

Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp.

David Gerardin¹, Jérémie Rouffiange², Isabelle Kellenberger³, Santiago Schaerer³ et Brice Dupuis³

¹UFR PEPS, Université de Haute Alsace, 68000 Colmar, France

²Institut Supérieur Industriel agronomique Huy-Gembloux, 4500 Huy, Belgique

³Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon, Suisse

Renseignements: Brice Dupuis, e-mail: brice.dupuis@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 47 48

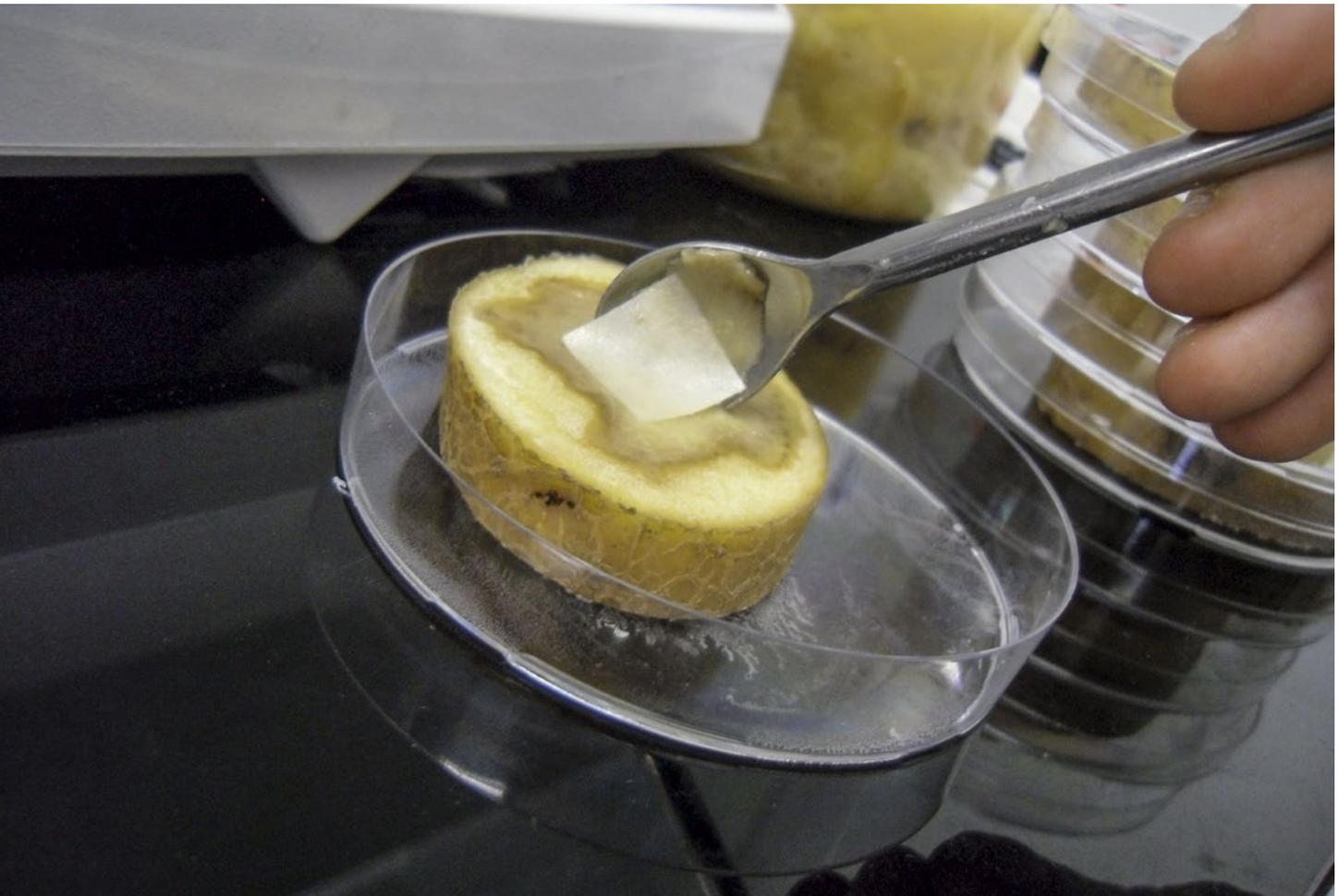


Figure 1 | Élimination de la pourriture molle sur tranche de tubercule. (Photo D. Gerardin)

