinues au niveau de la zone nécrosée et/ou présence de colonies formant des boudins au niveau de la zone incisée

4 : Suintement présentant l'une ou les deux caractéristiques de la note 3, et s'accompagnant en plus de la présence de colonies en dehors de la zone nécrosée. C'est-à-dire au niveau de tissus visiblement sains.

Ensuite, de même que pour les nécroses, une note moyenne de suintement par rameau est attribuée. Il s'agit donc de la moyenne des 3 notes (une par point d'inoculation) attribuées sur le rameau.

Cette note moyenne est ensuite convertie en un indice d'une valeur comprise entre 0 et 50, selon le barème suivant (tab. 4) :

**Tableau 4 :** Tableau de correspondance entre l'intensité moyenne de suintement d'un même rameau et la valeur de l'indice à y attribuer.

Note moyenne de suintement	Indice
0	0,0
1	12,5
2	25,0
3	37,5
4	50,0

La valeur finale de l'indice de sensibilité attribué à chaque rameau est l'addition de l'indice attribué pour la taille de la nécrose et de celui attribué pour l'intensité de suintement. La valeur obtenue est ainsi une note sur 100 sans unité. L'indice de sensibilité variétale à *Psa* d'une variété donnée est donc une moyenne de la note sur 100 attribuée à chacun des rameaux de la même variété.





Ainsi, dans le cas fictif où les 3 nécroses d'un rameaux mesurent 3,37, 3,80 et 4,34 mm, on obtient une nécrose moyenne de 3,84 mm. Cette mesure comprise entre 3,01 et 5,00 permet d'attribuer la note de 20/50 à ce rameau. De même, pour des suintements notés 2, 2 et 3, la moyenne de suintement pour le rameau est de 2, d'où une note de suintement de 25,0/50. Ainsi, en additionnant les deux notes, nous obtenons  $20 + 25 = 45$ . La note de sensibilité variétale du rameau considéré est donc de 45/100.

### 8.8. Ré-isolément de *Psa*

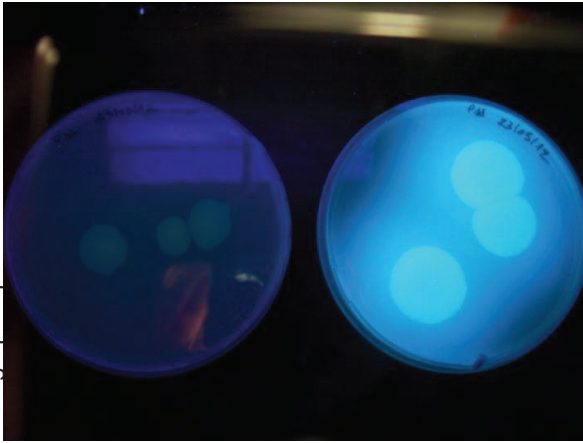
Plusieurs prélèvements aléatoires d'exsudats ont été réalisés à la suite des mesures effectuées sur les rameaux. Ainsi, on prélève à l'aiguille un amas de bactéries, soit au niveau de la zone d'incision, soit dans la zone nécrosée, que l'on met ensuite en suspension dans 1 ml d'eau déminéralisée stérile. 100  $\mu$ l de cette solution sont déposés sur milieu King B gélosé, puis dilués par épuisement à l'aide d'une oose stérile.

Des prélèvements de tissus sont ensuite réalisés. Une petite portion de bois est prélevée à la limite entre la zone nécrosée et les tissus sains. Chaque extrait est ensuite dilacéré dans l'eau déminéralisée stérile. 100  $\mu$ l de chaque solution sont déposés sur milieu King B gélosé, puis dilués par épuisement à l'aide d'une oose stérile. On veillera à réaliser les prélèvements de tissus au niveau des mêmes blessures que celles retenues pour les prélèvements de suintements à l'aiguille.

Après 48 heures à l'obscurité à 22°C, les différentes boîtes de Petri sont placées sous lumière ultra-violette pour observer la fluorescence des colonies isolées. Plusieurs d'entre-elles, qu'elles soient fluorescentes ou non, sont une nouvelle fois prélevées et repiquées sur milieu King B gélosé.

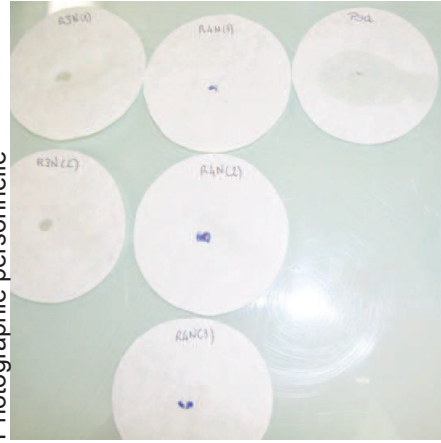
Passé 72 heures à l'obscurité à 22°C, chaque colonie isolée est soumise à différents tests biochimiques. On observera une nouvelle fois la fluorescence sous lumière ultra-violette, puis la réaction aux tests oxydase, levane-sucrose, esculine et gélatine.

Photographie personnelle



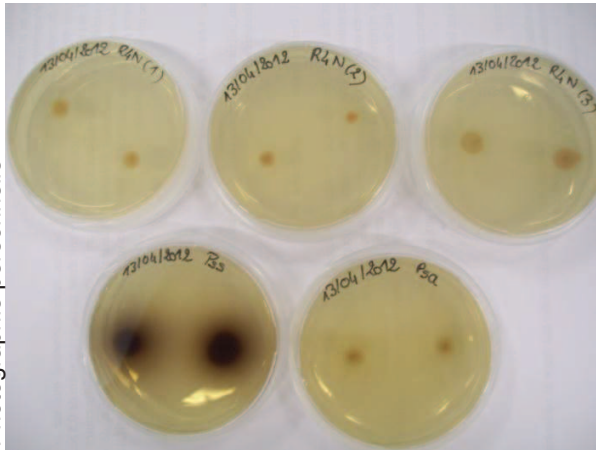
**Figure 35 :** Observation de la fluorescence sous lumière ultra-violette de colonies bactériennes cultivées sur milieu King B gélosé. A gauche, des colonies de *Psa* ; à droite, des colonies de *Pss*.

Photographie personnelle



**Figure 36 :** Tests oxydase effectués sur les colonies R3N (1) (2), R4N (1) (2) (3) et *Psa*. La coloration bleue de la colonie en 10 à 30 secondes indique une réaction positive.

Photographie personnelle



**Figure 37 :** Tests esculine effectués sur les colonies R4N (1) (2) (3), avec sur la ligne du bas les témoins. A gauche, *Pss* (témoin positif) et à droite, *Psa* (témoin négatif).

Photographie personnelle



Photographie personnelle



**Figure 38 :** Tests gélatine. Après une période de développement de 48 heures à 22°C les tubes sont placés environ 10 minutes dans la glace pour assurer la solidification du milieu avant lecture des résultats. A gauche, *Psa*, avec absence de liquéfaction de la gélatine. A droite, *Pss* avec liquéfaction de la gélatine correspondant à une réaction positive.

# Troisième partie : résultats

## 1. Etapes d'élaboration du test

### 1.1. Matériel végétal et tests biochimiques

Lorsque cela a été possible, chaque colonie a été soumise à l'ensemble des 5 tests biochimiques. A savoir, fluorescence sur milieu King B (fig. 35), test oxydase (fig.36), test esculine (fig. 37), tests levane-sucrose et test gélatine (fig. 38). Toutefois, les colonies R1H (2), R3A blanc (2), R3A orange (2) et R4N (1) sont prostrées et certains tests n'ont pu être réalisés par manque de bactéries présentes.

**Tableau 5 :** Résultats obtenus aux tests biochimiques (fluorescence sur milieu King B gélosé, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine) pratiqués sur l'ensemble des colonies isolées à partir des 7 échantillons prélevés ainsi que sur les témoins *Psa* et *Pss*.

	R1H			R1P		R3A blanc		R3A orange		R3N		R4N			R10P		Psa	Pss
	1	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	3	1	2				
Fluorescence	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Oui
Oxydase	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Esculine	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
Levane-sucrose	+	/	+	+	-	+	/	∅	∅	+	+	/	/	/	+	+	+	+
Gélatine	+	/	-	-	-	-	/	+	+	-	-	/	/	/	-	-	-	+

Les deux colonies formées suite au repiquage de l'échantillon R1H (2), ont un développement jaune orangé sur milieu levane-sucrose, non typique de colonies de *Pseudomonas sp.* qui ont un aspect blanc crémeux.

Aucune colonie isolée des 7 échantillons n'a pu être démontrée comme appartenant à l'espèce *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* ou *syringae* (tab. 5).

### 1.2. Etablissement d'une courbe de densité optique en fonction de la concentration bactérienne d'une suspension de *Psa*

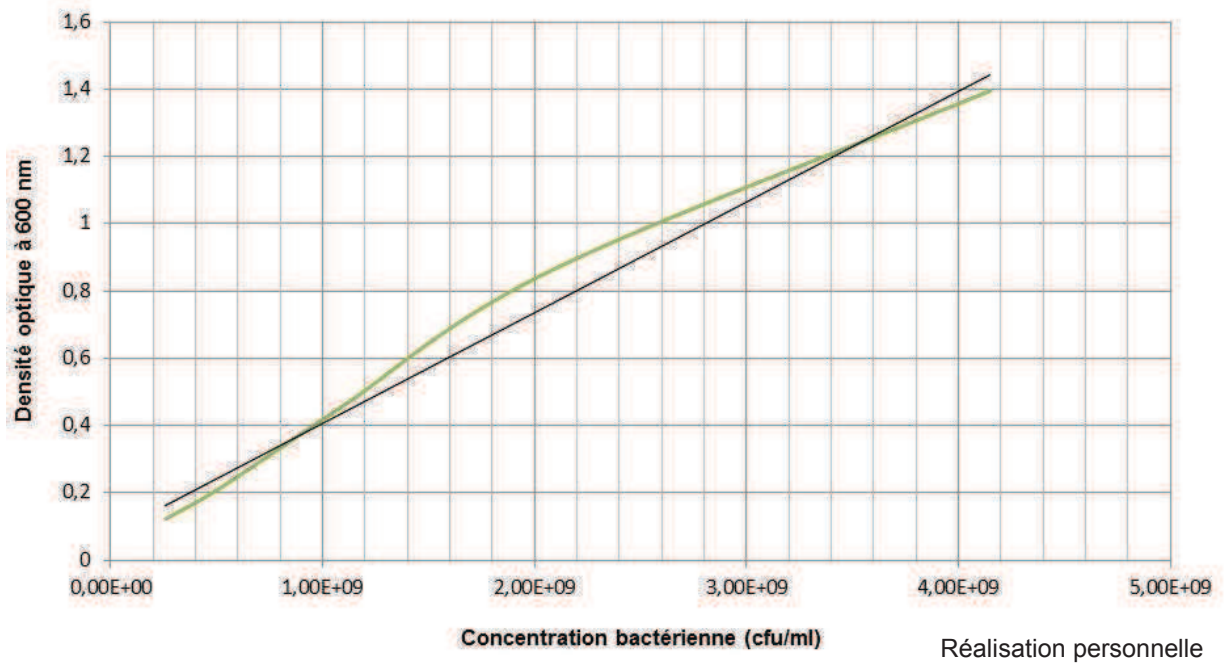
#### 1.2.1. Première courbe

Les deux premiers essais d'établissement d'une courbe n'ont pas fonctionné. Pour le premier, les mesures données par le spectrophotomètre semblent incohérentes (données non présentées) et les étalements ont conduit à une trop faible quantité de bactéries sur les boîtes de Petri pour permettre un comptage. Pour le deuxième essai, les bactéries sont cette fois-ci trop nombreuses et forment un tapis bactérien empêchant ainsi de les distinguer les unes des autres.

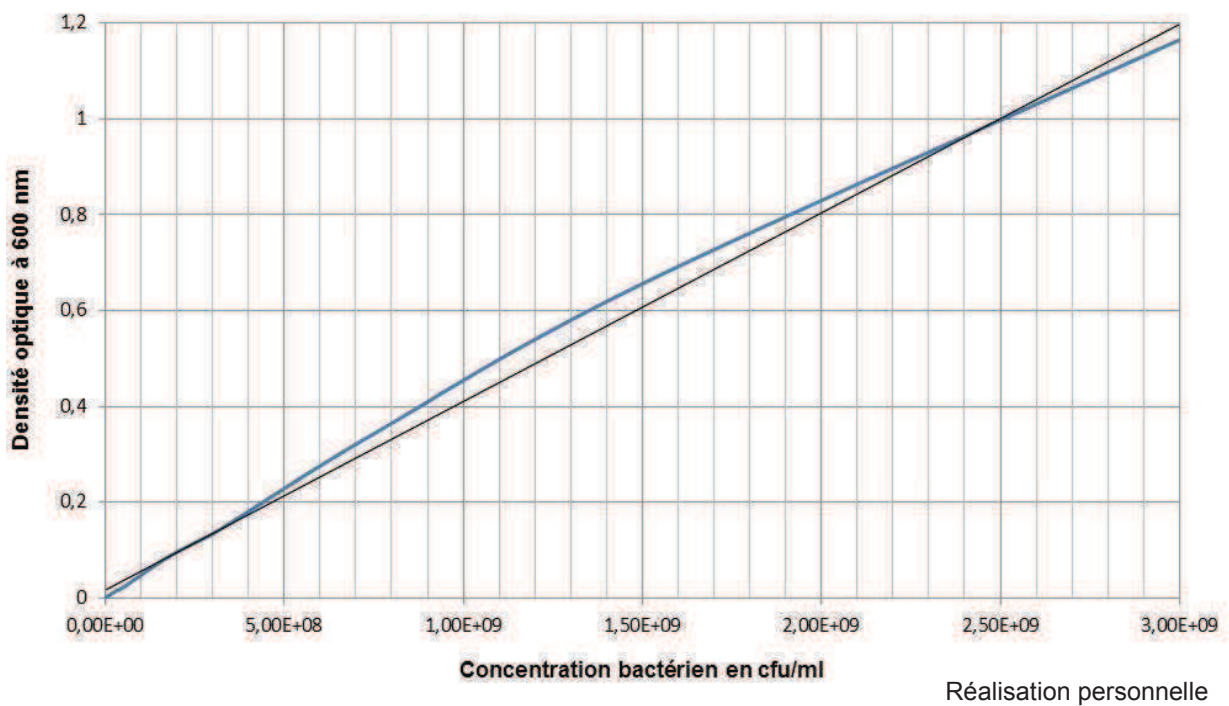
Lors d'un troisième essai il devient possible de dénombrer les colonies. Ainsi, on dénombre celles sur les boîtes correspondant à une dilution à  $10^{-6}$ . Ayant compté en moyenne 415 colonies par boîte et étalé 0,1 ml, on estime que la concentration de la solution mère est de  $(415 \div 0,1) \div 10^{-6} = 4,15 \cdot 10^9 \text{ cfu/ml}$ . Ainsi, c'est grâce à cette donnée et aux mesures spectrophotométriques que sont calculés les points de la courbe (tab. 6).

**Tableau 6 :** Densités optiques mesurées à 600 nm pour la solution mère et des dilutions de facteur 2. Pour chaque solution sa concentration bactérienne est ensuite calculée en fonction du dénombrement effectuée sur boîte de Petri.

	Densité optique (600 nm)	Concentration de la solution
Solution-mère	1,396	$4,14 \times 10^9$
1/2	0,861	$20,75 \times 10^8$
1/4	0,450	$10,37 \times 10^8$
1/8	0,216	$51,87 \times 10^7$
1/16	0,123	$25,94 \times 10^7$



**Figure 39** : En vert, la première courbe de densité optique à 600 nm en fonction de la concentration bactérienne en cfu/ml d'une suspension de *Psa*. En noir, sa droite de régression linéaire.



**Figure 40** : En bleu, la seconde courbe de densité optique à 600 nm en fonction de la concentration bactérienne en cfu/ml d'une suspension de *Psa*. En noir, sa droite de régression linéaire.

La courbe obtenue est représentée ci-contre (fig. 39).

Une régression linéaire simple donne une droite d'équation  $y = 3^{-10}x + 0,0766$  et d'un coefficient de corrélation linéaire où  $r^2 = 0,986$ .

### 1.2.2. Deuxième courbe

La seconde courbe est réalisée avec la nouvelle méthodologie de préparation de la solution-mère.

Les colonies ont été dénombrées sur les boîtes correspondant à une dilution à  $10^{-7}$ , où l'on a pu compter 30 colonies en moyenne. Ainsi, on estime que la concentration de la solution-mère est de  $(30 \div 0,1) \div 10^{-7} = 3,00 \cdot 10^9 \text{ cfu/ml}$  et l'on calcule les points de la courbe (tab. 7). La nouvelle courbe obtenue est représentée par la figure ci-contre (fig. 40).

**Tableau 7 :** Densités optiques mesurées à 600 nm pour la solution mère et des dilutions de facteur 2 ou de facteur 10. Pour chaque solution sa concentration bactérienne est ensuite calculée en fonction du dénombrement effectuée sur boîte de Petri.

	Densité optique (600 nm)	Concentration de la solution		Densité optique (600 nm)	Concentration de la solution
Solution-mère	1,165	$3,00 \times 10^9$	$10^{-1}$	1,165	$3,00 \times 10^8$
1/2	0,656	$1,50 \times 10^9$	$10^{-2}$	0,656	$3,00 \times 10^7$
1/4	0,343	$7,50 \times 10^8$	$10^{-3}$	0,343	$3,00 \times 10^6$
1/8	0,169	$3,75 \times 10^8$			
1/16	0,091	$1,875 \times 10^8$			
1/32	0,045	$9,375 \times 10^7$			
1/64	0,021	$4,6875 \times 10^7$			

Une régression linéaire simple donne une droite d'équation  $y = 4^{-10}x + 0,0168$  et d'un coefficient de corrélation linéaire où  $r^2 = 0,9959$ .

### 1.2.3. Vérifications de points des courbes

## PREMIERES MANIPULATIONS

**Tableau 8 :** Nombre moyen de colonies dénombré suite aux étalements des différentes dilutions des suspensions bactériennes ayant servi aux premières manipulations de vérification de la seconde courbe.

Solution considérée	Concentration supposée de la solution étalée (cfu/ml)	Nombre de colonies dénombrées
B	$10^4$ à $10^{-2}$	Tapis bactériens sur l'ensemble des boîtes
C	$3 \cdot 10^4$ à $3 \cdot 10^1$	Tapis bactériens sur l'ensemble des boîtes
	$3 \cdot 10^0$	424 ; 369
	$3 \cdot 10^{-1}$	407 ; 479
	$3 \cdot 10^{-2}$	313 ; 315
D	$10^4$	395 ; $\approx 400$
	$10^3$	$\approx 189$ ; $\approx 231$
	$10^2$	106 ; 84
	$10^1$	75 ; 193
	$10^0$	Bactéries nombreuses et regroupées
	$10^{-1}$	131 ; 72
	$10^{-2}$	Pas d'étalements réalisés



Le signe  $\approx$  (tab. 8) signifie que le nombre de colonies peut varier à plus ou moins 5 colonies étant donné la proximité de certaines d'entre elles.

