

RELANCE DE LA FILIERE ANTHURIUM « FLEUR COUPEE »
IDENTIFICATION DE VARIETES D'ANTHURIUM TOLERANTES
A *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV.*DIFFENBACHIAE* (AGENT RESPONSABLE DU
FLETRISSEMENT BACTERIEN)

Code essai : 14E1101

Durée : Programme pluriannuel (2011-2013)

Auteurs : Daphné LINDERME, Jacques FILLATRE

Partenaires : ARMEFLHOR, CIRAD, ANTHURA

Suivi de quarantaine : DAAF-Service de la Protection des Végétaux (Steeve Dupuis)

1. HISTORIQUE ET CONTEXTE

La dispersion de *Xanthomonas axonopodis* pv. *diffenbachiae* (agent responsable du flétrissement bactérien de l'anthurium) sur le territoire Réunionnais depuis 1997, a induit des risques de contamination pour les producteurs de fleurs coupées d'Anthurium qui possédaient encore une production saine.

Le travail de la cellule de crise mise en place en 1997 (SPV, Syndicat des horticulteurs, Chambre d'Agriculture, CIRAD, ARMEFLHOR....) a précisé l'intérêt d'un travail de recherche et d'expérimentation sur la bactérie. Une première étape de détection a été conduite à son terme par le CIRAD qui a développé une méthode d'identification moléculaire spécifique à *Xanthomonas axonopodis* pv. *diffenbachiae* (Robène-Soustrade et al., 2006)

La deuxième étape, conduite dans le cadre d'un partenariat CIRAD/ARMEFLHOR, consiste à identifier des variétés d'anthurium présentant une tolérance ou une résistance face à l'attaque bactérienne. Deux types de résistance sont étudiés. D'une part la résistance foliaire (entrée de la bactérie par les hydathodes) et d'autre part la résistance systémique (évolution systémique de la bactérie au sein de la plante).

Pour une plus juste représentativité des conditions d'infestation, les essais sont effectués d'une part par aspersion de la bactérie afin d'observer son introduction par contact, et d'autre part par infiltration bactérienne dans la tige (développement systémique).

2. OBJECTIFS DU PROGRAMME 2011

Récapitulatif des actions CIRAD/ARMEFLHOR

Le CIRAD et l'ARMEFLHOR, partenaires dans ce programme, ont réalisé les travaux selon le calendrier suivant :

- Construction d'une serre de quarantaine de niveau P2 (aout- septembre 2011)
- Conception et mise en place du protocole d'expérimentation (octobre 2011)
- Installation du système d'irrigation, des ombrières et du système de fertilisation (octobre 2011)
- Inoculation des anthuriums (novembre 2011)
- Évaluation des concentrations bactériennes dans les plants par Q-PCR (novembre 2011 à janvier 2012)
- Suivi des paramètres techniques de production et d'expérimentation (d'octobre 2011 à février 2012)
- Notations des symptômes (novembre 2011 à janvier 2012)

- Analyse statistique (en cours)
- Planification, conception et mise en place des protocoles et des expérimentations suivants (mars 2012)

3. MATERIEL ET METHODE

▪ Matériel expérimental

- Résistance foliaire : pour l'évaluation de la résistance foliaire, les plants sont disposés en serre NS2 (confinement renforcé).

Le système de ventilation et de refroidissement de la serre (« cooling ») est assuré par un ventilateur relié à une gaine perforée. Ce système se déclenche automatiquement pour assurer le maintien d'une température moyenne de 28°C, température optimale de croissance de la bactérie et de l'anthurium (dans le cas d'une hygrométrie proche de 70%). Une acquisition en continue de la température et de l'hygrométrie de la serre est garantie par deux enregistreurs automatiques Hobo®. Ils enregistrent une mesure d'hygrométrie et de température toutes les 5 minutes pendant toute la durée de l'expérimentation. Ils permettent aussi de mettre en évidence toutes fluctuations de température et d'humidité qui pourraient nuire à la culture. Leur disposition est indiquée sur le plan.

Les boîtiers HOB0 montrent des températures extrêmes allant de 21°C (nuit) à 36°C (jour). La température minimum critique (14°C) n'a donc jamais été atteinte.

Afin de diminuer la luminosité du soleil, très préjudiciable pour la culture, la serre a été entièrement blanchie et une ombrière (couverture 80%) a été tendue 2 mètres au-dessus de la culture. Des mesures de la luminosité sont effectuées chaque semaine.