Introduction

Les bactéries du genre *Erwinia* peuvent être à l'origine de plusieurs maladies de la pomme de terre, comme des pourritures de tiges appelées «jambes noires» et des pourritures de tubercules appelées «pourritures molles». Les symptômes de jambe noire induits varient d'une

pourriture humide à sèche des tiges selon les conditions climatiques, alors que les tubercules peuvent être atteints de pourritures molles au champ et en conservation (Helias 2008). De récents travaux de taxonomie ont abouti à un remaniement de la nomenclature des pathogènes responsables de ces symptômes, qui appartiennent dorénavant à deux genres: *Pectobacterium* (ancienne-

ment *Erwinia carotovora*) et *Dickeya* (anciennement *Erwinia chrysanthemi*) (Helias 2008). Si on se réfère aux analyses réalisées sur 718 échantillons de plantes malades prélevés en Suisse (tiges et tubercules) entre 1986 et 2010, on isole en moyenne 66 % de *Dickeya* et 34 % de *Pectobacterium* (Cazelles et Schwaerzel 1992; Dupuis *et al.* 2010). Les *Dickeya* pénètrent dans le tubercule par les lenticelles, le stolon ou des blessures. Des contaminations peuvent également avoir lieu au cours du stockage, notamment si un tubercule malade est en contact avec un tubercule sain (Rousselle *et al.* 1996). Cependant, les bactéries peuvent rester à l'état latent dans le tubercule et se multiplier une fois que les conditions du milieu deviennent favorables (Hélias 2008). Weber *et al.* (1996) ont synthétisé les mécanismes mis en œuvre dans le développement de pourritures molles. Ces mécanismes sont représentés dans la figure 2.

Premièrement, la bactérie synthétise des enzymes pectinolytiques (EP), principalement des pectates lyases et des polygalacturonases (McMillan *et al.* 1993), qui vont dépolymériser la pectine des parois cellulaires des tissus de la pomme de terre. Les oligogalacturonates (OGS) résultant de cette dépolymérisation sont absorbés par la bactérie et dégradés en 5-keto-4-deoxyuronate (DKI), 2,5-diketo-3-deoxy-gluconate (DKII) ainsi qu'en acide galacturonique (AG) par l'action des oligogalacturonide lyases. Les DKI, DKII ainsi que d'autres composés résultant de la dégradation des parois cellulaires vont entraîner une réaction en chaîne aboutissant à une augmentation de la production d'EP et ainsi, accroître la virulence de la bactérie (Yang *et al.* 1992). Les OGS résultant de la dégradation de la pectine par les EP vont induire des mécanismes de résistance de la plante contre ces attaques tels que la production d'inhibiteurs de protéases (IP) et autres phytoalexines (Weber *et al.* 1996).

Quelques travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de différences de sensibilité variétale au développement de jambes noires au champ (Allefs *et al.* 1996; Radtke et Rieckmann 1991). En revanche, l'étude menée par Haynes *et al.* (1997) sur tranches de tubercules inoculés n'a pas permis de démontrer qu'il existait une différence de sensibilité variétale au développement de pourritures molles. Il est difficile de déterminer si l'absence de différence de sensibilité entre variétés est à imputer à la méthode utilisée, ou si les variétés testées (Atlantic, Norchip et Supérieur) appartiennent à un même groupe de sensibilité. Cette même étude a comparé la virulence de deux isolats de *Pectobacterium* et d'un isolat de *Dickeya* sur les trois mêmes variétés. Aucune différence significative n'a pu être observée entre les isolats testés en ce qui concerne la rapidité de

Résumé

Les bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont à l'origine du développement de pourritures molles sur tubercules de pommes de terre. Sur la base de l'analyse d'échantillons de plantes malades, *Dickeya solani* et *Dickeya dianthicola* sont les espèces les plus couramment détectées dans les lots de pommes de terre suisses. Des essais en laboratoire sur tranches de pommes de terre ont été mis en place afin d'identifier des différences de sensibilité variétale au développement de pourritures molles et des différences d'agressivité entre isolats de *D. dianthicola* et *D. solani*. Sur les 5 variétés de pomme de terre en comparaison, Agria s'est montrée plus sensible qu'Annabelle. Sur les 5 isolats de *Dickeya* testés, les 3 isolats de *D. solani* se sont avérés en moyenne plus virulents que les 2 isolats de *D. dianthicola*. Plusieurs hypothèses visant à expliquer ces différences sont discutées dans cet article. Les résultats de cette étude devraient permettre d'optimiser le stockage des pommes de terre en tenant compte de la sensibilité variétale et de la virulence des espèces bactériennes présentes et de diminuer les impacts de la pourriture molle en cours de stockage.