Le dénombrement est parfois rendu impossible car les bactéries sont trop nombreuses et forment alors un tapis bactérien.

On remarque très rapidement une incohérence des résultats car d'une part dans certains cas on peut noter que le nombre de colonies augmente au fur et à mesure des dilutions, et d'autre part on dénombre une quantité importante de colonies sur les boîtes où la concentration bactérienne devrait être nulle.

## DEUXIEMES MANIPULATIONS

**Tableau 9** : Nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions des suspensions bactériennes ayant servi aux secondes manipulations de vérification de la seconde courbe.

Solution considérée	Concentration supposée de la solution étalée (cfu/ml)	Nombre de colonies dénombrées
a	$10^4$ à $10^{-3}$	Tapis bactériens sur l'ensemble des boîtes
b	$10^4$	Tapis bactérien ; Tapis bactérien
	$10^3$	102 ; 176
	$10^2$	37 ; 81
	$10^1$	36 ; 2
	$10^0$	Tapis bactérien ; Tapis bactérien
	$10^{-1}$	60 ; Tapis bactérien
	$10^{-2}$	26 ; 27
	$10^{-3}$	110 ; 75

On dénombre une nouvelle fois une quantité importante de colonies sur les boîtes où la concentration bactérienne devrait être nulle (tab. 9). De même, le nombre de colonies a tendance à augmenter au fur et à mesure des dilutions.

### 1.3. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter

#### 1.3.1. Contrôle de la concentration de la solution d'inoculation

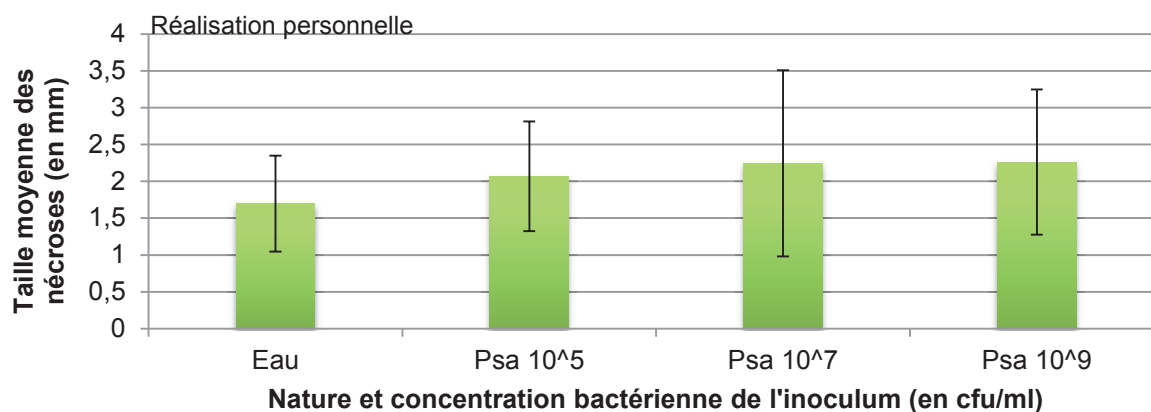
Afin de vérifier que les inoculations ont été effectuées avec les concentrations désirées on pratique en dénombrement sur boîtes de Petri.

Les colonies présentes sur les boîtes correspondant aux étalements des concentrations de  $10^8$  à  $10^4$  cfu/ml sont indénombrables car elles forment un tapis bactérien.

Pour les étalements de la solution à  $10^3$ , seule une boîte est lisible et comporte 100 colonies. La deuxième répétition compte plusieurs colonies de forme étoilée.

Les colonies sont également indénombrables sur les répétitions des étalements de la solution à  $10^2$ . La première boîte comporte 3 grosses colonies et la deuxième une quinzaine de petites colonies regroupées au centre de la boîte.

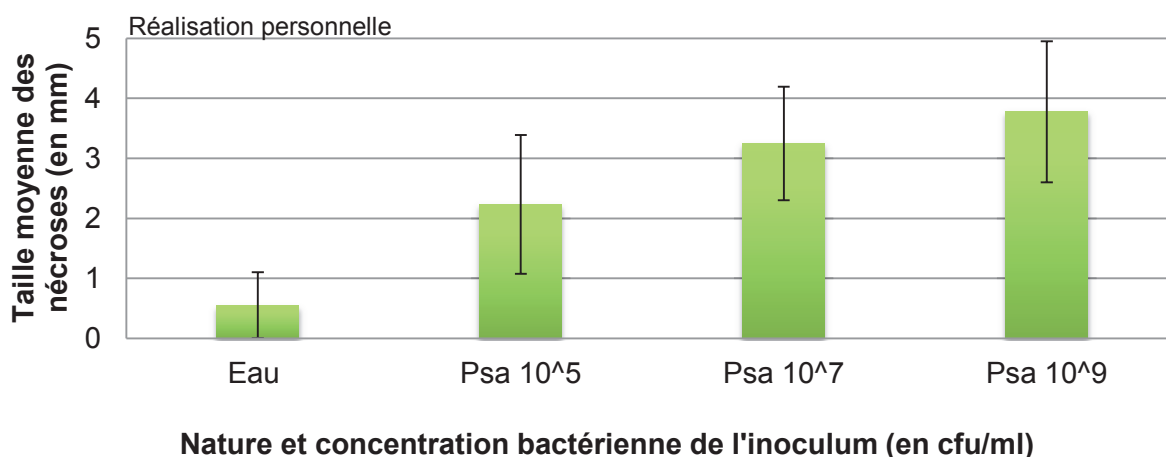




**Figure 41** : Graphique présentant les moyennes des mesures des nécroses et les écarts-types obtenus suite à l'inoculation des rameaux soit avec de l'eau déminéralisée stérile, soit avec une suspension bactérienne de *Psa* de  $10^5$ ,  $10^7$  ou  $10^9$  cfu/ml, lorsque qu'on réalise une piqûre de l'écorce à l'aiguille avant inoculation.

**Tableau 10** : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur effectuée avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après piqûre de l'écorce à l'aiguille.

Variance	Degré de liberté	Carré Moyen	Test F	Proba
<b>Totale</b>	19	0,451		
<b>Facteur concentration</b>	3	0,342	0,605	0,62737
<b>Blocs</b>	4	0,19	0,335	0,8496
<b>Résiduelle</b>	12	0,566		



**Figure 42** : Graphique présentant les moyennes des mesures des nécroses et les écarts-types obtenus suite à l'inoculation des rameaux soit avec de l'eau déminéralisée stérile, soit avec une suspension bactérienne de *Psa* de  $10^5$ ,  $10^7$  ou  $10^9$  cfu/ml, lorsque qu'on pratique une incision de l'écorce au scalpel avant inoculation.

### 1.3.2. Résultats mesurés et analyses statistiques

#### **PIQURE A L'AIGUILLE**

Ci-contre, une représentation graphique des résultats obtenus (fig. 41). La mesure des nécroses donne les valeurs placées en annexe (annexe V), permettant ensuite de réaliser une analyse de variance dont les résultats sont les suivants :

La distribution des résidus ne suit pas une loi normale.

Pour le facteur concentration, la valeur de  $p$  est supérieure au seuil  $\alpha$  de 0,005 (tab. 10). Ainsi, on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle  $H_0$ . On considère donc que dans le cas d'une inoculation suite à une piqûre à l'aiguille, le facteur concentration n'a pas d'effet significatif sur la taille des nécroses.

La variance résiduelle, c'est-à-dire la variance qui n'est pas due au facteur testé, ici la concentration, est supérieure à la variance expliquée par le modèle.

Il n'y a pas d'effet bloc car en effet, la valeur de  $p$  est supérieure au seuil  $\alpha$  de 0,005. On accepte donc l'égalité des moyennes des variables.

De même, la valeur  $p$  du test de Tukey (0,634189) est supérieure à la valeur théorique (0,148). On peut donc conclure sur l'absence d'une interaction traitements/blocs.

La puissance à postériori de l'essai est faible. Elle est de 14 % au seuil de 5 %.

#### **INCISION AU SCALPEL**

Ci-contre, une représentation graphique des résultats obtenus (fig. 42). La mesure des nécroses donne les valeurs placées en annexe (annexe VI). De même que pour l'essai ci-dessus on réalise une analyse de variance dont les résultats sont les suivants :

Toutes les hypothèses de l'analyse de variance sont respectées.

Pour le facteur concentration, la valeur de  $p$  est nettement inférieure au seuil  $\alpha$  de 0,005 (tab. 11). On rejette ainsi l'hypothèse nulle  $H_0$  et l'on considère alors que dans le cas d'une inoculation suite à une incision au scalpel, le facteur concentration a un effet significatif sur la taille des nécroses.

La variation entre les traitements est 19,776 fois plus grande que la variation résiduelle. On estime ainsi que le modèle permet d'expliquer une grande partie de la variance.

Il n'y a pas d'effet bloc car en effet, la valeur de  $p$  est supérieure au seuil 0,005. On accepte donc l'égalité des moyennes des variables.

De même, la valeur  $p$  du test de Tukey (0,514427) est supérieure à la valeur théorique (0,249). On peut donc conclure sur l'absence d'une interaction traitements/blocs.

La puissance à postériori de l'essai est très forte. Elle est de 99 % au seuil de 5 %.

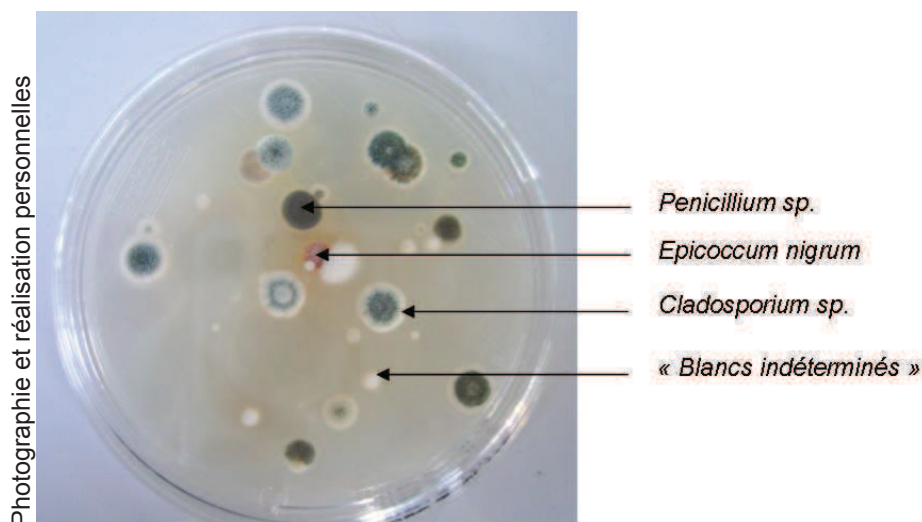
Le test de Newman Keuls à 5% permet de former 3 groupes pour lesquels les moyennes sont considérées comme significativement différentes (tab. 12). On considère ainsi qu'une inoculation à l'eau donne des résultats significativement différents d'une inoculation avec une solution à  $10^5$  cfu/ml. Ces deux facteurs étant tous deux différentes d'une inoculation à  $10^7$  ou  $10^9$  cfu/ml.

**Tableau 11** : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur effectuée avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après incision de l'écorce au scalpel.

Variance	Degré de liberté	Carré Moyen	Test F	Proba
<b>Totale</b>	19	2,079		
<b>Facteur concentration</b>	3	10,083	19,776	0,00008
<b>Blocs</b>	4	0,783	1,535	0,25363
<b>Résiduelle</b>	12	0,51		

**Tableau 12** : Données fournies par un test de Newman Keuls à 5% effectué avec les mesures réalisées sur l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes après incision de l'écorce au scalpel.

Modalités	Moyennes	Groupes homogènes
<b>10<sup>9</sup></b>	3,776	A
<b>10<sup>7</sup></b>	3,248	A
<b>10<sup>5</sup></b>	2,233	B
<b>eau</b>	0,551	C



**Figure 43** : Photographie légendée du milieu de culture correspondant au prélèvement d'air effectué en zone 3 du laboratoire après 48 heures.

## 1.4.Choix d'une procédure de désinfection des rameaux

### 1.4.1. Identification des champignons présents sur les rameaux

Les différents isolements ont conduit à l'identification des organismes fongiques suivants : *Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.*, *Epicoccum nigrum* et *Fusarium sp.*

### 1.4.2. Test de différentes substances aux propriétés désinfectantes

Compte rendu des observations faites :

- Eau déminéralisée stérile : présence relativement abondante de mycéliums et de fructifications à la surface des rameaux.
- Ethanol : la présence de mycéliums et de fructifications à la surface des rameaux semble légèrement moins abondante que dans la modalité eau déminéralisée stérile.
- Hypochlorite de sodium : On observe un seul type de mycélium développé à la surface des rameaux. Les cellules épidermiques sont brillantes et semblent avoir éclatées.
- Fongicide : On observe le développement d'un mycélium blanc et de fructifications noires à la surface des rameaux. Les cellules épidermiques sont scintillantes.

### 1.4.3. Organismes fongiques présents dans le laboratoire

Laboratoire

- Zone 1 : *Aspergillus niger* x1 ; *Cladosporium sp.* x3 ; *Penicillium sp.* x26
- Zone 2 : Blancs indéterminés x3 ; *Cladosporium sp.* x6 ; *Penicillium sp.* x20
- Zone 3 (fig. 43) : Blancs indéterminés x8 ; *Cladosporium sp.* x3 ; *Epicoccum nigrum* x1 ; *Penicillium sp.* x9

Chambre climatique : *Penicillium sp.* x12

Le nombre d'unités fongiques comptées ci-dessus nous permet d'estimer la population présente dans l'atmosphère grâce à une table de conversion (annexe VII). Ainsi, on considère que l'atmosphère comporte les nombres suivants d'unités/m<sup>3</sup> d'air :

Laboratoire

- Zone 1 : *Aspergillus niger* - 5 ; *Cladosporium sp.* - 15 ; *Penicillium sp.* - 135
- Zone 2 : Blancs indéterminés - 15 ; *Cladosporium sp.* - 30 ; *Penicillium sp.* - 105
- Zone 3 : Blancs indéterminés - 40 ; *Cladosporium sp.* - 15 ; *Epicoccum nigrum* - 5 ; *Penicillium sp.* - 45

Chambre climatique : *Penicillium sp.* - 60

## 2. Test de sensibilité variétale défini

### 2.1.Premier test

#### 2.1.1. Contrôle de la concentration bactérienne de l'inoculum

**Tableau 13** : Nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions de la suspension bactérienne ayant servi à l'inoculation lors du premier test.

Concentration supposée de la solution étalée (cfu/ml)	Nombre moyen de colonies dénombrées
10 <sup>4</sup>	Tapis bactériens sur l'ensemble des boîtes
10 <sup>3</sup>	273
10 <sup>2</sup>	500
10 <sup>1</sup>	43

Il n'y a pas de cohérence entre le nombre de colonies dénombrées, les dilutions effectuées et le nombre de colonies attendues (tab. 13).

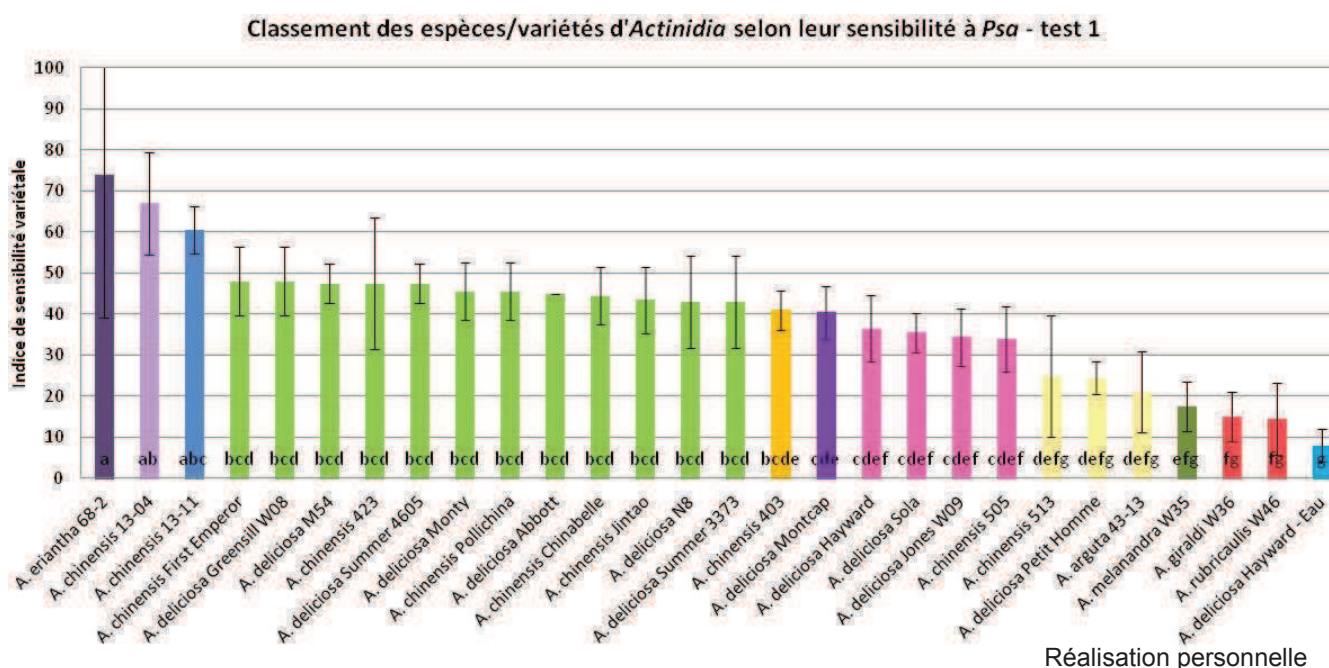
En réalisant une moyenne de ces différents dénombrements, on peut estimer que la concentration effective de l'inoculum était d'environ 3,2.10<sup>8</sup> cfu/ml.

**Tableau 14 :** Tableau regroupant les résultats attendus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, levane-sucrose, esculine et gélatine, pour des colonies de *Psa*, *Pss*, *P. viridiflava* et *P. fluorescens*.

	<i>Psa</i>	<i>Pss</i>	<i>P. viridiflava</i>	<i>P. fluorescens</i>
Fluorescence	Non	Oui	Oui	Oui
Oxydase	-	-	-	+
Esculine	-	+	+	
Levane-sucrose	+	+	-	
Gélatine	-	+	+	

**Tableau 16 :** Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, effectuée avec les valeurs des indices généraux (note sur 100) attribués à chacun des rameaux lors du premier test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*.