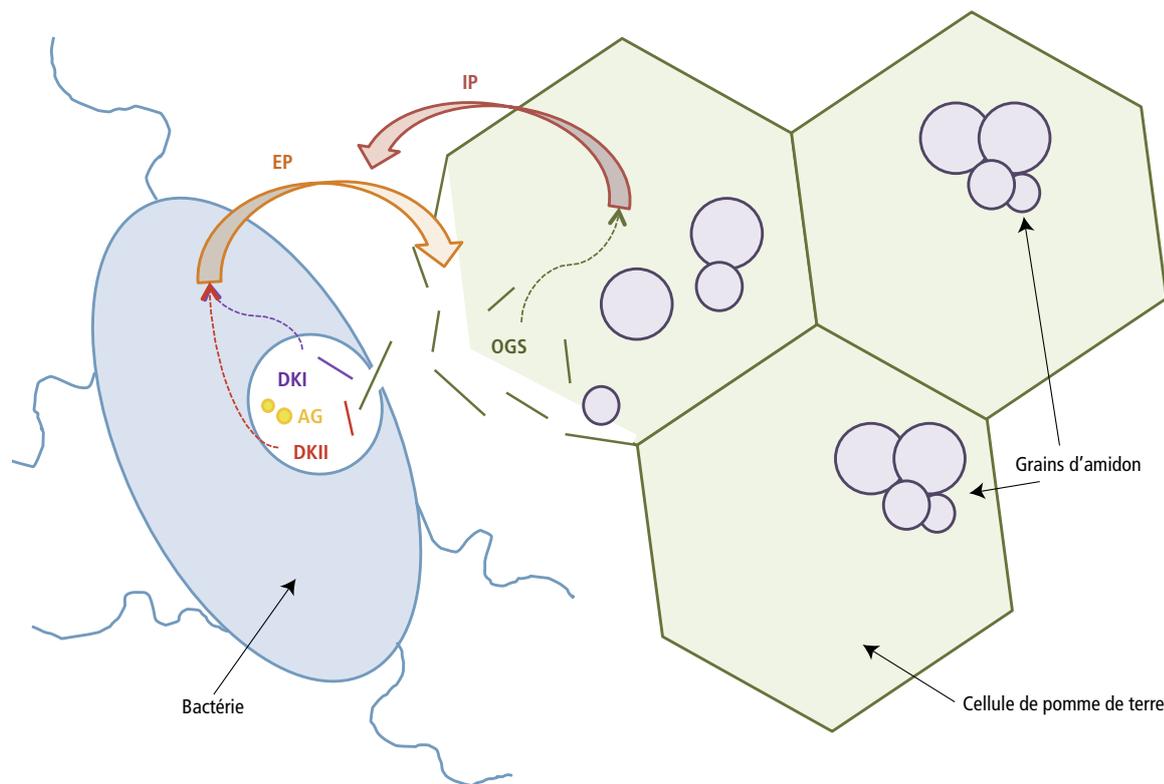


Figure 2 | Représentation schématique des mécanismes mis en œuvre lors de l'attaque de tissus de pommes de terre par *Dickeya* spp. (voir texte pour la légende des abréviations).

développement des pourritures molles sur tranches de tubercules. Cependant, l'espèce de *Dickeya* utilisée pour le test n'est pas connue. Il semble donc pertinent de comparer l'agressivité des deux espèces de *Dickeya* présentes en Suisse, à savoir *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* (Dupuis *et al.* 2010).

Afin de mieux appréhender le risque de développement de pourritures au stockage, cette étude comporte deux objectifs principaux; d'une part, déterminer si des différences de sensibilité variétale au développement des macérations peuvent être mises en évidence pour les principales variétés de pommes de terre cultivées en Suisse. D'autre part, déterminer si certains isolats de *Dickeya*, appartenant à des espèces distinctes, sont plus virulents que d'autres par rapport au développement des pourritures molles.

Matériel et méthodes

Deux essais ont été réalisés dans le cadre de cette recherche.

Dans le premier essai (essai A), l'agressivité de 5 isolats de *Dickeya* est observée sur la variété Agria. Pour cet essai, 2 isolats de *D. dianthicola* et 3 isolats de *D. solani*

sont choisis, nomément: *D. dianthicola* 980, *D. dianthicola* 8823, *D. solani* 07044, *D. solani* 05026 et *D. solani* 2222. Pour le deuxième essai (essai B), la sensibilité de cinq variétés de pomme de terre est étudiée: Agria, Victoria, Charlotte, Innovator et Annabelle. Ces cinq variétés sont inoculées avec la souche *D. dianthicola* 8823. Chacun de ces deux essais a été répété 3 fois dans le temps.

Le protocole utilisé pour réaliser ces deux essais est inspiré de celui de Haynes *et al.* (1997). Les tubercules sont d'abord stérilisés en surface par trempage dans de l'éthanol à 70 % et bref passage sous la flamme d'un bec Bunsen. Une tranche, d'environ 5 mm d'épaisseur, est coupée au centre du tubercule, puis placée dans une boîte de Pétri contenant 1 ml d'eau stérile. Un papier filtre de 1 cm² est placé au centre de la tranche. Une première pesée est alors réalisée afin de déterminer le poids initial. Ensuite, 100 µl de suspension bactérienne (10⁷ ufc/ml) sont déposés sur le papier filtre. Les dilutions sont réalisées dans du tampon phosphate salin (PBS). La boîte est ensuite entourée avec du Parafilm pour limiter les échanges gazeux et incubée dans une étuve à 27 °C pendant 48 heures. Au terme de l'incubation, la pourriture causée par les bactéries est enlevée (fig. 1). Une

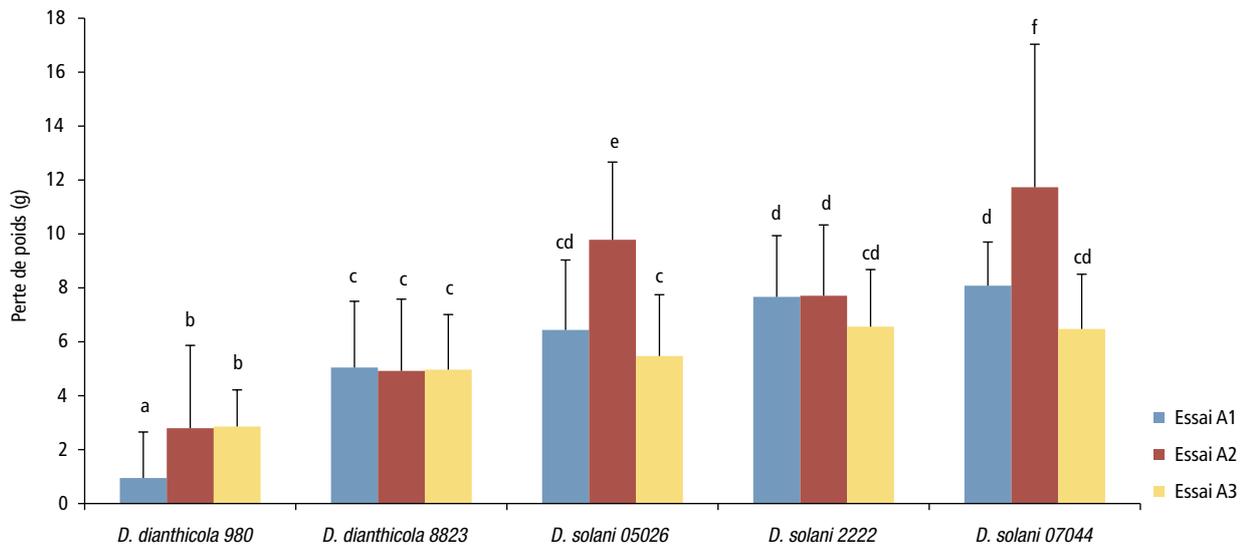


Figure 3 | Perte de poids (g) moyenne par isolat de *Dickeya* spp. suite au développement de pourritures molles sur tranche de tubercule de variété Agria. La variabilité est représentée par l'erreur standard (n= 40) et les groupes d'homogénéité sont représentés par des lettres minuscules au sommet des barres d'erreur.

seconde pesée est alors réalisée pour obtenir le poids final et calculer la perte de poids. Cette perte de poids correspond à la part de la tranche dégradée par la bactérie.

Pour l'essai portant sur l'étude de l'agressivité des isolats, 250 tranches de pommes de terre sont coupées. Chaque isolat est testé sur 40 tranches et 10 tranches témoin sont utilisées pour l'ensemble de l'essai. Sur ces dernières, on applique du PBS à la place de la suspension bactérienne. Pour l'essai portant sur la résistance variétale, 50 tranches de pommes de terre par variété sont coupées. 40 tranches sont inoculées et 10 servent de témoin (du PBS est appliqué à la place de la suspension bactérienne). Pour les deux essais, chaque tranche provient d'un tubercule distinct.

L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel STATISTICA (StatSoft, Tulsa, USA). Pour chaque essai, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs est effectuée ($\alpha=0,05$). Le premier facteur correspond à la répétition de l'essai dans le temps. Le deuxième facteur est l'objet de l'étude, c'est-à-dire l'isolat de *Dickeya* pour l'essai A et la variété pour l'essai B. Enfin, l'interaction entre les deux facteurs est également testée. Si pour l'un des facteurs de l'étude une différence significative est décelée, un test de comparaison de moyennes est effectué (test de Newman & Keuls).