Variance	Degré de liberté	Carré Moyen	Test F	Proba
<b>Totale</b>	139	347,056		
<b>Facteur espèce/variété</b>	27	1194,754	8,372	0,000
<b>Résiduelle</b>	112	142,701		



**Figure 44 :** Graphique présentant l'ensemble des espèces/variétés utilisées dans le premier test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia sp.* à *Psa*. Chaque espèce/variété est classée dans l'ordre décroissant de la valeur de son indice de sensibilité variétale moyen. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen. Les lettres et couleurs identifient les groupes ayant une moyenne homogène (test de Newman Keuls à 5%).

### 2.1.2. Résultats des mesures et observations

La moyenne des nécroses par rameau de chaque espèce/variété et l'indice y correspondant sont présentés en annexe (annexe VIII). De même, le suintement moyen par rameau de chaque espèce/variété et la valeur de l'indice y correspondant sont présentés en annexe (annexe IX).

### 2.1.3. Ré-isolements de *Psa*

Avec l'ensemble de ces tests nous visons l'identification et la distinction de 4 bactéries du genre *Pseudomonas*, à savoir *Psa*, *Pss*, *P. viridiflava* et *P. fluorescens*, qui rappelons le, sont des bactéries pathogènes ou saprophytes du kiwi. A valeur de comparaison, les résultats attendus à l'ensemble des tests biochimiques pratiqués pour chaque de ces bactérie sont récapitulés ci-contre (tab. 14).

7 des 14 colonies bactériennes isolées ont pu être identifiées comme étant du *Psa* (en violet) et 2 comme étant du *P. fluorescens* (en bleu). 5 colonies (en marron) n'ont pas pu être identifiées par ces tests (tab. 15).

**Tableau 15** : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, levane-sucrose, esculine et gélatine, menés sur les 14 colonies isolées des 8 prélèvements de suintement sur rameau réalisés lors du premier test de sensibilité variétale.

	8A		8D		21E		24E		27A				28E	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3	4	1	2
Fluorescence	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	+	+	-	-
Levane-sucrose	+	+	+	+	-	+	-	+	/	/	+	+	+	+
Gélatine	-	+	-	-	+	-	+	-	/	/	+	+	-	-

### 2.1.4. Analyse statistique

Il existe un résidu suspect. Il s'agit de la cinquième répétition d'*Actinidia eriantha* 68-2.

Le facteur espèce/variété à un effet significatif sur l'indice final de sensibilité attribué. En effet la valeur p est inférieure au seuil  $\alpha$  de 0,005 (tab. 16). On rejette ainsi l'hypothèse nulle  $H_0$  d'égalité des moyennes.

La variation entre les traitements est 8,372 fois plus grande que la variation résiduelle. On estime ainsi que le modèle statistique permet d'expliquer une partie de la variance.

Le test de Newman Keuls à 5% permet de former 11 groupes pour lesquels les moyennes sont considérées comme significativement différentes (fig. 44). On note ainsi que 3 espèces/variétés (*A. eriantha* '68-2', *A. chinensis* '13-04' et '13-11') se distinguent par une grande sensibilité à l'agent pathogène et qu'au contraire des espèces/variétés telles qu'*A. melanandra* 'W35', *A. giraldi* 'W36' ou encore *A. rubricaulis* 'W46' présentent une tolérance importante à *Psa*. La variété témoin inoculée à l'eau est seule dans un groupe pour lequel la moyenne est significativement inférieure et différente des autres.

Les données de l'analyse par espèce/variété sont en annexe (annexe X).

La puissance à postériori de l'essai est très forte. Elle est de 99 % au seuil de 5 %.



## 2.2. Deuxième test

### 2.2.1. Contrôle de la concentration bactérienne de l'inoculum

**Tableau 17** : Nombre moyen de colonies dénombrées suite aux étalements des différentes dilutions de la suspension bactérienne ayant servi à l'inoculation lors du second test.

Concentration supposée de la solution étalée (cfu/ml)	Nombre moyen de colonies dénombrées
$10^4$	Tapis bactérien
$10^3$	50
$10^2$	7
$10^1$	1
$10^0$ à $10^{-3}$	0

Bien que le facteur de dilution ne soit pas de 10 comme attendu, il y a un effet des dilutions sur le nombre de colonies présentes. L'absence de colonies sur les boîtes correspondant aux étalements des solutions supposées ne contenir aucune bactérie ( $10^0$  à  $10^{-3}$ ) est effective (tab. 17).

On estime que la concentration effective de l'inoculum était d'environ  $6,0 \cdot 10^6$  cfu/ml.

### 2.2.2. Résultats des mesures et observations

La moyenne des nécroses par rameau de chaque espèce/variété et l'indice y correspondant sont présentés en annexe (annexe XI). De même, le suintement moyen par rameau de chaque espèce/variété et la valeur de l'indice y correspondant sont présentés en annexe (annexe XII).

Le rameau de la quatrième répétition d'*Actinidia deliciosa* Hayward est mort durant la durée de l'essai, ainsi la valeur prise en compte est une estimation.

### 2.2.3. Ré-isolements de *Psa*

Suite aux prélèvements de suintements, 7 colonies ont pu être identifiées comme des colonies de *Psa* (en violet) et 5 comme des colonies de *P. fluorescens* (en bleu) (tab. 18).

Aucune colonie n'est présente sur la boîte correspondant à l'échantillon 15B

**Tableau 18** : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine, menés sur les 32 colonies isolées des 15 prélèvements de suintement sur rameau réalisés lors du second test de sensibilité variétale.

	2D		3D			4C			6A			7A		9C		10E	
	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	1	2
Fluorescence	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non
Oxydase	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Esculine	-	-	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-
Levane-sucrose	+	+	/	/	/	+	+	+	+	+	+	+	+	/	/	+	+
Gélatine	-	-	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-

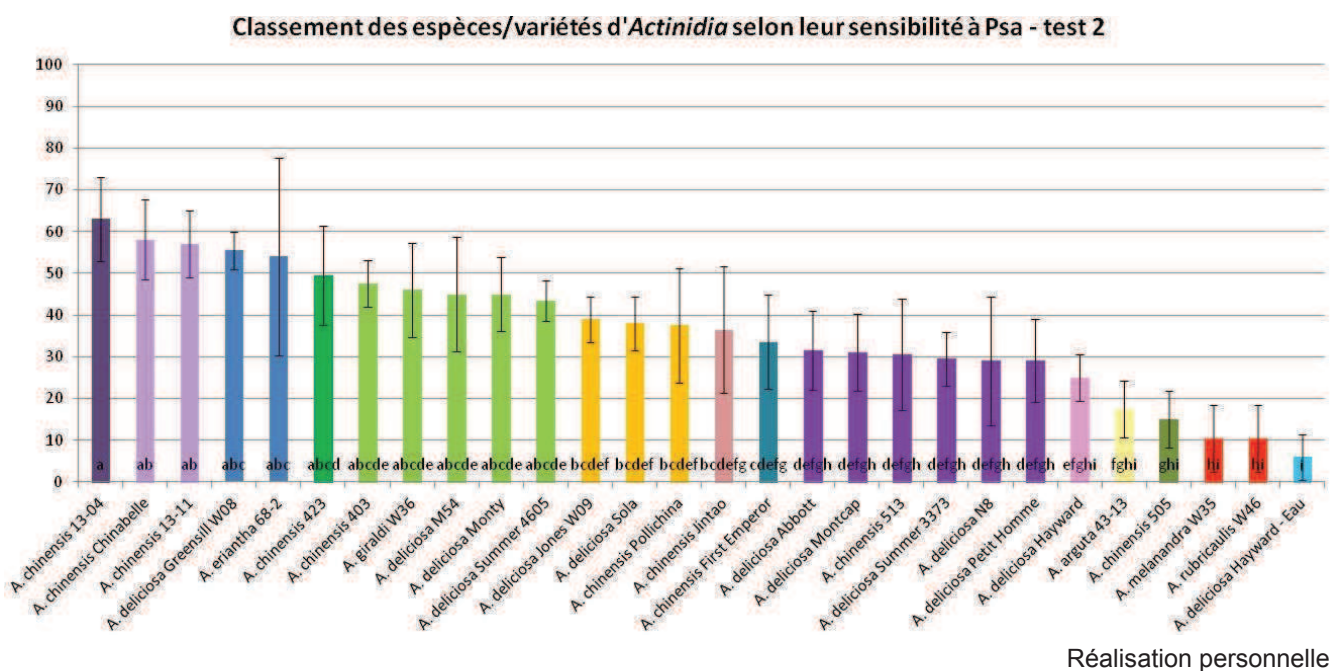
  

	12D		15B	16B			17C		19D		21A		24E		27C	
	1	2		1	2	3	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Fluorescence	Non	Non	/	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Oxydase	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Levane-sucrose	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gélatine	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Tableau 20** : Données fournies par une analyse de variance (ANOVA) à un facteur, effectuée avec les valeurs des indices généraux (note sur 100) attribués à chacun des rameaux lors du second test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia* sp. à *Psa*.

Variance	Degré de liberté	Carré Moyen	Test F	Proba
<b>Totale</b>	139	315,690		
<b>Facteur espèce/variété</b>	27	1172,624	10,747	0,000
<b>Résiduelle</b>	112	109,107		



**Figure 45** : Graphique présentant l'ensemble des espèces/variétés utilisées dans le second test de sensibilité variétale des espèces/variétés d'*Actinidia* sp. à *Psa*. Chaque espèce/variété est classée dans l'ordre décroissant de la valeur de son indice de sensibilité variétale moyen. Les barres d'erreur représentent l'écart-type moyen. Les lettres et couleurs identifient les groupes ayant une moyenne homogène (test de Newman Keuls à 5%).

Aucun prélèvement n'a pu être réalisé sur le rameau 3D car il était très fortement recouvert de mycéliums (tab. 19).

Suite aux prélèvements de tissus, 27 colonies ont pu être identifiées comme des colonies de *Psa* (en violet) et 5 comme des colonies de *P. fluorescens* (en bleu). Les colonies nommées 9C (1) et 21A (1) nous pas pu être identifiées par les tests réalisés (en marron).

**Tableau 19** : Tableau regroupant les résultats obtenus aux tests biochimiques suivants : fluorescence sur milieu King B, oxydase, esculine, levane-sucrose et gélatine, menés sur les 34 colonies isolées des 14 prélèvements de tissus réalisés sur rameaux lors du second test de sensibilité variétale.

	2D		4C		6A		7A			9C			10E			12D		
	1	2	1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Fluorescence	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Oxydase	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	/	-	-	-	-	-	-	/	+	/	/	-	-	-	-	-	-
Levane-sucrose	+	/	+	+	+	+	+	+	/	+	/	/	+	+	+	+	+	+
Gélatine	-	/	-	-	-	-	-	-	/	-	/	/	-	-	-	-	-	-

	15B		16B		17C		19D		21A			24E		27C		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	3	1	2	1	2	3
Fluorescence	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Esculine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-
Levane-sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+
Gélatine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	/	-	-	-	-	-	-

#### 2.2.4. Analyse statistique

Il existe un résidu suspect. Il s'agit de la cinquième répétition d'*Actinidia eriantha* 68-2.

Toutes les hypothèses de l'analyse de variance sont respectées.

La valeur p est inférieure au seuil  $\alpha$  de 0,005 (tab. 20). On rejette ainsi l'hypothèse nulle  $H_0$  d'égalité des moyennes. On peut donc conclure que le facteur espèce/variété a un effet significatif sur l'indice final de sensibilité attribué

La variation entre les traitements est 10,747 fois plus grande que la variation résiduelle. On estime ainsi que le modèle permet d'expliquer une grande partie de la variance.

Le test de Newman Keuls à 5% permet de former 14 groupes (fig. 45) pour lesquels les moyennes sont considérées comme significativement différentes. On note ainsi que 3 espèces/variétés d'*A. chinensis* ('13-04', 'Chinabelle' et '13-11') se distinguent par une grande sensibilité à l'agent pathogène et qu'au contraire des espèces/variétés telles que l'*A. melanandra* 'W35' et l'*A. rubricaulis* 'W46' présentent une tolérance importante à *Psa*. La variété témoin inoculée à l'eau est seule dans un groupe pour lequel la moyenne est significativement inférieure et différente des autres.

Les données de l'analyse par espèce/variété sont en annexe (annexe XIII).

La puissance à postériori de l'essai est très forte. Elle est de 99 % au seuil de 5 %.



# Quatrième partie : discussion

---

## 1. Etapes d'élaboration du test

### 1.1. Courbe de densité optique en fonction de la concentration bactérienne de la suspension

L'établissement d'une courbe de référence de la densité optique en fonction de la concentration bactérienne d'une suspension est une technique qui s'est largement répandue en laboratoire et qui a semblé judicieuse dans un cas comme le nôtre, où l'on souhaite pouvoir répéter l'ensemble des manipulations de la façon la plus uniforme possible.

Bien qu'une courbe ait pu être tracée, sa validation n'est pas possible au vu des résultats obtenus lors des manipulations visant à confirmer la corrélation entre la densité optique et la concentration bactérienne de la solution. En effet, le nombre de colonies dénombrées présente de grandes incohérences et irrégularités car ces nombres ne suivent pas les dilutions effectuées, et les colonies sont réparties de façon non uniforme sur les boîtes ou présentent des aspects non typiques de colonies de *Psa*.

Plusieurs éléments de méthodologie peuvent être remis en cause.

D'une part, la préparation de la solution bactérienne ne permet pas d'obtenir une solution homogène, ce que nous avons facilement pu observer à l'œil nu. De la sorte, le changement de méthodologie de préparation de la solution bactérienne entre la réalisation de la première et de la seconde courbe laisse penser que l'étape de centrifugation a permis de collecter uniquement les bactéries en les séparant au maximum des résidus du milieu de culture, et donc d'améliorer la corrélation entre la densité optique et la concentration bactérienne de la solution. Toutefois, un nouveau problème apparaît, sans doute lié à la centrifugation, car après des étalements on observe que les bactéries restent parfois comme agglutinées entre elles en une zone de la boîte de Petri.

En conséquence, pour améliorer la méthodologie actuelle et notamment tenter de résoudre ce problème d'agglutinement des bactéries, une réflexion peut être apportée sur plusieurs éléments. Amandine Cunty<sup>1</sup>, se demande si la température de l'eau utilisée pour les dilutions pourrait être susceptible d'entraîner la formation de biofilms et donc être à l'origine du regroupement des bactéries. De même, elle propose d'ajouter un temps de repos de la solution après centrifugation pour observer si cela a un effet sur l'agglomération des cellules. Cindy Morris<sup>2</sup> propose quant à elle l'addition d'un surfactant, par exemple de la protéose peptone à 1 g/l, lors de la préparation de la solution. Cela pourrait permettre de résoudre l'agglomération des bactéries en solution et lors des étalements. Pour cette dernière hypothèse, il faudra toutefois prendre le soin de vérifier que l'adjuvant choisi n'ait pas d'impact sur la bactérie elle-même et sur le test de sensibilité variétale établi.

D'autre part, il est admis que seules les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies doivent être utilisées pour le dénombrement des colonies et la construction de la courbe qui en dépend pour que les données soient statistiquement significatives. Pourtant, suite aux difficultés rencontrées lors des dénombrements, la première courbe a été construite avec un nombre moyen de 415 colonies et la seconde avec un nombre moyen de 30 (dont seulement 27 colonies sur l'une des boîtes).

---

<sup>1</sup> Amandine Cunty : Chef de projet technique et scientifique à l'Anses (Angers). Communication personnelle, 3 août 2012.

<sup>2</sup> Cindy Morris : Directrice de l'Unité de Recherche en Pathologie Végétale à l'INRA (Avignon). Communication personnelle, 2 août 2012.



De plus, un problème fondamental vient remettre en cause la méthode utilisée et notamment la standardisation des mesures de densité optique afin de déterminer la concentration de suspensions bactériennes. En effet, Spaun J. (Spaun, 1962) recommande d'éviter de déterminer cette concentration par opacimétrie car il a été démontré que la loi de Beer-Lambert, qui établit un rapport rectiligne entre l'opacité et la concentration du matériel en suspension, n'est valable que pour certaines concentrations. Par exemple, on estime ainsi que pour une suspension bactérienne de *Staphylococcus aureus*, la méthode n'est plus fiable au-delà d'une concentration à  $10^9$  cfu/ml, conduisant ainsi à une sous-estimation de la concentration bactérienne (Spaun, 1962). De la sorte, des doutes persistent sur la pertinence de la méthode choisie pour déterminer la concentration bactérienne de la suspension, notamment dans un contexte où encore peu de chercheurs en ont fait l'expérience avec *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.

Pour la poursuite des essais il faudra donc se poser la question de savoir si la détermination d'une telle courbe est essentielle, ou si l'on peut se contenter d'une approximation de la concentration à l'œil nu, comme cela est encore pratiqué dans plusieurs laboratoires, pour ensuite estimer la concentration bactérienne de la suspension par un dénombrement sur boîte de Petri. Il semble d'ailleurs que ce soit la méthodologie adoptée par l'institut néo-zélandais, Plant and Food Research (Mauchline *et al.*, 2012).

## 1.2. Détermination de la concentration et du mode d'inoculation à adopter

Toujours dans le but de mettre au point un test de la sensibilité variétale d'*Actinidia sp.* à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, nous cherchons à déterminer les conditions de réalisation du test et notamment à identifier le mode d'inoculation et la concentration de l'inoculum à utiliser, afin d'obtenir des résultats suffisamment visibles et en adéquation avec l'échelle de notation néo-zélandaise. En effet, dans l'optique d'une collaboration future avec la filière kiwi néo-zélandaise, il apparaît judicieux de reprendre leur système de notation des sensibilités variétales observées au laboratoire.

Bien que *Psa* soit capable de pénétrer l'écorce via les ouvertures naturelles (lenticelles), il pénètre aussi par les blessures et ce, de façon plus rapide en diminuant sa phase de vie épiphyte. Ainsi, pour réduire la durée de l'essai le choix a été fait de tester deux types de blessure, puis de choisir celle dont les résultats présenteraient la meilleure adéquation avec les objectifs du test final.

Ainsi, une blessure à l'aiguille (piqûre) et une incision au scalpel ont été testées. En effet, il a pu être mis en évidence que les piqûres, telles que celles causées par la ponte de *Cicada sp.*, sont un facteur aggravant la contamination par *Psa* (Tyson *et al.*, 2012). D'autre part, les inoculations réalisées suite à une piqûre à l'aiguille sont communément pratiquées. On les utilise par exemple lors de tests de pathogénicité de *P. syringae* pv. *syringae* sur olivier (Ashorpour *et al.*, 2008). De même, les blessures infligées à l'écorce sont un facteur facilitant la pénétration de *Psa* dans la plante hôte (Zespri group Limited, 2009), et des pratiques d'incision de l'écorce sont courantes dans les tests de pathogénicité. Cette méthode a également déjà été utilisée dans des estimations de la sensibilité variétale de *Prunus persicae* (pêcher) au *P. syringae* pv. *persicae* (Gaignard *et al.*, 1993).

Dans la pratique deux concentrations sont généralement utilisées lors des essais de sensibilité variétale, toutefois l'importante quantité de matériel végétal qui sera manipulée lors des tests de sensibilité variétale nous contraint pour le moment à définir une seule concentration d'inoculum à appliquer. Ainsi, trois concentrations ont été testées, à savoir  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^9$  cfu/ml, qui sont dans la gamme des concentrations fréquemment utilisées.



Concernant l'essai où la blessure est celle réalisée à l'aiguille, les conclusions tirées après l'analyse statistique des résultats ne sont pas satisfaisantes pour plusieurs raisons :

- les erreurs entre les données et les valeurs prédites sont importantes. En effet, il existe des résidus suspects et la condition de distribution des résidus suivant une loi normale n'est pas respectée.
- la puissance de l'essai est très faible et la valeur du test de Fisher ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle d'égalité des variances. Ainsi, s'il existe un effet de la concentration de l'inoculum sur la taille des nécroses, l'essai avait peu de chance de le mettre en avant, et l'on ne peut réellement conclure à une absence de significativité des traitements.

Les conclusions tirées suite à l'analyse statistique des résultats obtenus lorsque la blessure de l'écorce est une incision au scalpel, sont bien plus satisfaisantes et valident la méthode. En effet, les conditions de l'analyse de variance sont respectées et le rejet de l'hypothèse nulle ( $H_0$ ) nous permet de considérer qu'avec ce type de blessure le facteur concentration de l'inoculum a un effet significatif sur la taille des nécroses. De plus, la très forte puissance à posteriori de l'essai vient conforter l'affirmation précédente.

En conséquence des analyses statistiques pratiquées, il a été choisi de réaliser les inoculations suite à une incision de l'écorce au scalpel. Ce mode de blessure présente également l'avantage pratique d'être moins délicat à mettre en œuvre. En effet, la blessure causée par l'aiguille est très peu visible à l'œil nu, ce qui crée un risque de déposer la goutte d'inoculum à côté de la blessure, alors que les incisions au scalpel restent majoritairement facilement repérables.

Si le choix du mode de blessure est relativement peu discutable au regard des analyses statistiques, la difficulté se situe au niveau du choix de la concentration de l'inoculum. En effet, il faut rappeler que pour des raisons logistiques cet essai a été mené exclusivement sur des rameaux d'*Actinidia deliciosa* 'Hayward', variété pour laquelle la disponibilité en matériel végétal est plus grande, mais aussi une variété connue comme ayant une sensibilité modérée à la maladie. Ainsi, puisqu'il n'existe pas de références scientifiques sur ce sujet précis, le raisonnement qui suit est basé sur des présomptions du comportement des autres espèces/variétés face à l'infection bactérienne. Toutefois, seuls le comportement des rameaux et l'importance du développement des symptômes lors de la réalisation du premier test de sensibilité variétale, pourront nous permettre de savoir si le choix fait concernant la concentration de l'inoculum était adapté ou non. Le raisonnement a donc été le suivant :

Puisque nous avons pu observer les résultats sur une variété connue comme peu sensible à *Psa*, il a suffi d'envisager le comportement des variétés à plus haute sensibilité. Ainsi, on peut penser que si une concentration élevée de *Psa* entraîne une très forte réaction de sensibilité sur l'*Actinidia deliciosa* 'Hayward', l'interprétation pour les variétés sensibles sera difficile ; entre autre de par un manque de concordance avec l'échelle de notation. De même, une « invisibilité » de la réaction de sensibilité chez l'*A. deliciosa* 'Hayward' avec une concentration bactérienne plus faible sera problématique.

D'un point de vue plus appliqué, il a été considéré qu'étant donné que les nécroses obtenues suite à l'inoculation avec une solution à  $10^5$  cfu/ml sont parfois trop faibles et correspondent à la taille de la lame du scalpel, le choix de cette concentration n'était pas adapté. En effet, nous ne pourrions pas interpréter les résultats du test dans le cas où nous serions amenés à tester des variétés encore moins sensibles que la variété 'Hayward'.

D'autre part, nous sommes en possession de variétés connues pour leur sensibilité marquée à *Psa* et comme de plus la souche utilisée pour nos essais appartient au groupe des souches





virulentes, nous devons envisager la possibilité de réactions de sensibilité très marquées. Ainsi, l'inoculation avec une solution de  $10^9$  cfu/ml est écartée, car une trop forte taille des lésions pourrait entraîner leur superposition sur le rameau, d'où une impossibilité de lecture.

Le choix s'est donc porté sur une inoculation avec une concentration bactérienne de  $10^7$  cfu/ml. Malgré un aspect un peu aléatoire de cette décision, cette dernière est tout de même confortée par les données statistiques, car c'est avec cette concentration d'inoculum que l'écart type des nécroses mesurées au sein d'une espèce/variété est le plus faible. Par contre, un élément de méthodologie peut être critiqué. En effet, aucun dénombrement sur boîte de Petri n'a été effectué suite à ces deux essais. Au vu des difficultés rencontrées dans l'établissement d'une courbe de densité optique en fonction de la concentration bactérienne de la suspension, et bien que l'intensité des symptômes varie selon la concentration de l'inoculum, nous ne pouvons affirmer que les concentrations que nous avons souhaité tester ont été celles effectives.

En Nouvelle-Zélande, l'institut de recherche Plant and Food, a conduit des essais visant à déterminer si le test de sensibilité variétale qu'ils ont mis au point permet de mettre en évidence des différences de sensibilité variétale à la maladie à partir de rameaux provenant de vergers aux conduites agronomiques différentes. Dans ces essais, deux concentrations bactériennes de la solution ont été utilisées pour l'inoculation. A savoir, une faible et une forte concentration, soit respectivement  $10^6$  et  $10^9$  cfu/ml. L'inoculation a été chaque fois conduite après une incision de l'écorce au scalpel (Mauchline *et al.*, 2012).

### 1.3.Choix d'une procédure de désinfection des rameaux

Dans les essais de détermination du type de blessure à réaliser et de concentration de l'inoculum précédemment réalisés, nous avons procédé à une simple désinfection par trempage bref des portions de rameaux dans un bain d'éthanol à 70%. Seulement, ce mode de désinfection s'est révélé insuffisant au vu de l'importance et de la diversité des organismes fongiques qui se sont développés en l'espace de quelques jours à la surface des rameaux. C'est donc en vue d'identifier les organismes fongiques présents sur les rameaux et dans le laboratoire, mais également pour évaluer les possibilités de désinfection avec différentes substances que plusieurs manipulations ont été conduites.

L'identification des champignons présents sur les rameaux avait pour but principal de pouvoir écarter tout risque qu'un de ces organismes soit un agent de chancre. En effet, sa présence pourrait entraîner la formation de nécroses susceptibles d'être considérées comme causées par *Psa*. Ce biais possible a été écarté car les 5 organismes fongiques identifiés, à savoir, *Alternaria sp.*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp.*, *Epicoccum nigrum* et *Fusarium sp.*, ne sont pas considérés comme des agents de chancre. Sur kiwi, il s'agit d'organismes saphrophytes.

Parmi, les différentes substances aux propriétés désinfectantes testées, les modalités « thiabendazole » et « eau de Javel » ne présentent pas un résultat satisfaisant dans les conditions testées. En effet, l'altération des cellules épidermiques superficielles n'est pas acceptable. Ainsi, pour une nouvelle investigation de l'utilisation de ces deux substances dans la désinfection des rameaux, plusieurs paramètres tels que les concentrations de la substance active, le temps de trempage, le nombre de rinçage et l'essuyage des rameaux sont à revoir.

Le thiabendazole est une matière active fongicide homologuée pour le traitement par trempage de certains produits récoltés, tels que la pomme ou la banane, ou bien encore pour le



traitement par pulvérisation des organes aériens chez les plants de pomme de terre (Couteux & Lejeune, 2011). Toutefois, les rameaux de kiwi ce sont mal comportés après ce traitement. De plus, cette substance ne semble pas adaptée aux besoins de désinfection que nous avons car *Alternaria sp.*, genre identifié sur les rameaux, est résistant à cette molécule (Maouni *et al.*, 2002), justifiant ainsi sa présence sur les rameaux après désinfection.

Le protocole de désinfection à l'eau de Javel que nous avons utilisé suit les pratiques courantes en termes de désinfection des greffons de kiwi. Toutefois, dans notre cas, le suivi de ce protocole a entraîné la mort des cellules épidermiques superficielles et la présence de petits résidus cristallins à la surface des rameaux. L'explication principale se trouve sans doute au niveau d'un rinçage insuffisamment abondant. Dans plusieurs essais pratiqués sur rameaux détachés la désinfection est tout de même effectuée grâce à une solution d'hypochlorite de sodium, mais avec des concentrations moindres. Par exemple, des rameaux d'olivier ont été désinfectés par un trempage de 10 minutes dans une solution à 0,85 % avant un essai de pathogénicité de *P. syringae* pv. *syringae* sans qu'aucun dégât causé au matériel végétal ne soit reporté (Ashorpour *et al.*, 2008).

La modalité « éthanol 70 % » a montré une meilleure efficacité que lors des précédents essais, que l'on peut expliquer par l'augmentation du temps de trempage à 10 minutes au lieu de quelques instants. De plus, il semble visuellement y avoir un effet de réduction du nombre de champignons présents à la surface des rameaux par rapport au témoin eau.

L'expérience acquise lors des essais précédents nous montre que le développement des champignons à la surface des rameaux est apparemment sans incidence sur les résultats d'essai. Ainsi, la modalité de désinfection qui est retenue pour la suite des essais est celle d'un trempage de 10 minutes dans un bain d'éthanol à 70 %, suivi d'une succession de 2 rinçages dans des bains d'eau déminéralisée stérile. De plus, dans un contexte où les interactions entre les organismes naturellement présents à la surface du rameau et *Psa* ne sont pas encore connues, il n'apparaît pas judicieux de chercher à tout prix à les éliminer. Les différentes investigations qui sont en train de se mettre en place sur ce sujet, notamment dans le cadre du dossier Casdar précédemment évoqué, pourront par la suite nous renseigner sur une nouvelle démarche de désinfection à adopter.

Les résultats des prélèvements d'air nous ont permis de tirer une autre conclusion et d'adapter la phase de séchage du matériel végétal. En effet, bien que la quantité de spores présentes dans l'atmosphère ne soit pas anormalement élevée, plusieurs des champignons présents dans l'air ambiant du laboratoire correspondent à ceux identifiés sur les rameaux. On peut donc conclure à une possible contamination des rameaux lors des manipulations effectuées après désinfection, puisque ces dernières ne sont pas réalisées sous atmosphère stérile. L'exposition des rameaux au contact de l'air du laboratoire sera donc limitée au maximum.

Ainsi, pour les essais qui ont suivi, les rameaux ont été séchés au papier absorbant stérile et non plus séchés à l'air libre. De plus, nous chercherons encore à minimiser la durée, le degré et la fréquence d'ouverture des boîtes.

## **2. Test de sensibilité variétale défini**

*Pour ce chapitre, plusieurs aspects sont à discuter. Dans un premier temps, nous aborderons certains choix effectués au niveau du matériel et méthode qu'il reste encore à justifier. Nous en viendrons ensuite à mener une discussion autour des résultats obtenus aux deux tests de sensibilité variétale effectués.*



## 2.1. Choix méthodologiques

### 2.1.1. Matériel végétal et préparation des rameaux

Nous avons pu lire dans la bibliographie qu'une différence en termes de sensibilité à *Psa*, entre les différentes espèces et variétés, est couramment observée dans la nature. Au même titre les plants mâles présentent une plus grande sensibilité que les plants femelles ([2]). Aussi, l'utilisation d'espèces et variétés dont la sexualité et les origines diffèrent est d'un intérêt majeur pour cette phase de mise au point du test.

De la sorte, nous avons utilisé les différentes espèces et variétés présentes dans le verger du centre. Cette collection se compose de plants mâles, femelles ou auto-fertiles, d'espèces mineures, notamment issues du continent Asiatique, mais également de croisements variétaux effectués sur le centre ou bien encore de variétés phares de la production française de kiwis.

En termes de préparation des rameaux, il est à noter que l'ajout d'une étape de retour en chambre réfrigérée entre la sélection des portions de rameau et de leur parage, n'est pas indispensable et n'a été appliquée ici, que pour des raisons de logistique étant donné la quantité importante de matériel végétal manipulé.

Par ailleurs, chaque extrémité de rameau a été recouverte d'une pellicule de paraffine dans le but de limiter la dessiccation des rameaux, notamment suite au passage prolongé en chambre réfrigérée. Cette méthode fût utilisée dans le cadre d'essais de pathogénicité de *Phytophthora persiana* sur portions de tiges de diverses espèces fruitières (Hajebrahimi & Banhashemi, 2011). Il est également possible de conserver les rameaux dans l'eau pendant la durée de l'expérience (Montesinos & Vilardell, 1991) ou bien encore dans du sable maintenu humide. Toutefois, au regard de l'espace nécessaire, la conservation des rameaux à l'horizontale est préférable. De plus, la physiologie des rameaux de kiwis permet leur maintien dans de bonnes conditions physiologiques pendant la courte durée que représente le test.

### 2.1.2. Dispositif expérimental

Le besoin de maintien de l'humidité pendant la période d'incubation et la grande quantité de matériel végétal nous ont conduits à réaliser les essais dans des boîtes empilables à couvercle. Toutefois, le format des boîtes dont nous disposons (23 x 23 cm) pour la réalisation des tests de sensibilité variétale, ne permet pas d'y placer l'intégralité des rameaux d'une répétition et donc de construire un dispositif en bloc.

L'absence d'effet bloc lors des essais de détermination du mode de blessure et de la concentration de l'inoculum à adopter, nous donne une indication, mais nous ne pouvons affirmer que les résultats n'aient pas été influencés par un effet « boîte ».

Le dispositif actuellement adopté en Nouvelle-Zélande, lors des premiers tests de sensibilité variétale, semble être le même que celui que nous avons utilisé ici (Mauchline *et al.*, 2012). La principale différence réside dans la séparation des rameaux entre eux et le tapissage du fond de chacune des boîtes. En effet, d'après le protocole néo-zélandais, le fond des boîtes plastiques est recouvert de papier absorbant stérile et les rameaux sont placés les uns à côté des autres (Mauchline *et al.*, 2012). Dans le protocole que nous avons mis en place, les rameaux sont séparés les uns des autres grâce à un système de barquettes en aluminium, tapissées d'une bande de papier filtre. L'intérêt d'isoler chaque rameau est double. D'une part, cela permet d'assurer que la solution bactérienne ne soit pas transmise d'un rameau à l'autre si elle venait à couler. Et d'autre part, de limiter la propagation d'éventuels mycéliums entre les rameaux de la boîte.



### 2.1.3. Incubation : conditions et durée

Les conditions d'incubation ont été choisies en fonction de plusieurs critères.

Le maintien d'une humidité élevée dans chacune des boîtes est un élément indispensable, car il a été montré que des conditions climatiques humides peuvent grandement favoriser la multiplication de la bactérie. A l'inverse, son développement est ralenti lors de conditions sèches atmosphériques (Scortichini *et al.*, 2012).

Dans la mise au point de ce test nous ne nous sommes pas attachés aux conditions de luminosité dans lesquelles sont placés les rameaux. Toutefois, le maintien à l'obscurité de la chambre climatique a permis de ralentir la croissance et le développement des jeunes pousses lors du débourrement de certains bourgeons en cours de test.

La condition la plus délicate à fixer est la température. En effet, les températures printanières comprises entre 12 et 18°C sont connues comme optimales au développement de la bactérie en conditions naturelles au verger (Scortichini *et al.*, 2012). Mais qu'en est-il en conditions artificielles ? Les tests de pathogénicité de souches bactériennes de *Psa* isolées en Turquie sur *Actinidia deliciosa* 'Hayward', ont été conduits dans des conditions de température de 22-25°C (Bastas & Karakaya, 2012). Toutefois, les températures supérieures à 25°C sont connues pour réduire la multiplication de la bactérie (Scortichini *et al.*, 2012). De la sorte, la température définie pour le test de sensibilité variétale est de 22°C. Valeur qui devrait permettre une multiplication active de la bactérie à la surface des rameaux. C'est sans doute par un raisonnement similaire que l'application de températures de l'ordre de 20-23°C a été décidée dans le cadre d'essais de sensibilité variétale menés en Nouvelle-Zélande (Mauchline *et al.*, 2012).

La durée d'incubation est fixée à 19 jours, puis à 24 heures pour l'observation du degré suintement, comme pratiquée en Nouvelle-Zélande par le Plant and Food Research Institute (Mauchline *et al.*, 2012).

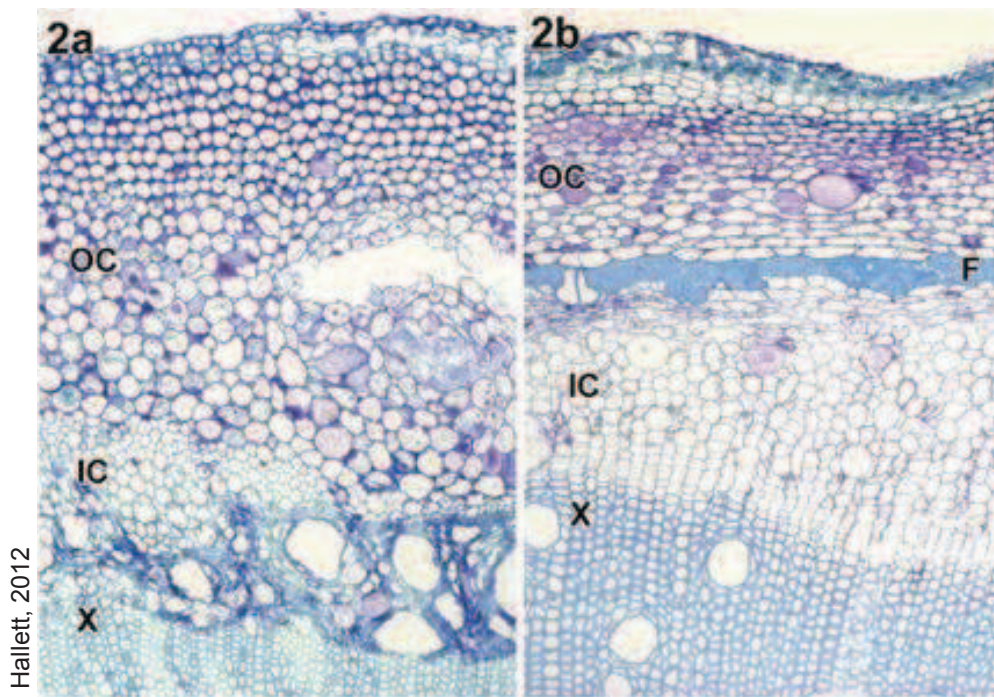
### 2.1.4. Mesures et observations des résultats

Les mesures et observations effectuées ont été choisies pour leur bonne adéquation avec l'écologie de la bactérie et leur correspondance avec le « woody stem bioassay index » mis en place par un groupe de recherche néo-zélandais ([14]). En effet, comme précédemment évoqué, il paraît judicieux de tendre au maximum à se rapprocher du système de notation mis au point par ces chercheurs, car cela pourrait permettre de faciliter d'éventuels futurs échanges.