Une observation de la structure cellulaire du tubercule des 5 variétés de pommes de terre testées dans ces essais a également été réalisée. Pour cela, des coupes

histologiques de parenchyme médullaire à partir de 4 tubercules par variété ont été effectuées. Ces coupes ont été observées au microscope avec un grossissement 400X (Leica DMLB) et des clichés ont été réalisés (Leica DFC 490) pour pouvoir mesurer les parois cellulaires et comparer l'épaisseur de celles-ci entre les différentes variétés (ANOVA à 1 facteur).

Résultats

Agressivité des isolats

Les résultats obtenus dans l'essai A nous enseignent que le développement de pourritures sur tranches est éminemment variable (coefficient de variation de l'essai = 60 %). Les tranches témoin (PBS) n'ont pas développé de pourritures, preuve que les tubercules utilisés étaient sains. Considérant l'ensemble des répétitions de l'essai (essais A1, A2 et A3), on constate des différences de sensibilité entre les isolats. Les deux isolats de *D. dianthicola* testés sont moins agressifs que les trois isolats de *D. solani* ($F(4; 485)=98,21$; $p<0,001$). A titre d'exemple, *D. solani* 07044 a entraîné une perte de poids moyenne environ quatre fois plus élevée que *D. dianthicola* 980.

Considérant l'ensemble des isolats, la perte de poids moyenne s'est avérée plus élevée pour la seconde répétition de l'essai, avec 7,39 g par tranche de tubercule, que pour la première et la troisième répétitions qui sont statistiquement identiques avec respectivement 5,64 g et 5,27 g ($F(2;485)=31,66$; $p<0,001$).

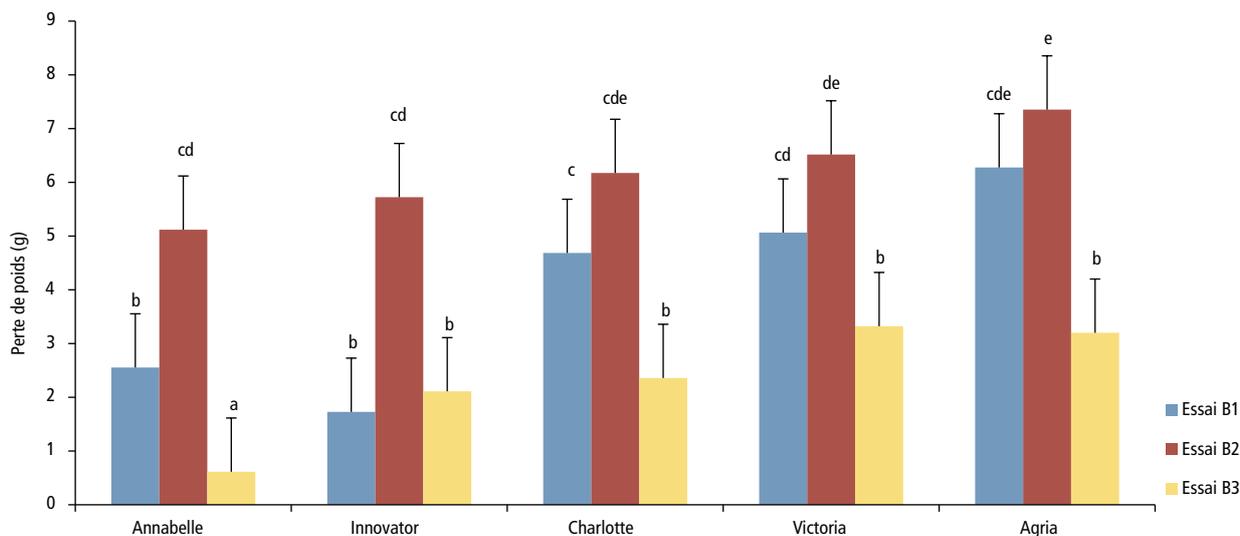


Figure 4 | Perte de poids (g) moyenne par variété sur tranche de tubercule suite au développement de pourritures molles dues à *D. dianthicola* 8823. La variabilité est représentée par l'écart type (n= 40) et les groupes d'homogénéité sont représentés par des lettres minuscules au sommet des barres d'erreur.

Enfin, une interaction entre les isolats testés et la répétition de l'essai est observée ($F(8; 485)=9,63; p<0,05$). Celle-ci s'explique par le fait que les résultats obtenus avec les isolats *D. dianthicola* 980, *D. solani* 05026 et *D. solani* 01044 diffèrent entre les répétitions de l'essai (fig. 3).

Sensibilité variétale

La variabilité de l'essai B est supérieure à celle de l'essai A (coefficient de variation de l'essai = 76 %). Tout comme pour l'essai A, les tranches témoin (PBS) n'ont subi aucune perte de poids ce qui prouve que les tubercules utilisés étaient sains au départ. Considérant l'ensemble des répétitions de l'essai (essais B1, B2 et B3), des différences de sensibilité entre les variétés sont apparues ($F(4; 559)=27,50; p<0,001$) et trois groupes distincts de sensibilité sont observés. Le premier comprend les variétés les moins sensibles, à savoir Annabelle et Innovator. Les pertes de poids moyennes respectives sont de 2,59 g et 3,19 g par tranche de tubercule. Viennent ensuite Charlotte et Victoria avec 4,33 g et 4,78 g. Enfin, Agria est la variété la plus sensible avec une perte moyenne de 5,61 g, c'est-à-dire plus du double de la variété Annabelle.

La perte moyenne, toutes variétés confondues, a été la plus importante lors de la seconde répétition de l'essai, avec 6,20 g par tranche de tubercule, contre 4,06 g pour la première répétition et 2,32 g pour la troisième répétition ($F(2; 559)=114,59; p<0,001$).

Lors de cet essai, une interaction entre la variété et la répétition de l'essai est apparue ($F(8; 559)=3,63; p<0,001$). Malgré cette interaction, on constate que la variété

Agria développe significativement plus de pourritures que la variété Annabelle quel que soit la répétition de l'essai (fig. 4).

Observation microscopique

Des différences d'épaisseur de parois cellulaires ont été observées entre les variétés ($F(4; 29)=5,33; p<0,01$). La variété Victoria est pourvue de parois cellulaires plus fines que les autres variétés testées (tabl. 1).

Tableau 1 | Epaisseur moyenne et écart type des parois du parenchyme médullaire des différentes variétés testées. Les groupes d'homogénéité sont représentés par des lettres minuscules (test de Newman & Keuls).

Variété	Epaisseur de parois (μm)
Victoria	12,5 \pm 2,2 a
Agria	15,6 \pm 1,9 b
Innovator	16,2 \pm 3,3 b
Charlotte	17,3 \pm 2,8 b
Annabelle	18,8 \pm 2,3 b

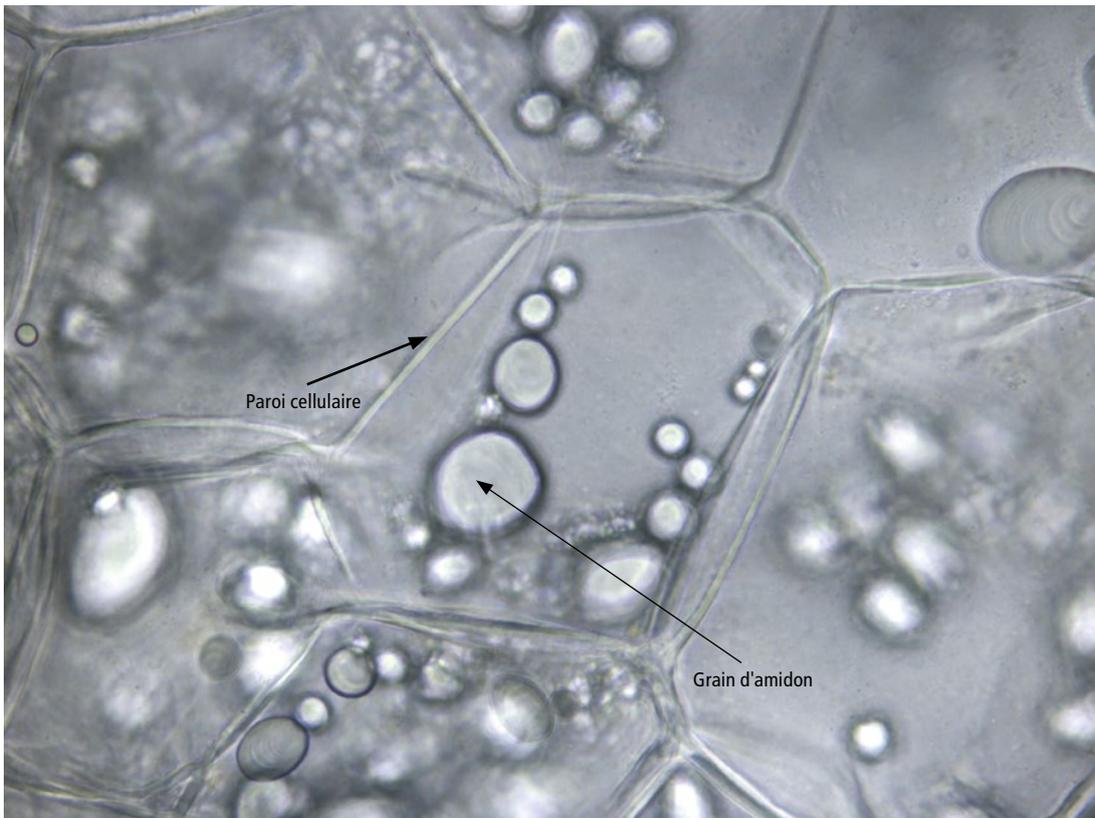


Figure 5 | Coupe histologique de parenchyme médullaire de la variété Victoria (grossissement 400x).