Pour l'élaboration de notre système de notation, nous ne disposons que du tableau de correspondance entre la mesure de la nécrose et la note sur 50 points y correspondant. Il en est de même pour la correspondance entre la note de suintement attribuée, avec la difficulté supplémentaire que nous ne connaissons pas à quel type de symptôme chacune des notes néo-zélandaise correspond, puisqu'il s'agit d'une observation et non d'une mesure. Ce sont donc les observations que nous avons faites sur les deux premiers essais (type de blessure à réaliser et concentration de l'inoculum) qui ont permis de définir les critères relatifs à la notation de l'intensité de suintement.

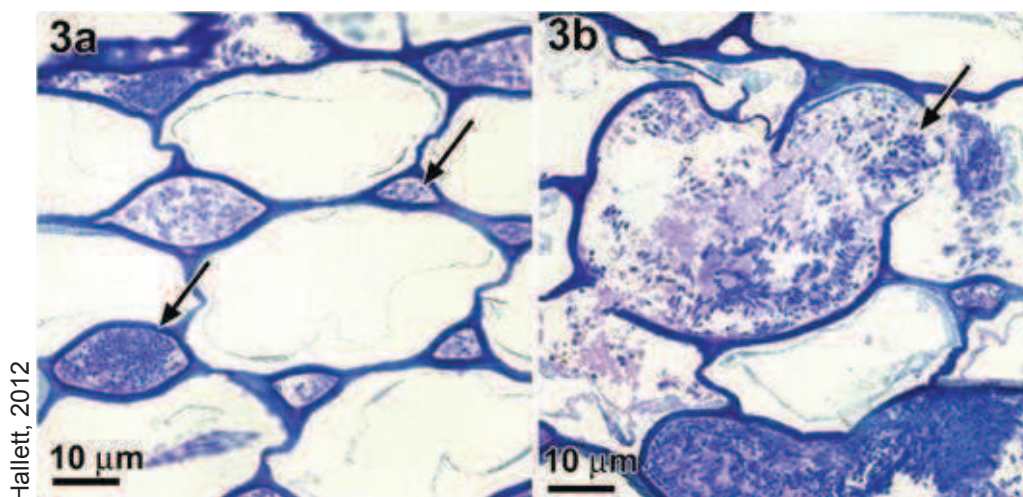
La profondeur jusqu'à laquelle les tissus végétaux doivent être coupés en fin de test pour pratiquer les mesures et observations a été déterminée selon les résultats de recherches menées sur l'observation microscopique de la progression d'une souche *Psa-V* au sein de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' (Hallett, 2012). Ces résultats nous informent que chaque fois que des bactéries ont pu être observées, elles étaient localisées proche de l'épiderme, au niveau du parenchyme cortical (fig. 46 a-b). Les bactéries étaient généralement localisées entre les cellules végétales (fig. 47 a), mais elles ont aussi souvent pu être observées à l'intérieur des





Hallett, 2012

**Figure 46** : Coupes transversales de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' infectés par *Psa*. a) jeune rameau fortement infecté, présentant des collapses cellulaires et une colonisation des cellules du collenchyme et du parenchyme. Les vaisseaux ligneux montrent quelques collapses, mais pas de colonisation bactérienne. b) rameau moyennement infecté présentant une forte colonisation bactérienne des cellules du collenchyme et du parenchyme, mais avec seulement quelques destruction de cellules parenchymateuses au niveau des faisceaux libéro-ligneux. OC : Outer Cortex (tissus de soutien) ; F : Fibre (sclérenchyme) ; IC : Inner Cortex (faisceaux libéro-ligneux) ; X : Xylem (xylème).



Hallett, 2012

**Figure 47** : Observation à un fort grossissement de coupes transversales de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' infectés par *Psa*. a) Les bactéries sont uniquement présentes dans les méats intercellulaires (flèche noire) de cellules du parenchyme. b) Les bactéries sont présentes à l'intérieur de cellules du parenchyme dont les parois sont endommagées (flèche noire).

cellules (fig. 47 b). Dans certains cas de très forte infection les bactéries ont été montrées pour avoir pénétré plus profondément la tige, en traversant les cellules des fibres sclérenchymateuses (Hallett, 2012). Ainsi, afin d'assurer une observation des symptômes lorsqu'une infection a eu lieu, le choix le plus approprié a semblé être celui d'effectuer une simple suppression de l'écorce et de l'épiderme afin de mettre à nu les tissus superficiels.

La profondeur jusqu'à laquelle les tissus végétaux doivent être coupés en fin de test pour pratiquer les mesures et observations a été déterminée selon les résultats de recherches menées sur l'observation microscopique de la progression d'une souche *Psa-V* au sein de rameaux d'*Actinidia chinensis* 'Gold 3' (Hallett, 2012). Ces résultats nous informent que chaque fois que des bactéries ont pu être observées, elles étaient localisées proche de l'épiderme, au niveau du parenchyme cortical (fig. 46 a-b). Les bactéries étaient généralement localisées entre les cellules végétales (fig. 47 a), mais elles ont aussi souvent pu être observées à l'intérieur des cellules (fig. 47 b). Dans certains cas de très forte infection les bactéries ont été montrées pour avoir pénétré plus profondément la tige, en traversant les cellules des fibres sclérenchymateuses (Hallett, 2012). Ainsi, afin d'assurer une observation des symptômes lorsqu'une infection a eu lieu, le choix le plus approprié a semblé être celui d'effectuer une simple suppression de l'écorce et de l'épiderme afin de mettre à nu les tissus superficiels.

## 2.2. Résultats des tests

### 2.2.1. Comparaison entre les deux tests de sensibilité variétale pratiqués

La moyenne générale des valeurs de l'indice de sensibilité variétale est légèrement moins grande au second essai (36,75) qu'au premier (39,20) pouvant entre autres s'expliquer par une concentration bactérienne de l'inoculum moins importante ( $3,2 \times 10^8$  contre  $6,0 \times 10^6$  cfu/ml). Cependant, si l'on regarde au cas par cas les notes moyennes de chacune des variétés, on peut noter que certaines présentent une tendance inverse et que les variations sont d'un petit ordre de grandeur. Nous pouvons cependant nous poser des questions, comme notamment celle de savoir si les variétés ont des réactions différentes les unes des autres en fonction de la concentration bactérienne de l'inoculum ? Et même aborder un sujet tel que l'effet rameau. Est-ce que le diamètre, l'état physiologie, etc. des rameaux vont avoir des influences significatives sur les résultats du test ? Existe-il un effet rameau ? Autant de questions auxquelles d'autres manipulations pourront chercher à répondre.

Des variétés telles que l'*Actinidia eriantha* et l'*A. giraldi* ont présenté un écart-type relativement important, soit entre les différentes mesures réalisées au cours d'un même essai (*A. eriantha*), soit entre la note de sensibilité variétale attribuée entre les deux essais (*A. giraldi*). Pour l'*Actinidia eriantha* la raison de ces écarts s'explique très majoritairement par la physiologie de ces rameaux. En effet, contrairement aux autres espèces/variétés utilisées dans les tests, les rameaux d'*A. eriantha* sont duveteux et se composent d'un bois qui se lignifie peu. Ceci conduit à la dispersion immédiate de la goutte d'inoculum sur toute la surface du rameau, qui ne reste pas « posée » à la surface, comme c'est le cas pour les autres espèces/variétés testées. Ainsi, les symptômes peuvent se développer à distance du point où sont réalisées inoculation, mesure et observation. La variation de sensibilité observée avec l'*Actinidia giraldi* peut sans doute s'expliquer par une moins bonne qualité des rameaux utilisés lors du second essai.

### 2.2.2. Interprétation des tests

En l'absence de références et de recul en termes de connaissance de la sensibilité variétale des espèces et variétés d'*Actinidia*, les résultats obtenus aux tests de sensibilité variétale réalisés doivent être interprétés en utilisant des espèces/variétés indicatrices. C'est-à-dire des espèces/variétés pour lesquelles la sensibilité est connue, notamment grâce à des observations conduites en vergers sur les variétés actuellement cultivées.



Par exemple, les observations reportées dans la bibliographie font état d'une importante sensibilité des variétés issues de l'espèce *chinensis*, et notamment des variétés '13-04' et '13-11' ([2]), et à contrario, l'*Actinidia deliciosa* 'Hayward' présente une sensibilité moindre ([2]). Ces différences ont pu être mises en évidence par les tests. De la sorte, pour l'interprétation des résultats nous pouvons considérer que les variétés qui obtiennent une note de sensibilité variétale supérieure ou même proche de celles des *Actinidia chinensis* '13-04' et '13-11', sont des variétés qui pourront être écartées pour cause d'une sensibilité à *Psa* trop importante. D'autres variétés, et notamment celles présentant des notes égales, mais plutôt inférieures à l'*A. deliciosa* 'Hayward' pourront faire l'objet de tests supplémentaires. Il est également pertinent de s'intéresser aux groupes de moyennes homogènes formés par le test de Newman Keuls à 5% qui nous renseignent sur l'égalité statistique des moyennes.



## Conclusion

---

La bactériose du kiwi, causée par *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, est une maladie pour laquelle nous assistons aujourd'hui à une émergence en France avec explosion des dégâts, et à une propagation importante au niveau mondial. De la sorte, cette maladie met en péril la culture du kiwi dans toutes les zones de production. Ainsi, c'est dans le but de lutter efficacement contre la diffusion de cette maladie et d'en prévenir les dommages, que la recherche et les acteurs de la filière mondiale du kiwi se mobilisent.

Le travail mené au sein du Ctifl avait pour objectif de mettre en place un test de sensibilité variétale d'*Actinidia* sp. à *Psa*, car en effet, les évidentes différences de sensibilités observées entre les espèces et variétés d'*Actinidia* font penser qu'une solution au problème *Psa* se trouve dans le choix de cultiver de nouvelles variétés peu sensibles. Ceci nécessite donc de trouver des sources de résistance au moins partielle (gènes) dans le matériel végétal existant, pour être utilisées dans les programmes de sélection. Aussi, la période de l'année, le besoin de mettre rapidement en œuvre le projet et le fait de travailler en laboratoire confiné pour s'affranchir des risques de contamination de l'environnement extérieur, nous ont conduit à mettre en place un test sur portions de rameaux.

Lors de l'ensemble des travaux réalisés beaucoup d'attention a été portée à la concentration bactérienne des solutions employées pour l'inoculation, toutefois, les résultats obtenus lors des tentatives de réalisation d'une courbe de la densité optique de la solution en fonction de sa concentration bactérienne ne sont pas concluants, et la méthode même utilisée est remise en cause par J. Spaun (Spaun, 1962). En conséquence, pour la poursuite des essais il faudra se poser la question de savoir si la détermination d'une telle courbe est essentielle, ou si l'on peut se satisfaire d'autres techniques.

Toujours dans le but de mettre au point un test de la sensibilité variétale d'*Actinidia* sp. à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, nous avons cherché à déterminer les conditions de réalisation du test et notamment à identifier le mode d'inoculation et la concentration de l'inoculum à utiliser. Le choix fait de réaliser une incision au scalpel et d'inoculer les portions de rameaux avec une suspension bactérienne de  $10^7$  cfu/ml, a permis d'obtenir des symptômes dont l'intensité est en adéquation avec l'échelle de notation adoptée. De la sorte, ces paramètres semblent à conserver.

Bien que les résultats obtenus en termes de désinfection se soient montrés suffisants dans les conditions de l'essai, un travail plus approfondi pourra être mené sur la désinfection des rameaux. On envisagera par exemple, de faire varier les temps de trempage et les concentrations des substances actives utilisées, ou bien même d'utiliser d'autres substances ou systèmes de désinfection. Cependant, comme précédemment évoqué, en l'absence de connaissances suffisantes sur les interactions pouvant exister entre *Psa* et d'autres organismes, il faudra toujours agir en ayant en mémoire cette part d'inconnu. De plus, la méthodologie de désinfection employée a fait ses preuves dans le cadre de nos essais, et notamment donc avec le matériel végétal d'une bonne qualité sanitaire dont nous disposons. Qu'en serait-il si la méthodologie mise en place était appliquée à du matériel végétal ne présentant pas les mêmes qualités sanitaires ?

Le test de sensibilité variétale ainsi mis en place est satisfaisant à l'heure actuelle car il répond aux objectifs qui ont été fixés, à savoir mettre au point un test permettant de passer en revue une grande quantité de matériel végétal et d'obtenir un classement des espèces/variétés en fonction de leur capacité à résister à une infection de *Psa*. Malgré des résultats plutôt encourageants, il convient néanmoins de rester vigilant vis-à-vis des conclusions à tirer de cette étude car nous avons vu que certains points restent à réétudier. De même, le test devra encore être répété plusieurs fois pour vérifier la répétitivité des classements obtenus.



Le travail d'élaboration d'un test de sensibilité variétale d'*Actinidia sp.* à *Psa*, réalisé au sein du Ctifl est plutôt prometteur, mais il convient tout de même de nuancer certains points au regard des limites de l'étude.

Le travail réalisé a été conduit avec une seule souche bactérienne, alors qu'il conviendrait de pratiquer les tests avec des souches différentes. Toutefois, à ce stade des connaissances épidémiologiques et génétiques sur la bactérie, il est encore difficile de juger des biais que l'utilisation d'une seule et même souche peut avoir sur les résultats du test. Une fois que les souches présentes sur le territoire national auront été identifiées et caractérisées, il s'avérera intéressant de répéter les tests avec des souches de référence choisies comme représentatives des groupes génétiques, si ceux-ci ont été mis en évidence par les études phylogénétiques à venir.

La méthode d'analyse des résultats, calquée sur celle mise en place en Nouvelle-Zélande, est intéressante. En effet, la comparaison statistique des résultats n'est significative que grâce à l'utilisation des valeurs de l'indice de sensibilité variétale établi. Toutefois, il est regrettable de ne pas connaître les raisons exactes qui ont été à l'origine de ce système de notation, ainsi que la façon dont il a été construit.

Les perspectives d'amélioration du test sont étroitement liées aux découvertes et connaissances qui vont être apportées sur la bactérie. En effet, les connaissances supplémentaires dans certains domaines permettront d'ajuster le test et de prendre en compte de nouveaux paramètres. De plus, le recul des années et l'acquisition de références en termes de connaissance de la sensibilité variétale des espèces et variétés d'*Actinidia*, permettront d'établir des points de repères variétaux, et d'ainsi faciliter l'interprétation des résultats.

Il est également important de garder à l'esprit qu'un test biologique réalisé en laboratoire est seulement un indicateur de la façon dont l'hôte peut répondre à l'infection bactérienne et ne prédit pas nécessairement le comportement des plants au verger, et ce d'autant plus que *Psa* est capable d'infecter sa plante hôte par différentes voies et organes. Par conséquent, il sera très certainement nécessaire de mettre au point d'autres tests pratiqués sur différents types de tissus et de matériel végétal. Mais également de combiner les résultats de ces tests avec des observations de terrain, pour vérifier s'il existe une corrélation avec les tests en conditions contrôlées, et éventuellement de mettre en évidence les autres paramètres pouvant modifier l'expression des symptômes et de la sensibilité à l'infection.





## Bibliographie

---

- Ashorpour M. *et al.* (2008). Bacterial canker of olives caused by of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. *Scientia Horticulturae*, 118, pp. 128–131.
- Balestra G.M. *et al.* (2009). Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australian plant disease notes*, 4, pp. 34-36.
- Balestra G.M. *et al.* (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New diseases report*, 22, 10, 1 p.
- Balestra G.M. *et al.* (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* on kiwifruit plants in Spain. *New diseases report*, 24, 10, 1 p.
- Bashan Y. *et al.* (1985). Morphology of leaf surface of tomato cultivars in relation to possible invasion into the leaf by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Annals of Botany*, 55, pp. 803-809.
- Bastas K.K. & Karakaya A. (2012). First Report of Bacterial Canker of Kiwifruit Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey. *Plant disease*, 96, 3, p. 452.
- Bru M. (2011). Une bactérie s'invite dans les vergers. *Réussir fruits & légumes*, 306, pp. 6-7.
- Campbell N. & Reece J. (2004). Biologie. 2<sup>ème</sup> édition française, De Boeck, Bruxelles, 1364 p.
- Couteux A. & Lejeune V. (2011). Index phytosanitaire ACTA. 48<sup>ème</sup> édition, ACTA-publications, Paris, 940 p.
- Direction générale de l'alimentation (2012). Note de service DGAL/SDQPV/N2012-8106 du 21 mai 2012 relative au plan de surveillance de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* sur cultures de Kiwi.
- Everett K.R. *et al.* (2011). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand. *Australian Plant Disease Notes*, 6/2011, pp. 67-71.
- Ferrante P., Scortichini M. (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathology Journal*, 59, pp. 954-962.
- Fritsch J. (2012). La Psa, grave bactériose, est sur le kiwi en France. *Phytoma – la défense des végétaux*, 650, pp. 22-25.
- Gaignard J.L. *et al.*, (1993). Estimation de la sensibilité variétale du pêcher à *Pseudomonas syringae* pv. *persicae* sur vitroplants. *Agronomie*, 13, pp. 189-199.
- Gaignard J.L., Luisetti J. (1993). *Pseudomonas syringae*, bactérie épiphyte, glaçogène et pathogène. *Agronomie*, 13, pp. 333-370.
- GRANT, C.J. Draft pest risk analysis report for *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* associated with *Actinidia* propagative material. Canberra: Australia Plant Biosecurity, 2011. 2 p. Biosecurity Australia Advice 2011/09.
- Hajebrahimi S. & Banihashemi Z. (2011). Host range of *Phytophthora parsiana*: a new high temperature pathogen of woody plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 50, pp. 159–165.
- HALLETT, I. Microscopic examination of the progression of Psa-V in Gold 3. New Zealand: Plant & Food Research, 2012. 11 p. Research notes.