Discussion

Une différence de virulence entre les deux espèces de *Dickeya* a été observée, les isolats de *D. solani* se sont avérés dans la plupart des cas plus agressifs que les isolats de *D. dianthicola*. Une étude rapportée par Toth *et al.* (2011) a permis de démontrer que la température joue un rôle déterminant dans le développement des symptômes. Cette étude a mis en évidence que *D. solani* est plus agressive que *D. dianthicola* à température élevée. Il est donc possible qu'à la température utilisée dans ces essais (27 °C), les isolats de *D. solani* dégradent plus rapidement les parenchymes cortical et médullaire du tubercule grâce à une activité enzymatique plus intense ou à une multiplication bactérienne plus élevée. Des différences de virulence au sein d'une même espèce ont également été observées, principalement pour l'espèce *D. dianthicola*. Ces différences pourraient s'expliquer en raison de la diversité génétique plus importante observée chez *D. dianthicola* par rapport à *D. solani* (Saddler G., Science and Advice for Scottish Agriculture SASA, communication personnelle).

Les essais menés ont permis de démontrer qu'il existe bien des différences de sensibilité variétale au développement de pourritures molles causées par *Dickeya*. En effet, la variété Annabelle s'est montrée moins sensible à ce pathogène que la variété Agria. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette différence. Premièrement, les parois cellulaires de la variété Agria seraient plus riches en pectine que celles de la variété Annabelle, ce qui signifierait que la dégradation des parois d'Agria par les EP de la bactérie produirait plus d'OGS, accélérant le processus de dégradation des tissus du tubercule. En effet, des études préalables menées sur d'autres variétés ont permis de démontrer que des différences de teneur en pectine pouvaient exister entre variétés (Potter et McComb 1957; Tajner-Czopek 2003; Tajner-Czopek et Figiel 2003). La seconde hypothèse serait que la variété Annabelle produirait plus d'IP que la variété Agria grâce à un mécanisme de résistance à l'infection plus efficace.

Afin de vérifier la première hypothèse, nous avons comparé l'épaisseur des parois cellulaires des 5 variétés de l'essai (fig. 5), partant de l'hypothèse selon laquelle

des parois plus épaisses pourraient refléter un contenu en pectine plus important (ainsi qu'un contenu plus élevé en celluloses et hémicelluloses). Cependant, les résultats obtenus ne nous permettent pas de valider la première hypothèse car l'épaisseur des parois cellulaires des variétés Agria et Annabelle sont comparables (tabl. 1).

La variété Annabelle pourrait être moins attaquée suite à une production plus importante d'IP et autres phytoalexines. Cette hypothèse pourrait être confirmée par une étude comparative de l'accumulation d'ARN messagers codant pour ces phytoalexines (Yang *et al.* 1992).

Les résultats de cette étude s'appuient sur des essais de laboratoire réalisés avec des tranches de tubercule. Par conséquent, nous ne pouvons généraliser ces conclusions au tubercule entier, mais seulement supposer que les résultats obtenus sont un reflet fidèle de la sensibilité variétale au développement de pourritures molles ainsi que de la virulence des isolats de *Dickeya* spp sur tubercule de pomme de terre. Toutefois, suite aux études menées sur la propagation de *D. solani*, notamment via le commerce de plants de pommes de terre (Toth *et al.* 2011; Cazelles et Schwaerzel 1992), on peut s'inquiéter des conséquences que peut engendrer cette bactérie sur la culture de pomme de terre, notamment sur le développement de pourritures molles. Ces conséquences pourraient en outre être aggravées du fait du réchauffement climatique, qui favoriserait le développement de ces bactéries (Toth *et al.* 2011).

Conclusions

Ainsi, dans l'optique d'un stockage optimal, l'organisme stockeur pourra prendre en compte la sensibilité variétale et la virulence de l'espèce bactérienne éventuellement présente afin de diminuer le risque d'apparition de symptômes de pourriture molle. Par exemple, en cas de réception de lots de deux variétés suspectés de forte infection, l'une sensible et l'autre moins sensible, l'organisme stockeur pourra alors choisir d'écouler en priorité le lot de la variété sensible. ■

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier Swissem, Swissspatat et la commission pour la technologie et l'innovation CTI qui ont contribué au financement de cette étude.

Riassunto

Sensibilità della patata al marciume molle provocato da *Dickeya* spp.

I batteri del genere *Pectobacterium* e *Dickeya* sono all'origine dello sviluppo dei marciumi molli sui tuberi della patata. In base all'analisi di campioni prelevati da piante ammalate *Dickeya solani* e *Dickeya dianthicola* risultano essere le specie più correntemente rilevate nei lotti di patate svizzeri. Si sono condotte delle prove in laboratorio su fette di patate in modo da individuare delle differenze di sensibilità varietale allo sviluppo di marciumi molli e delle differenze di aggressività tra isolati di *D. dianthicola* e *D. solani*. Sulle 5 varietà di patate confrontate Agria si è dimostrata più sensibile di Annabelle. Sui 5 isolati di *Dickeya* testati i 3 isolati di *D. solani* si sono rivelati in media più virulenti dei 2 isolati di *D. dianthicola*. In questo articolo sono discusse diverse ipotesi miranti a spiegare queste differenze. I risultati di questo studio dovrebbero permettere di ottimizzare lo stoccaggio delle patate tenendo conto della sensibilità varietale e della virulenza delle specie batteriche presenti e di diminuire gli impatti del marciume molle durante lo stoccaggio.

Bibliographie

- Allefs J., Vandooijeweert W., Prummel W., Keizer L. C. P. & Hoogendoorn J., 1996. Components of partial resistance to potato blackleg caused by pectolytic *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *E-chrysanthemi*. *In: Plant Pathology* **45**, 486–96.
- Cazelles O. & Schwaerzel R., 1992. Enquête sur les bactérioses causées par *Erwinia* dans les cultures de plants de pommes de terre en Suisse romande. *Revue suisse Agric* **24**, 215–8.
- Dupuis B., Schaerer S., Gilliland H. & Cazelles O. The *Dickeya* and *Pectobacterium* situation in Switzerland. Proceedings of the *Dickeya* Workshop, 2010. Emmeloord, The Netherlands.
- Haynes K. G., Potts M. J. E. & Goth R. W., 1997. Evaluation of the reliability of determining soft rot resistance in potatoes by the tuber slice method. *American Potato Journal* **74**, 265–75.
- Helias V., 2008. *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. on potato: a new nomenclature for *Erwinia* spp., symptoms, epidemiology and disease prevention. *In: Cahiers Agricultures* **17**, 349–54.
- Mcmillan G. P., Hedley D., Fyffe L. & Perombelon M. C. M., 1993. Potato resistance to soft-rot *Erwinias* is related to cell-wall pectin esterification. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 279–89.

Summary

Potato susceptibility to soft rot caused by *Dickeya* spp.

Soft rot on potato tubers is caused by bacteria belonging to the genus *Pectobacterium* and *Dickeya*. The most often detected species in rotting tubers or plants sampled from Swiss potato lots are *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani*. Laboratory tests on tuber slices were set up to determine differences in cultivar susceptibility and isolate aggressiveness. Among the five cultivars tested, Agria was more susceptible than Annabelle. Among the five bacterial isolates tested, the 3 *D. solani* isolates were in most cases more virulent than the 2 *D. dianthicola* isolates. Several hypothesis are discussed in this article to explain the differences in cultivar susceptibility and isolate virulence. The results of this study should allow an optimization of the potato storage, after considering the susceptibility of a given cultivar to soft rot development and the aggressiveness of the *Dickeya* specie which infected the lot.

Key words: *Dickeya*, potato, soft rot, bacteria, *Pectobacterium*.

- Potter A. L. & McComb A., 1957. Carbohydrate composition of potatoes. Pectin content. *American Journal of Potato Research* **34**, 342–6.
- Radtke W. & Rieckmann W., 1991. Maladies et ravageurs de la pomme de terre. Gelsenkircher-Buer: Th. Mann.
- Rousselle P., Robert Y. & Crosnier J. C., 1996. La pomme de terre. INRA, Paris.
- Tajner-Czopek A., 2003. Changes of pectic substances concentration in potatoes and French fries and the effect of these substances on the texture of the final product. *Nahrung-Food* **47**, 228–31.
- Tajner-Czopek A. & Figiel A., 2003. Effect of the content of potato non-starch polysaccharides (NSP) and lignin on the mechanical properties of french fries. *Polish journal of food and nutrition sciences* **12/53**, 136–40.
- Toth I. K., Van Der Wolf J. M., Saddler G. et al., 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* **60**, 385–99.
- Weber J., Olsen O., Wegener C. & Von Wettstein D., 1996. Digalacturonates from pectin degradation induce tissue responses against potato soft rot. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **48**, 389–401.
- Yang Z., Cramer C. L., Lacy G. H., 1992. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectic enzymes – in planta gene activation and roles in soft-rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 104–12.