- Hennion B. (2003). Le kiwi : monographie. Ctifl, Paris, 241 p.
- Hennion B. (2010 a). Une nouvelle variété de kiwi à chair jaune – date de récolte et conservation du Jintao®. *Infos ctifl*, 258, pp. 34-36.
- Hennion B. (2010 b). Rencontre technique kiwi – les perspectives d'évolution. *Infos Ctifl*, 264, pp. 6-7.
- HORNER, I.J. Survival of *Psa* in the orchard environment. New Zealand: Plant & Food Research, 2011. 67 p. Rapport d'études n°6389 – Réf. VI 1257.
- Jones V. (2012). Investigating possible links to the severity of infection on *Psa*-V orchards within Te Puke. *New Zealand kiwi fruit journal – Psa scientific edition*, 211, pp. 24-28.
- MAF. *Psa* – pathway tracing report. New-Zealand: Ministry of Agriculture and Forestry, 2011. 32 p. Rapport d'études n°2010-348 *Psa* kiwifruit.
- Maouni A. *et al.* (2002). Etude de la résistance d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum* aux fongicides lors de la conservation des poires. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 141, pp. 61-72.
- Marcelletti *et al.* (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* draft genomes comparison reveal strain-specific features involved in adaptation and virulence to *Actinidia* species. *PLoS One*, 6, 11, 17 p.
- MAUCLINE, N. *et al.* Surveying orchards to identify resistance to *Psa*-V. New Zealand: Plant & Food Research, 2012. 13 p. Rapport d'études n°6441 – Réf. V11275.
- Max S. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) – What is it and where did it come from?, *Kiwifruit Journal*, January/February 2011, 3 p.
- Mazzaglia A. *et al.* (2010). Cancro batterico dell'actinidia : il punto della situazione in Italia. *Frutticoltura*, 9/2010, pp. 66-76.
- Mazzaglia A. *et al.* (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoS One*, 7, 5, 11 p.
- Montahut S. (2010). Kiwi : Perspectives variétales et techniques – l'histoire récente appartient au passé. *Vegetable*, 270, pp. 44-46.
- Montahut S. (2011). Chancre bactérien : mobilisation maximale. *Vegetable*, 283, pp. 46-49.
- Montesinos E. & Vilardell P. (1991). Relationships among population levels of *Pseudomonas syringae*, amount of ice nuclei, and incidence of blast of dormant flower buds in commercial pear orchards in Catalunya, Spain. *The American Pathological Society*, 81, pp. 113-119.
- O'Rourke D. (2007). Le kiwi dans le monde : un tour d'horizon. Edition 2007, World Kiwifruit Review, Belrose Inc., Pullman (U.S.A.), 110 p.
- Pentreath R. (2012). *Psa* control strategies trialled by the zespri focus orchard network. *New Zealand kiwi fruit journal – Psa scientific edition*, 211, pp. 11-12.
- Rees-Gorge J. (2010). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction (PCR) primers used on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions. *Plant Pathology*, 59, pp. 453-464.
- Scortichini M. *et al.* (2011). Prodotti disponibili contro il batterio *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* : tecniche di controllo a confronto. *L'informatore agrario*, 18/2011, pp. 38-43.



- Scortichini M. *et al.* (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* : a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular plant pathology*, DOI: 10.1111/J.1364-3703.2012.00788.X, 10 p.
- Simonin S. (2010). Variétés kiwi - la diversification est en marche. *Arboriculture fruitière*, 650, pp. 35-38.
- Smith I.M. *et al.* (1988). European handbook of plant diseases. Blackwell scientific publications, Oxford, 583 p.
- Spaun M.D. (1962). Problems in standardization of turbidity determinations on bacterial suspensions. *Bulletin world health organization*, 26, pp. 219-225.
- Spinelli F. *et al.* (2011). Real-times monitoring of the pathogenic interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* species, Università di Bologna, Italy, 53 diapositives.
- TYSON, J. *et al.* *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* wound entry sites – cicada egg nests. New Zealand: Plant & Food Research, 2012. 14 p. Rapport d'études n°6816 - Réf. V11230.
- Vanneste J.L. *et al.* (2011 a). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit pollen samples. *New Zealand Plant Protection*, 64, pp. 246-251.
- Vanneste J.L. *et al.* (2011 b). First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France. *Plant disease*, 95, p. 1311.
- Zespri Group Limited (2009). Chancre bactérien du kiwi. *Bulletin KiwiTech*, 68, pp. 1-5.
- ZESPRI Group Limited (2010). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) – pictorial. *Bulletin KiwiTech*, 90, p. 1.



## Sitographie

---

- [1] FAO STAT - Food and Agriculture Organization of The United Nations (2012). <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (consulté le 18 juin 2012)
- [2] EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* - Bacterial canker of kiwifruit. [http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert\\_List/bacteria/P\\_syringae\\_pv\\_actinidiae.htm?utm\\_source=www.eppo.org&utm\\_medium=int\\_redirect](http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_List/bacteria/P_syringae_pv_actinidiae.htm?utm_source=www.eppo.org&utm_medium=int_redirect) (consulté le 11 avril 2012)
- [3] KVH – Kiwifruit Vine Health (2011). *Psa* and Italian Kiwifruit Orchards, 2011. <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/164> (consulté le 28 juin 2012)
- [4] Ferguson A.R. (1999). New temperate fruits: *Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-342.html> (consulté le 19 juillet 2012)
- [5] Agreste (2009). Kiwi : enquête sur la structure des vergers en 2002 et 2007. <http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/verger2008T14.pdf> (consulté le 18 juillet 2012)
- [6] KVH – Kiwifruit Vine Health (2012). Male susceptibility to Psa-V - Tolerance of male selections to Psa-V in New Zealand. <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/91188> (consulté le 12 juillet 2012)
- [7] Young J.M. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand - preliminary conclusions. <http://www.scribd.com/doc/56225379/Psa-Preliminary-Conclusions-180511> (consulté le 22/06/2012)
- [8] KVH – Kiwifruit Vine Health (2011). Survival of *Psa*. <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/667> (consulté le 19 juin 2012)
- [9] KVH – Kiwifruit Vine Health (2011). Identification of *Psa* Symptoms. <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/168> (consulté le 21/03/2012)
- [10] KVH – Kiwifruit Vine Health (2012). *Psa* – international. [http://www.kvh.org.nz/global\\_history](http://www.kvh.org.nz/global_history) (consulté le 28 juin 2012)
- [11] Callum K. (2012). *Psa* update - Italy and France. <http://www.kvh.org.nz/vdb/document/958> (consulté le 28 juin 2012)
- [12] KVH – Kiwifruit Vine Health (2012). Statistics update. <http://www.kvh.org.nz/statistics> (consulté le 28 juin 2012)
- [13] Montahut S. (2012). Kiwi : le Chili confirme la présence du *Psa*. <http://www.vegetable.fr/2012/01/13/kiwi-le-chili-confirme-la-presence-du-psa-sur-son-territoire/> (consulté le 28 juin 2012)
- [14] Plant and Food Research (2012). *Let's beat Psa*. <http://www.plantandfood.co.nz/page/lets-beat-psa/> (consulté le 10 août 2012)







**AGROCAMPUS OUEST**

**CFR Angers**

2 rue André Le Nôtre  
49045 ANGERS cedex 01

**Ctifl**

**Centre de Lanxade**

28 route des Nébouts  
24130 PRIGONRIEUX

Mémoire de Fin d'Etudes

**Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques,  
Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage**

Année universitaire : 2011 - 2012

Spécialisation ou option : FLAM – Fruits Légumes Alimentation et Marchés

**Contribution à la mise au point d'un test de sensibilité variétale d'*Actinidia sp.*  
à *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*.**

Par : Amandine BOUBENNEC

**ANNEXES**

**Devant le jury :**

le : 06 septembre 2012

Sous la présidence de : Mathilde BRIARD

Maîtres de stage : Bernard HENNION et Michel GIRAUD

Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE

Autres membres du jury (Nom, Qualité) : Sophie CESBRON (Ingénieur d'études - INRA)

Soutenu à Angers

*"Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent  
que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST".*



# Table des annexes

---

<u>Annexe I</u> : PCR – Polymerase Chain Reaction .....	I
<u>Annexe II</u> : Tests biochimiques - préparation des milieux, réalisation et interprétation des tests .....	III
<u>Annexe III</u> : Plan d'expérience du premier test de sensibilité variétale réalisé. Généré par le logiciel StatBox 7, il s'agit d'un plan en randomisation totale à 5 répétitions. L'essai comporte 27 espèces/variétés et également un témoin eau pratiqué sur la variété <i>A. deliciosa</i> 'Hayward'. Les chiffres (de 1 à 28) correspondent aux numéros de boîte et les lettres (de A à E) à la position de chaque rameau. A étant la place la plus à gauche et E celle la plus à droite. ....	VI
<u>Annexe IV</u> : Plan d'expérience du second test de sensibilité variétale réalisé. Généré par le logiciel StatBox 7, il s'agit d'un plan en randomisation totale à 5 répétitions. L'essai comporte 27 espèces/variétés et également un témoin eau pratiqué sur la variété <i>A. deliciosa</i> 'Hayward'. Les chiffres (de 1 à 28) correspondent aux numéros de boîte et les lettres (de A à E) à la position de chaque rameau. A étant la place la plus à gauche et E celle la plus à droite. ....	VIII
<u>Annexe V</u> : Taille (en mm) de chacune des nécroses mesurées sur les rameaux composant l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes, après piqûre de l'écorce à l'aiguille, et nécrose moyenne par rameau. A1, A2, A3, A4, A5, sont respectivement les blocs 1, 2, 3, 4, 5 composant l'essai. ....	X
<u>Annexe VI</u> : Taille (en mm) de chacune des nécroses mesurées sur les rameaux composant l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes, après incision de l'écorce au scalpel, et nécrose moyenne par rameau. S1, S2, S3, S4, S5, sont respectivement les blocs 1, 2, 3, 4, 5 composant l'essai. ....	XI
<u>Annexe VII</u> : Table de lecture du nombre de germes collectés par m <sup>3</sup> d'air lors d'un prélèvement de 200 litres, effectué avec l'aérobiocollecteur AIRTEST – OMEGA. ....	XII
<u>Annexe VIII</u> : Tableau présentant des données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Il contient la taille moyenne des nécroses des rameaux de chacune des espèces/variétés testées, et également la valeur de l'indice de nécrose attribué à chacun d'entre-eux. ....	XIII
<u>Annexe IX</u> : Tableau présentant des données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Il contient la note moyenne attribuée aux rameaux de chacune des espèces/variétés testées en fonction de l'intensité de suintement, et également la valeur de l'indice de suintement attribué à chacun d'entre-eux. ....	XIV
<u>Annexe X</u> : Tableau présentant les résultats de l'analyse de variance réalisée avec le logiciel StatBox 7 avec les données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Le tableau contient la valeur moyenne de l'indice de sensibilité variétale attribuée à chacune des espèces/variétés testées, leur écart-type, leur intervalle de confiance et également les résultats du test de Newman Keuls à 5%. ....	XV
<u>Annexe XI</u> : Tableau présentant des données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Il contient la taille moyenne des nécroses des rameaux de chacune des espèces/variétés testées, et également la valeur de l'indice de nécrose attribué à chacun d'entre-eux. La quatrième répétition d' <i>A. deliciosa</i> 'Hayward' est morte pendant l'essai, ainsi l'indice noté (10) correspond à une estimation de la valeur manquante. ....	XVI
<u>Annexe XII</u> : Tableau présentant des données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Il contient la note moyenne attribuée aux rameaux de chacune des espèces/variétés testées en fonction de l'intensité de suintement, et également la valeur de l'indice de suintement attribué à chacun d'entre-eux. La quatrième répétition d' <i>A. deliciosa</i> 'Hayward' est morte pendant l'essai, ainsi l'indice noté (12,5) correspond à une estimation de la valeur manquante. ....	XVII
<u>Annexe XIII</u> : Tableau présentant les résultats de l'analyse de variance réalisée avec le logiciel StatBox 7 avec les données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Le tableau contient la valeur moyenne de l'indice de sensibilité variétale attribuée à chacune des espèces/variétés testées, leur écart-type, leur intervalle de confiance et également les résultats du test de Newman Keuls à 5%. ....	XVIII



## **Annexe I : PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Document de l'*Ecole Doctorale Sciences de la Vie et Santé ULP* (Dijon)

### **Définition**

En 1983, Kary Mullis met au point une technique d'amplification de l'ADN: la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne). Aujourd'hui c'est une technique incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires.

### **Principe**

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

Les acteurs de la PCR sont :

L'ADN : Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile...). Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

Les deux amorces : Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN.

Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dNTPs) - dATP, dCTP, dGTP, dTTP - sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

L'enzyme, Taq polymérase est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ( $MgCl_2$ ). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

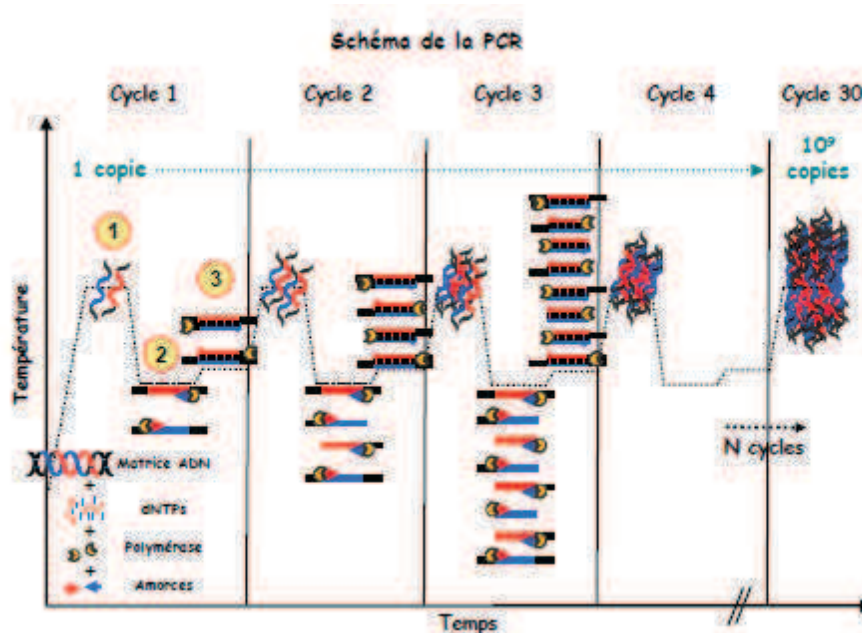
### **Réaction**

La PCR est une technique automatisée. En effet, la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur. L'appareil contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant notre mélange pour la réaction de PCR et où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C.

Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces.

Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.





### 1 - La dénaturation

La température dans le tube est réglée à 95°C. A ce moment là, l'ADN se dénature.

En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice, les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN étant instables à cette température. L'ADN double-brin est dénaturé en ADN simple brin.

### 2 - L'hybridation

Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.

### 3 - L'élongation

Puis la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. C'est une enzyme très spéciale, puisqu'elle est dite thermorésistante. En effet, sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des températures allant jusqu'à 100°C.

Cette Taq polymérase est extraite d'une bactérie extrêmophile, *Thermus aquaticus*, qui ne vit que dans les sources chaudes. En effet, c'est en 1969 que Thomas Brock découvre cette bactérie thermophile, dans le plus grand geyser du monde, le Steamboat Geyser, au parc de Yellowstone aux Etats-Unis.

Au cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN.

En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée.

Le premier cycle est fini et voilà qu'un nouveau cycle recommence. Cela se reproduira environ 30 fois en fonction du protocole de PCR utilisé.

A partir d'une copie d'ADN cible, on pourra donc obtenir 1 milliard de copies d'ADN cible.





## **Annexe II : Tests biochimiques - préparation des milieux, réalisation et interprétation des tests**

### **Préparation des milieux**

La méthodologie de préparation pour 1 litre de milieu est la suivante :

Faire chauffer 0,5 litres d'eau déminéralisée

Dans le même temps réaliser la pesée des produits

Dissoudre ensuite un par un les produits, en plaçant le mélange sous agitation magnétique.

Un fois le mélange bien homogène, le volume de solution est ajusté à 1 litre par l'ajout d'eau déminéralisée stérile, puis remis à chauffer sous agitation.

Ensuite les préparations diffèrent.

Les milieux levane-sucrose, King B gélosé, PDA+S et esculine sont ensuite autoclavés pendant 15 minutes à 121°C. Les manipulations suivantes sont réalisées sous hotte à flux laminaire afin de garantir le maintien de la stérilité. Avant de couler le milieu dans les boîtes de Petri (environ 20 ml), on ajoute les éléments sensibles à la chaleur tels que la céphalexine, la nystatine et streptomycine sulfate aux milieux concernés. Une fois le milieu refroidi et donc solidifié, les boîtes sont placées par 20 en sacs plastiques hermétiquement fermés, puis sorties de la hotte et conservées au réfrigérateur à 4°C.

Le milieu King B liquide est également autoclavé 15 minutes à 121°C, puis placé au réfrigérateur à 4°C sans en changer de contenant. En effet, en l'absence d'agar, il ne se solidifie pas.

Le milieu gélatine, est quant à lui directement transféré à l'aide d'un distributeur de milieu du bac de préparation aux tubes à essai à bouchon à vis (16 ml). Un autoclavage de 15 minutes à 121°C est ensuite réalisé. De même que pour les autres milieux, celui-ci est ensuite conservé à 4°C au réfrigérateur.

### **Réalisation des tests**

Les tests se déroulent sous hotte à flux laminaire.

Pour l'observation de la fluorescence sur milieu King B gélosé (sous lumière ultra-violette) et le test esculine, les colonies d'intérêts sont repiqués à l'aiguille (généralement 2) en plusieurs zones de la boîte.

Pour effectuer le test levane-sucrose, les colonies sont prélevées avec une oose stérile et étalées en zigzag à la surface de la gélose.

Le test gélatine se réalise en enfonçant délicatement l'envers (partie arrondie) d'une oose stérile préalablement « trempée » dans la colonie bactérienne d'intérêt, dans le premier centimètre de milieu.

Le test oxydase se pratique en déposant les bactéries à l'aide d'une oose stérile sur un disque de papier-filtre stérilisé. Une goutte du réactif (phénylènediamine) en solution prête à l'emploi doit préalablement être déposée sur le disque.

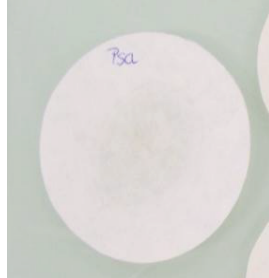


## Interprétation

La lecture des résultats s'effectue généralement après une période de 48 heures à 22°C. A l'exception du test oxydase pour lequel la lecture est immédiate.

### Test oxydase

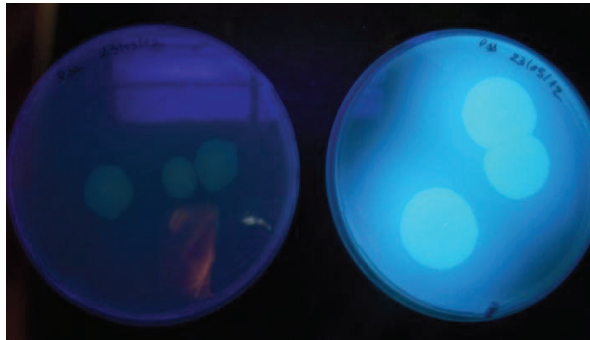
Photographie  
personnelle



La coloration bleue de la colonie en 10 à 30 secondes indique une réaction positive, c'est à dire qu'il y a présence l'enzyme cytochrome c oxydase. Ici, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidia* (à gauche) est témoin négatif et *Pseudomonas fluorescens* (à droite) est témoin positif.

### Fluorescence sous lumière UV de colonies repiquées sur milieu King B gélosé

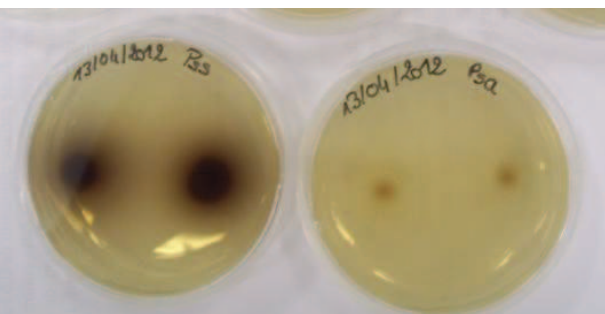
Photographie  
personnelle



La fluorescence des colonies sous lumière ultra-violette indique la production de pyoverdine. Ici, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidia* (à gauche) est témoin négatif et *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (à droite) est témoin positif.

### Test esculine

Photographie  
personnelle



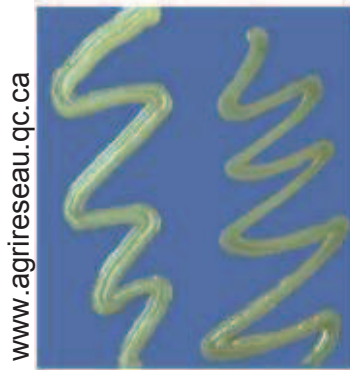
La coloration noire traduit une réaction positive et donc la mise en évidence d'une enzyme esculine hydrolase. Ici, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (à gauche) est témoin positif et *Pseudomonas syringae* pv. *actinidia* (à droite) est témoin négatif.



### Test levane-sucrose

Une réaction positive (à gauche) se traduit par la formation de stries partiellement saillante et luisante (vue du dessus) et par la présence d'une zone opaque et luisante en marge de la strie (vue du dessous). Lors d'une réaction négative (à droite) la strie est prostrée, il n'y a donc pas de polymérisation du fructose en polyfructose.

### Test gélatine



Avant la lecture et après l'incubation, les tubes sont placés environ 10 minutes dans la glace pour assurer la solidification du milieu. Ici, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (à gauche) est témoin positif car on observe la liquéfaction de la gélatine liée à la dégradation de molécules complexes. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (à droite) est témoin négatif.



**Annexe III : Plan d'expérience du premier test de sensibilité variétale réalisé. Généré par le logiciel StatBox 7, il s'agit d'un plan en randomisation totale à 5 répétitions. L'essai comporte 27 espèces/variétés et également un témoin eau pratiqué sur la variété *A. deliciosa* 'Hayward'. Les chiffres (de 1 à 28) correspondent aux numéros de boîte et les lettres (de A à E) à la position de chaque rameau. A étant la place la plus à gauche et E celle la plus à droite.**

	A	B	C	D	E
1	<i>A. chinensis</i> '513' r2	<i>A. melanandra</i> 'W35' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r2	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r5
2	<i>A. chinensis</i> '13-11' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r3	<i>A. chinensis</i> '403' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r5	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r5
3	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r2	<i>A. chinensis</i> '423' r3	<i>A. chinensis</i> '13-11' r2
4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r5	<i>A. chinensis</i> '505' r5	<i>A. eriantha</i> '68-2' r3	<i>A. chinensis</i> '13-04' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r2
5	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r5	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r4	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r2	<i>A. chinensis</i> '13-04' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r5
6	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r2	<i>A. chinensis</i> '505' r3	<i>A. giraldi</i> 'W36' r1
7	<i>A. chinensis</i> '423' r5	<i>A. chinensis</i> '513' r5	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r1	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r1	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r1
8	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r5	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r2	<i>A. chinensis</i> '513' r4
9	<i>A. chinensis</i> '403' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r1	<i>A. chinensis</i> '423' r2
10	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r4	<i>A. chinensis</i> '13- 04' r3	<i>A. chinensis</i> '403' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r4
11	<i>A. arguta</i> '43-13' r1	<i>A. melanandra</i> 'W35' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r1
12	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r3	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r1	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r3	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r2
13	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r4	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r3	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r1
14	<i>A. chinensis</i> '423' r1	<i>A. melanandra</i> 'W35' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r1	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r4	<i>A. chinensis</i> '403' r5





15	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r3	<i>A. giraldi</i> 'W36' r3	<i>A. chinensis</i> '13-11' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r2
16	<i>A. chinensis</i> '13-04' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r5	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r3	<i>A. chinensis</i> '505' r4
17	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r3	<i>A. melanandra</i> 'W35' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r1	<i>A. giraldi</i> 'W36' r5	<i>A. giraldi</i> 'W36' r2
18	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r4	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r1	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r3	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r4	<i>A. arguta</i> '43-13' r2
19	<i>A. eriantha</i> '68-2' r5	<i>A. arguta</i> '43-13' r5	<i>A. chinensis</i> '13-11' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r3
20	<i>A. deliciosa</i> 'N8'r1	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'r1	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'r5	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'r4	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'r4
21	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r2	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r1	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r5	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r4
22	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r2	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r1	<i>A. giraldi</i> 'W36' r4	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r3
23	<i>A. chinensis</i> '513' r1	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r1	<i>A. arguta</i> '43-13' r3	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r2	<i>A. chinensis</i> '513' r3
24	<i>A. chinensis</i> '403' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r4	<i>A. chinensis</i> '423' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r5
25	<i>A. chinensis</i> '505' r2	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r4	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r5	<i>A. chinensis</i> '13-11' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r5
26	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r2	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r4	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r1
27	<i>A. eriantha</i> '68-2' r2	<i>A. melanandra</i> 'W35' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r3	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r3
28	<i>A. chinensis</i> '505' r1	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r5	<i>A. arguta</i> '43-13' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r4	<i>A. chinensis</i> '13-04' r5



**Annexe IV :** Plan d'expérience du second test de sensibilité variétale réalisé. Généré par le logiciel StatBox 7, il s'agit d'un plan en randomisation totale à 5 répétitions. L'essai comporte 27 espèces/variétés et également un témoin eau pratiqué sur la variété *A. deliciosa* 'Hayward'. Les chiffres (de 1 à 28) correspondent aux numéros de boîte et les lettres (de A à E) à la position de chaque rameau. A étant la place la plus à gauche et E celle la plus à droite.

	A	B	C	D	E
1	<i>A. chinensis</i> '505' r2	<i>A. girdaldi</i> 'W36' r2	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r5	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r3
2	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r4	<i>A. girdaldi</i> 'W36' r3	<i>A. chinensis</i> '403' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r5
3	<i>A. chinensis</i> '43-13' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r4	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r3	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r3
4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r1	<i>A. melanandra</i> 'W35' r3	<i>A. chinensis</i> '423' r4	<i>A. chinensis</i> '403' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r1
5	<i>A. girdaldi</i> 'W36' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r5	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r4
6	<i>A. chinensis</i> '403' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r5	<i>A. chinensis</i> '423' r3
7	<i>A. chinensis</i> '13-04' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r4	<i>A. chinensis</i> '13-11' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r4	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r5
8	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r5	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r1	<i>A. chinensis</i> '13-11' r5
9	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r2	<i>A. girdaldi</i> 'W36' r5	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r2	<i>A. chinensis</i> '43-13' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r1
10	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r3	<i>A. melanandra</i> 'W35' r4	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r1	<i>A. chinensis</i> '13-04' r1
11	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r1	<i>A. chinensis</i> '13-11' r4	<i>A. chinensis</i> '505' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r5
12	<i>A. chinensis</i> '43-13' r3	<i>A. chinensis</i> '505' r4	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r2	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r4
13	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r2	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r1	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r2	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r2
14	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r2	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r4	<i>A. chinensis</i> '13-04' r2	<i>A. chinensis</i> '13-11' r3



15	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r4	<i>A. chinensis</i> '513' r1
16	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r2	<i>A. chinensis</i> '423' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' r3	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r1	<i>A. giraldi</i> 'W36' r4
17	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r1	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r5	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r3	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r5
18	<i>A. chinensis</i> '403' r1	<i>A. chinensis</i> '513' r5	<i>A. chinensis</i> '403' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r1	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r4
19	<i>A. deliciosa</i> 'M54' r4	<i>A. chinensis</i> '513' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09' r5	<i>A. chinensis</i> '13-04' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r3
20	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r2	<i>A. chinensis</i> '13-11' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r4	<i>A. chinensis</i> '43-13' r2
21	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r5	<i>A. deliciosa</i> 'Monty' r4	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605' r3	<i>A. eriantha</i> '68- 2' r5
22	<i>A. melanandra</i> 'W35' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r4	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r3	<i>A. deliciosa</i> 'Abbott' r1
23	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r2	<i>A. melanandra</i> 'W35' r5	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r4	<i>A. chinensis</i> '513' r2
24	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r5	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r4	<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - eau r2	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r3
25	<i>A. melanandra</i> 'W35' r1	<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08' r4	<i>A. rubricaulis</i> 'W46' r5	<i>A. chinensis</i> '423' r5	<i>A. chinensis</i> '513' r4
26	<i>A. chinensis</i> '13-04' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme' r2	<i>A. chinensis</i> '505' r1	<i>A. chinensis</i> '505' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r2
27	<i>A. chinensis</i> '423' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Montcap' r1	<i>A. chinensis</i> 'Pollichina' r5	<i>A. chinensis</i> 'First Emperor' r2	<i>A. deliciosa</i> 'Sola' r1
28	<i>A. deliciosa</i> 'N8' r1	<i>A. chinensis</i> '43-13' r1	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r4	<i>A. chinensis</i> 'Jintao' r3	<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373' r3



**Annexe V :** Taille (en mm) de chacune des nécroses mesurées sur les rameaux composant l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes, après piqûre de l'écorce à l'aiguille, et nécrose moyenne par rameau. A1, A2, A3, A4, A5, sont respectivement les blocs 1, 2, 3, 4, 5 composant l'essai.

	A1				A2				A3				A4				A5			
	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
Haut	1,34	1,34	6,24	3,00	1,28	2,72	2,12	3,47	1,71	2,67	1,69	1,82	1,18	1,63	1,27	1,61	1,59	2,00	1,76	2,67
Milieu	0,70	0,83	3,44	0,48	3,44	2,44	3,13	1,34	1,09	2,45	1,69	3,27	2,40	2,79	1,87	1,96	1,87	1,84	2,00	2,67
Bas	1,25	0,82	1,74	0,28	1,77	2,98	1,29	2,39	1,78	3,04	2,33	2,92	2,07	2,14	1,36	2,99	1,99	1,35	1,73	3,03
Moyenne	1,10	1,00	3,81	1,25	2,16	2,71	2,18	2,40	1,53	2,72	1,90	2,67	1,88	2,19	1,50	2,19	1,82	1,73	1,83	2,79





**Annexe VI :** Taille (en mm) de chacune des nécroses mesurées sur les rameaux composant l'essai d'inoculation à différentes concentrations bactériennes, après incision de l'écorce au scalpel, et nécrose moyenne par rameau. S1, S2, S3, S4, S5, sont respectivement les blocs 1, 2, 3, 4, 5 composant l'essai.

	S1				S2				S3				S4				S5			
	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	eau	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
Haut	0,35	0,35	3,40	3,21	0,35	3,68	2,76	2,53	2,50	2,84	3,16	5,09	0,71	1,61	5,51	4,67	0,44	0,88	3,74	3,10
Milieu	0,35	3,44	2,54	1,92	0,35	3,65	2,68	4,90	0,35	2,39	3,50	5,85	0,35	1,47	3,85	2,85	0,46	1,37	3,06	4,12
Bas	0,35	0,35	1,54	3,57	0,35	3,44	3,79	3,09	0,47	2,39	2,11	5,03	0,37	2,72	4,23	2,33	0,51	2,92	2,85	4,38
Moyenne	0,35	1,38	2,49	2,90	0,35	3,59	3,08	3,51	1,11	2,54	2,92	5,32	0,48	1,93	4,53	3,28	0,47	1,72	3,22	3,87



**Annexe VII : Table de lecture du nombre de germes collectés par m<sup>3</sup> d'air lors d'un prélèvement de 200 litres, effectué avec l'aérobiocollecteur AIRTEST – OMEGA.**



**AEROBIOCOLLECTEUR AIRTEST-OMEGA**

**Table de Lecture pour un prélèvement de 200 L**

Nombre de germes collectés par mètre cube d'air

UFC = nombre de colonies comptées dans la boîte (Unités Faciement Comptables)  
 NPP = nombre de colonies estimé statistiquement (Nombre le Plus Probable)

UFC	NPP	Nb/m <sup>3</sup>	UFC	NPP	Nb/m <sup>3</sup>	UFC	NPP	Nb/m <sup>3</sup>	UFC	NPP	Nb/m <sup>3</sup>	UFC	NPP	Nb/m <sup>3</sup>
1	1	5	51	57	265	101	127	635	151	223	1115	201	375	1875
2	2	10	52	58	290	102	128	640	152	225	1125	202	378	1895
3	3	15	53	59	295	103	130	650	153	228	1140	203	383	1915
4	4	20	54	60	300	104	132	660	154	230	1160	204	388	1940
5	5	25	55	62	310	105	133	665	155	232	1160	205	392	1960
6	6	30	56	63	315	106	135	675	156	235	1175	206	396	1980
7	7	35	57	64	320	107	137	685	157	237	1185	207	401	2005
8	8	40	58	65	325	108	138	690	158	240	1200	208	405	2025
9	9	45	59	67	335	109	140	700	159	242	1210	209	410	2050
10	10	50	60	68	340	110	142	710	160	245	1225	210	415	2075
11	11	55	61	69	345	111	143	715	161	247	1235	211	420	2100
12	12	60	62	70	350	112	145	725	162	250	1250	212	425	2125
13	13	65	63	72	360	113	147	735	163	252	1260	213	430	2150
14	14	70	64	73	365	114	149	745	164	255	1275	214	435	2175
15	15	75	65	74	370	115	150	750	165	257	1285	215	440	2200
16	16	80	66	76	380	116	152	760	166	260	1300	216	445	2225
17	18	90	67	77	385	117	154	770	167	263	1315	217	451	2255
18	19	95	68	78	390	118	156	780	168	265	1325	218	456	2285
19	20	100	69	80	400	119	158	790	169	268	1340	219	462	2315
20	21	105	70	81	405	120	159	795	170	271	1355	220	467	2335
21	22	110	71	82	410	121	161	805	171	274	1370	221	473	2365
22	23	115	72	84	420	122	163	815	172	277	1385	222	479	2395
23	24	120	73	85	425	123	165	825	173	279	1395	223	486	2430
24	25	125	74	87	435	124	167	835	174	282	1410	224	492	2460
25	26	130	75	88	440	125	169	845	175	285	1425	225	498	2490
26	27	135	76	89	445	126	171	855	176	288	1440	226	505	2525
27	28	140	77	91	455	127	172	860	177	291	1455	227	512	2560
28	30	150	78	92	460	128	174	870	178	294	1470	228	519	2595
29	31	155	79	94	470	129	176	880	179	297	1485	229	526	2630
30	32	160	80	95	475	130	178	890	180	300	1500	230	533	2665
31	33	165	81	96	480	131	180	900	181	303	1515	231	541	2705
32	34	170	82	98	490	132	182	910	182	307	1530	232	549	2745
33	35	175	83	99	495	133	184	920	183	310	1545	233	557	2785
34	36	180	84	101	505	134	186	930	184	313	1560	234	565	2825
35	37	185	85	102	510	135	188	940	185	316	1575	235	573	2865
36	39	195	86	104	520	136	190	950	186	320	1600	236	582	2910
37	40	200	87	105	525	137	192	960	187	323	1615	237	591	2955
38	41	205	88	107	535	138	194	970	188	326	1630	238	601	3005
39	42	210	89	108	540	139	196	980	189	330	1650	239	611	3055
40	43	215	90	110	550	140	199	995	190	333	1665	240	621	3105
41	44	220	91	111	555	141	201	1005	191	337	1685	241	631	3155
42	46	230	92	113	565	142	203	1015	192	340	1700	242	643	3215
43	47	235	93	114	570	143	205	1025	193	344	1720	243	654	3270
44	48	240	94	116	580	144	207	1035	194	348	1740	244	666	3330
45	49	245	95	117	588	145	209	1045	195	351	1755	245	679	3395
46	50	250	96	119	595	146	212	1060	196	355	1775	246	692	3460
47	52	260	97	120	600	147	214	1070	197	359	1795	247	706	3530
48	53	265	98	122	610	148	216	1080	198	363	1815	248	721	3605
49	54	270	99	124	620	149	218	1090	199	367	1835	249	736	3685
50	55	275	100	125	625	150	221	1105	200	371	1855	250	753	3765
												251	770	3850
												252	789	3945
												253	810	4050
												254	832	4165
												255	856	4290
												256	882	4425
												257	912	4570
												258	945	4725
												259	983	4895
												260	1027	5135
												261	1080	5460
												262	1146	5790
												263	1235	6175
												264	1367	6635
												265	1632	8160

Loi de Feller :

$$NPP = 265 \cdot \sum_{i=1}^{UFC} \frac{1}{266 - i}$$



**Annexe VIII :** Tableau présentant des données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Il contient la taille moyenne des nécroses des rameaux de chacune des espèces/variétés testées, et également la valeur de l'indice de nécrose attribué à chacun d'entre-eux.

	Nécrose moyenne par rameau					Indice nécrose par rameau				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>A. arguta</i> '43-13'	3,78	2,65	3,92	2,14	3,37	20	10	20	10	20
<i>A. chinensis</i> '13-04'	12,66	7,08	8,51	6,96	7,46	40	30	30	30	30
<i>A. chinensis</i> '13-11'	5,85	3,43	6,05	5,26	5,44	30	20	30	30	30
<i>A. chinensis</i> '403'	2,97	2,76	3,19	4,45	3,12	10	10	20	20	20
<i>A. chinensis</i> '423'	5,27	1,77	1,31	3,41	6,46	30	10	10	20	30
<i>A. chinensis</i> '505'	4,03	2,57	3,45	2,06	1,12	20	10	20	10	10
<i>A. chinensis</i> '513'	2,94	0,72	3,60	2,46	2,53	10	0	20	10	10
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	4,20	5,30	4,57	3,78	4,49	20	30	20	20	20
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	3,70	3,90	3,38	3,31	2,05	20	20	20	20	10
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	2,30	3,13	3,01	2,23	3,00	10	20	20	10	20
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	3,41	3,05	3,12	3,34	2,14	20	20	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	3,47	3,66	3,82	4,95	3,86	20	20	20	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	4,28	3,79	2,68	3,28	3,30	20	20	10	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	3,11	3,03	2,77	2,56	1,94	20	20	10	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' – Eau	0,80	2,12	1,28	1,05	1,49	0	10	10	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	2,58	2,23	3,43	1,27	2,65	10	10	20	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	3,50	4,19	3,79	4,25	3,98	20	20	20	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	4,30	3,98	2,61	4,32	3,03	20	20	10	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	3,82	3,88	4,30	3,28	1,31	20	20	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	3,02	3,21	3,93	3,10	2,79	20	20	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	2,57	2,76	3,82	1,72	2,55	10	10	20	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	2,43	3,08	3,54	4,37	3,45	10	20	20	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	3,30	3,66	2,18	3,39	3,35	20	20	10	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	3,60	3,56	4,59	4,32	3,79	20	20	20	20	20
<i>A. eriantha</i> '68-2'	38,01	1,25	30,30	22,51	1,04	50	10	50	50	10
<i>A. giraldi</i> 'W36'	1,75	2,20	1,28	1,36	2,09	10	10	10	10	10
<i>A. melanandra</i> 'W35'	1,85	1,51	1,58	2,27	2,06	10	10	10	10	10
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	1,98	3,33	1,78	2,22	1,28	10	20	10	10	10



**Annexe IX :** Tableau présentant des données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Il contient la note moyenne attribuée aux rameaux de chacune des espèces/variétés testées en fonction de l'intensité de suintement, et également la valeur de l'indice de suintement attribué à chacun d'entre-eux.

	Suintement moyen par rameau					Indice suintement par rameau				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>A. arguta</i> '43-13'	1	0	0	0	1	12,5	0	0	0	12,5
<i>A. chinensis</i> '13-04'	4	2	3	3	2	50	25	37,5	37,5	25
<i>A. chinensis</i> '13-11'	2	3	3	3	2	25	37,5	37,5	37,5	25
<i>A. chinensis</i> '403'	2	2	2	2	2	25	25	25	25	25
<i>A. chinensis</i> '423'	3	1	2	3	2	37,5	12,5	25	37,5	25
<i>A. chinensis</i> '505'	1	3	1	1	2	12,5	37,5	12,5	12,5	25
<i>A. chinensis</i> '513'	2	0	2	1	1	25	0	25	12,5	12,5
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	1	2	2	2	2	12,5	25	25	25	25
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	3	3	2	2	2	37,5	37,5	25	25	25
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	2	2	2	2	3	25	25	25	25	37,5
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	2	2	3	2	2	25	25	37,5	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	2	2	2	2	2	25	25	25	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	2	3	2	2	3	25	37,5	25	25	37,5
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	2	2	2	2	1	25	25	25	25	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' – Eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	2	2	2	1	2	25	25	25	12,5	25
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	3	2	2	2	2	37,5	25	25	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	1	1	3	2	2	12,5	12,5	37,5	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	2	3	2	2	2	25	37,5	25	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	2	3	2	2	1	25	37,5	25	25	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	1	1	1	1	1	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	2	1	1	1	2	25	12,5	12,5	12,5	25
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	2	2	1	3	2	25	25	12,5	37,5	25
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	2	2	2	3	2	25	25	25	37,5	25
<i>A. eriantha</i> '68-2'	4	4	4	4	0	50	50	50	50	0
<i>A. giraldi</i> 'W36'	1	0	0	0	1	12,5	0	0	0	12,5
<i>A. melanandra</i> 'W35'	1	0	0	1	1	12,5	0	0	12,5	12,5
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	0	1	0	0	0	0	12,5	0	0	0





**Annexe X :** Tableau présentant les résultats de l'analyse de variance réalisée avec le logiciel StatBox 7 avec les données issues du premier test de sensibilité variétale mené. Le tableau contient la valeur moyenne de l'indice de sensibilité variétale attribuée à chacune des espèces/variétés testées, leur écart-type, leur intervalle de confiance et également les résultats du test de Newman Keuls à 5%.

	Moyenne	Ecart Type	Newman Keuls 5%	Intervalle de confiance
<i>A. eriantha</i> '68-2'	74,00	39,749	a	35
<i>A. chinensis</i> '13-04'	67,00	14,296	ab	13
<i>A. chinensis</i> '13-11'	60,50	6,471	abc	6
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	48,00	9,585	bcd	8
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	48,00	9,585	bcd	8
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	47,50	5,590	bcd	5
<i>A. chinensis</i> '423'	47,50	18,286	bcd	16
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	47,50	5,590	bcd	5
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	45,50	7,984	bcd	7
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	45,50	7,984	bcd	7
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	45,00	0,000	bcd	0
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	44,50	7,984	bcd	7
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	43,50	9,287	bcd	8
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	43,00	12,674	bcd	11
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	43,00	12,674	bcd	11
<i>A. chinensis</i> '403'	41,00	5,477	bcde	5
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	40,50	7,374	cde	6
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	36,50	9,287	cdef	8
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	35,50	5,420	cdef	5
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	34,50	7,984	cdef	7
<i>A. chinensis</i> '505'	34,00	8,944	cdef	8
<i>A. chinensis</i> '513'	25,00	16,863	defg	15
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	24,50	4,472	defg	4
<i>A. arguta</i> '43-13'	21,00	11,264	defg	10
<i>A. melanandra</i> 'W35'	17,50	6,847	efg	6
<i>A. giraldi</i> 'W36'	15,00	6,847	fg	6
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	14,50	10,062	fg	9
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - Eau	8,00	4,472	g	4



**Annexe XI : Tableau présentant des données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Il contient la taille moyenne des nécroses des rameaux de chacune des espèces/variétés testées, et également la valeur de l'indice de nécrose attribué à chacun d'entre-eux. La quatrième répétition d'*A. deliciosa* 'Hayward' est morte pendant l'essai, ainsi l'indice noté (10) correspond à une estimation de la valeur manquante.**

	Nécrose moyenne par rameau					Indice nécrose par rameau				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>A. arguta</i> '43-13'	1,64	1,50	2,57	1,62	1,22	10	10	10	10	10
<i>A. chinensis</i> '13-04'	6,49	5,21	4,93	6,95	5,31	30	30	20	30	30
<i>A. chinensis</i> '13-11'	4,94	4,81	4,60	5,02	4,83	20	20	20	30	20
<i>A. chinensis</i> '403'	3,84	3,46	3,64	3,92	3,55	20	20	20	20	20
<i>A. chinensis</i> '423'	3,34	3,44	18,11	1,71	3,33	20	20	40	10	20
<i>A. chinensis</i> '505'	1,79	1,76	1,06	1,37	2,48	10	10	10	10	10
<i>A. chinensis</i> '513'	2,40	0,91	2,17	2,81	2,75	10	0	10	10	10
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	5,60	7,27	3,52	6,86	6,66	30	30	20	30	30
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	2,84	3,01	2,81	3,17	3,68	10	20	10	20	20
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	1,65	2,71	2,22	3,09	3,21	10	10	10	20	20
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	2,70	2,29	2,57	2,04	2,54	10	10	10	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	3,00	4,07	3,97	2,81	2,56	10	20	20	10	10
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	3,95	3,57	2,62	3,01	3,55	20	20	10	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	2,11	2,26	1,52	-	1,88	10	10	10	(10)	10
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' – Eau	1,44	0,70	1,23	1,12	0,99	10	0	10	10	0
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	2,12	2,62	3,61	3,94	1,57	10	10	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	5,61	3,38	4,45	4,25	2,87	30	20	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	3,59	1,99	3,69	3,24	2,48	20	10	20	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	3,69	3,37	4,12	4,38	4,15	20	20	20	20	20
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	1,97	1,63	3,44	2,50	3,44	10	10	20	10	20
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	4,87	2,61	2,48	2,42	3,01	20	10	10	10	20
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	3,05	4,37	3,61	2,89	3,81	20	20	20	10	20
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	2,31	2,34	2,25	3,45	2,67	10	10	10	20	10
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	2,72	2,72	3,04	3,33	3,35	10	10	20	20	20
<i>A. eriantha</i> '68-2'	4,00	9,61	26,51	1,96	1,66	20	30	50	10	10
<i>A. giraldi</i> 'W36'	3,85	3,12	2,52	3,76	2,74	20	20	10	20	10
<i>A. melanandra</i> 'W35'	2,09	0,75	1,02	1,16	1,74	10	0	10	10	10
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	1,39	1,15	1,91	0,91	1,27	10	10	10	0	10



**Annexe XII :** Tableau présentant des données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Il contient la note moyenne attribuée aux rameaux de chacune des espèces/variétés testées en fonction de l'intensité de suintement, et également la valeur de l'indice de suintement attribué à chacun d'entre-eux. La quatrième répétition d'*A. deliciosa* 'Hayward' est morte pendant l'essai, ainsi l'indice noté (12,5) correspond à une estimation de la valeur manquante.

	Suintement moyen par rameau					Indice suintement par rameau				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>A. arguta</i> '43-13'	0	0	1	1	1	0	0	12,5	12,5	12,5
<i>A. chinensis</i> '13-04'	3	3	2	3	3	37,5	37,5	25	37,5	37,5
<i>A. chinensis</i> '13-11'	3	2	3	3	3	37,5	25	37,5	37,5	37,5
<i>A. chinensis</i> '403'	2	2	2	3	2	25	25	25	37,5	25
<i>A. chinensis</i> '423'	3	2	2	2	2	37,5	25	25	25	25
<i>A. chinensis</i> '505'	0	1	1	0	0	0	12,5	12,5	0	0
<i>A. chinensis</i> '513'	3	1	2	1	2	37,5	12,5	25	12,5	25
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	2	3	2	2	3	25	37,5	25	25	37,5
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	1	2	1	2	1	12,5	25	12,5	25	12,5
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	1	2	1	3	2	12,5	25	12,5	37,5	25
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	2	1	4	2	2	25	12,5	50	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	1	1	2	2	1	12,5	12,5	25	25	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	3	3	3	3	3	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	1	1	1	-	2	12,5	12,5	12,5	(12,5)	25
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' – Eau	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	2	2	2	2	2	25	25	25	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	2	2	3	2	1	25	25	37,5	25	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	1	1	2	1	1	12,5	12,5	25	12,5	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	1	2	2	3	2	12,5	25	25	37,5	25
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	0	1	2	1	2	0	12,5	25	12,5	25
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	2	1	1	1	1	25	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	1	1	2	2	2	12,5	12,5	25	25	25
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	1	2	2	1	1	12,5	25	25	12,5	12,5
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	2	3	2	2	2	25	37,5	25	25	25
<i>A. eriantha</i> '68-2'	4	3	2	2	1	50	37,5	25	25	12,5
<i>A. giraldi</i> 'W36'	2	3	2	3	2	25	37,5	25	37,5	25
<i>A. melanandra</i> 'W35'	0	0	0	0	1	0	0	0	0	12,5
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	0	1	0	0	0	0	12,5	0	0	0




**Annexe XIII :** Tableau présentant les résultats de l'analyse de variance réalisée avec le logiciel StatBox 7 avec les données issues du deuxième test de sensibilité variétale mené. Le tableau contient la valeur moyenne de l'indice de sensibilité variétale attribuée à chacune des espèces/variétés testées, leur écart-type, leur intervalle de confiance et également les résultats du test de Newman Keuls à 5%.

	Moyenne	Ecart Type	Newman Keuls 5%	Intervalle de confiance
<i>A. chinensis</i> '13-04'	63,00	10,062	a	9
<i>A. chinensis</i> 'Chinabelle'	58,00	9,585	ab	8
<i>A. chinensis</i> '13-11'	57,00	7,984	ab	7
<i>A. deliciosa</i> 'Greensill W08'	55,50	4,472	abc	4
<i>A. eriantha</i> '68-2'	54,00	23,625	abc	21
<i>A. chinensis</i> '423'	49,50	11,779	abcd	10
<i>A. chinensis</i> '403'	47,50	5,590	abcde	5
<i>A. giraldi</i> 'W36'	46,00	11,264	abcde	10
<i>A. deliciosa</i> 'M54'	45,00	13,807	abcde	12
<i>A. deliciosa</i> 'Monty'	45,00	8,839	abcde	8
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 4605'	43,50	4,873	abcde	4
<i>A. deliciosa</i> 'Jones W09'	39,00	5,477	bcdef	5
<i>A. deliciosa</i> 'Sola'	38,00	6,471	bcdef	6
<i>A. chinensis</i> 'Pollichina'	37,50	13,693	bcdef	12
<i>A. chinensis</i> 'Jintao'	36,50	15,062	bcdefg	13
<i>A. chinensis</i> 'First Emperor'	33,50	11,264	cdefg	10
<i>A. deliciosa</i> 'Abbott'	31,50	9,454	defgh	8
<i>A. deliciosa</i> 'Montcap'	31,00	9,287	defgh	8
<i>A. chinensis</i> '513'	30,50	13,393	defgh	12
<i>A. deliciosa</i> 'Summer 3373'	29,50	6,471	defgh	6
<i>A. deliciosa</i> 'N8'	29,00	15,472	defgh	14
<i>A. deliciosa</i> 'Petit Homme'	29,00	9,937	defgh	9
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward'	25,00	5,590	efghi	5
<i>A. arguta</i> '43-13'	17,50	6,847	fghi	6
<i>A. chinensis</i> '505'	15,00	6,847	ghi	6
<i>A. melanandra</i> 'W35'	10,50	7,984	hi	7
<i>A. rubricaulis</i> 'W46'	10,50	7,984	hi	7
<i>A. deliciosa</i> 'Hayward' - Eau	6,00	5,477	i	5







	Diplôme : Diplôme d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agroalimentaires, Horticoles et du Paysage Spécialité : Horticulture Spécialisation / option : FLAM – Fruits Légumes Alimentation et Marchés Enseignant référent : Alexandre DEGRAVE
Auteur(s) : Amandine BOUBENNEC Date de naissance : 28/01/1987	Organisme d'accueil : Ctifl – Centre de Lanxade Adresse : 28 route des Nébouts 24130 PRIGONRIEUX
Nb pages : 42                      Annexe(s) : XVIII	
Année de soutenance : 2012	Maîtres de stage : Bernard HENNION / Michel GIRAUD
<b>Titre français</b> : Contribution à la mise au point d'un test de sensibilité variétale d' <i>Actinidia sp.</i> à <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> .	
<b>Titre anglais</b> : Contribution to the development of a varietal susceptibility test of <i>Actinidia</i> species to <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> .	
<b>Résumé</b> (1600 caractères maximum) :	
<p><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), est l'agent causal de la bactériose du kiwi. Identifié au Japon en 1984, sa présence est enregistrée pour la première fois en Europe en 1994, dans des vergers Italiens. Jusqu'à récemment, l'impact de la bactériose a été relativement faible sur l'économie, mais on assiste aujourd'hui à une propagation importante de cette bactérie et à une croissance des dégâts. S'informer et lutter contre ce <i>Pseudomonas</i> encore relativement méconnue, est devenu une priorité pour les acteurs de la filière mondiale du kiwi.</p> <p>Le travail mené au Ctifl visait la mise au point d'un test de sensibilité variétale d'<i>Actinidia sp.</i> à <i>Psa</i>, car les évidentes différences de sensibilités font penser qu'une solution au problème <i>Psa</i> se trouve dans le choix de cultiver de nouvelles variétés peu sensibles. Aussi, la période de l'année, le lancement rapidement du projet et le travail en laboratoire confiné, nous ont conduit à élaborer un test sur portions de rameaux lignifiés.</p> <p>Les portions de rameaux prélevées, sont blessées, puis inoculées par dépôt d'une goutte de suspension bactérienne sur la plaie. Elles sont ensuite incubées pendant 19 jours dans des conditions optimales au développement de <i>Psa</i>. Après cette période, l'écorce est supprimée longitudinalement de chaque côté de la blessure pour révéler et mesurer la nécrose présente dessous. Le jour suivant l'intensité de suintement est exprimée par une note de 0 à 4. Ces deux mesures sont combinées en un indice de sensibilité permettant ainsi de comparer la sensibilité relative de plusieurs espèces/variétés à l'infection par <i>Psa</i>.</p> <p>Malgré des résultats encourageants, il convient néanmoins de rester vigilant vis-à-vis des conclusions à tirer de cette étude car certains points restent à réétudier. De même, le test devra encore être répété plusieurs fois pour vérifier la répétitivité des classements obtenus.</p>	
<b>Abstract</b> (1600 caractères maximum) :	
<p><i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> (<i>Psa</i>), is the causal agent of the kiwifruit bacterial canker. Identified in Japan in 1984, it was first reported in Europe in 1994, in Italian orchards.</p> <p>Until recently, impact of bacterial canker on economy was relatively limited, but we are now seeing a significant spread of this bacterium and growth of damage. It has become a priority for the world kiwifruit industry, to improve our knowledge and control of this still relatively unknown <i>Pseudomonas</i>.</p> <p>Aim of the work carried out within the Ctifl, was to develop a test to investigate the varietal sensitivity of <i>Actinidia sp.</i> to <i>Psa</i>. In fact, obvious differences in susceptibility of kiwifruit varieties suggest that one solution to the problem of <i>Psa</i> can be found in choosing to grow new less susceptible varieties. Also, the season, early implementation of the project and necessity to work in a confined laboratory, led us to develop a woody cane bioassay.</p> <p>Cane material is cut into lengths, wounded and <i>Psa</i> inoculum is placed into the freshly made wound. These canes are then incubated for 19 days under <i>Psa</i> conducive conditions. After this period of time, the bark on either side of the wound is cut longitudinally to expose and measure the length of the developing lesion beneath. The following day, the expression of bacterial ooze is recorded using a 0-4 scale. These two measurements are combined into a susceptibility index and this value can be used to compare the relative susceptibility of different <i>Actinidia</i> species and varieties to <i>Psa</i> infection.</p> <p>Despite encouraging results, we must remain vigilant to these study conclusions because some points remain to reconsider. Equally, the test still needs to be repeated several times to verify repeatability of obtained ranking lists.</p>	
<b>Mots-clés</b> : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> ( <i>Psa</i> ), chancre bactérien, sensibilité variétale, kiwi, <i>Actinidia</i> . <b>Key Words</b> : <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i> ( <i>Psa</i> ), bacterial canker, varietal susceptibility, kiwifruit, <i>Actinidia</i> .	