Neuf mesures hebdomadaires de l'énergie lumineuse sont effectuées dans la serre et une mesure à l'extérieur de la serre. Elles sont indiquées par un éclair jaune sur le plan de serre. On obtient les résultats suivants (KLux) :

Date-heure	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Extérieur
05/12/2011 7h30 10h00	2.5	2.3	2.2	2.9	2.3	2.5	3	3.3	3.3	300 (ensoleillé)
08/12/2011 7h30	2.5	2.9	2.65	4.6	3.6	3.9	9.0	9.1	10.4	600 (ensoleillé)
15/12/2011 7h30	2.51	2.95	2.65	4.6	3.6	3.9	9.0	9.1	10.4	600 (ensoleillé)
29/12/2011 14h00	10.5	10.4	11.50	8.08	5.9	7.6	8.99	11.1	8.45	- - -
06/01/2012 7h30	2.7	2.54	2.68	1.74	1.90	2.38	2.4	2.02	2.66	360 (nuageux)
13/01/2012 8h30	3.04	3	2.83	4.10	4.04	3.80	7.01	6.9	6.5	600 (ensoleillé)
20/01/2012 8h00	2.10	2.51	2.62	3.56	3.61	3.22	8.60	7.03	9.50	550 (ensoleillé)

On constate une hétérogénéité lumineuse dans la serre, ce qui pourra être pris en compte lors de l'analyse de résultat.

L'humidification de la serre est assurée par des brumisateurs (foggers pendulaires 4 sorties anti-goutte) qui se déclenchent pendant 30 secondes toutes les 8 minutes de 7h00 à 18h30. Les relevés des deux sondes Hobo montrent que les données hygrométriques extrêmes varient de 50% à 90%.

Les plantes sont cultivées dans des pots de 3L (diamètre 20 cm). Le substrat est constitué de scories.

L'irrigation est assurée par un système de goutte à goutte. Chaque gouteur débite 2L par heure sur la plante de manière séquentielle (4 minutes, 8 fois par jour à 6h, 9h, 11h, 13h, 15h, 17h, 18h et 19h). Des mesures de drainage sur 18 plants montrent que 1.53 L est drainé en moyenne par plant à chaque arrosage.

La fertilisation, couplée à l'irrigation, est une fertilisation de type NPK (Soluplan 20/20/20) est fournie par l'intermédiaire d'un premier Dosatron (débit 2m³/h). Chaque plante reçoit 120g/j/plante. Les apports de calcium nitrate s'élèvent à 120g/j/plante. En début de culture, l'électro-conductivité de la solution fertilisante a été réglée à 1.1 mS/cm. Par la suite, l'électro-conductivité et le pH de la solution fertilisante à l'apport sont mesurés chaque semaine afin de détecter toute fertilisation en excès.

Les relevés de l'électro conductivité et de pH sont les suivants :

Date	Électro conductivité	pH	Remarques
24/11/2011	1.1	7.6	5 jours avant inoculation (J-5)
02/12/2011	1.18	7.6	3 jours après inoculation (J+3)
09/12/2011	1.20	6.5	J+10
15/12/2011	1.1	6.0	J+16
29/12/2011	1.1	6	J+30
06/01/2012	1.6	7	J+38
13/01/2012	1.2	5.5	J+45
20/01/2012	1.7	7	J+52
	Moy = 1.27	Moy = 6.65	Fin de l'expérimentation J+57

- Résistance systémique :

Pour l'évaluation de la résistance systémique, les plants sont disposés en chambre de culture (rotoplant) réglée sur une photopériode de 12h, une température de 30°C jour et 25°C nuit (+/- 1°C) et une intensité lumineuse de 30µmol/m²/s.

▪ Matériel végétal

Un panel de six variétés d'anthurium a été choisi selon leurs caractéristiques agronomiques, phénotypiques et économiques (variétés les plus demandées par la filière horticole). Les variétés sont :

- Acropolis (fleur de couleur blanche)
- Rosa (couleur rose pâle)
- Senator (couleur vert-rose)
- Tropical (couleur rouge vif)
- Casino (couleur rouge orangé)
- Tropic Night (couleur rouge foncé)

Dans la bibliographie, la variété Tropical est connue comme étant résistante et la variété Rosa comme sensible.

▪ Méthode d'inoculation

- Résistance foliaire :

54 plants par variété sont testés, soit un total de 324 plants. Les plantes sont disposées par blocs de 9 plants. Ce qui correspond à 6 blocs par variétés. Les blocs (contenant 1 variété) sont randomisés dans la serre. Un plant témoin par variété, inoculé au Tris (réactif de laboratoire), est disposé dans la serre au plus près de l'inducteur d'air et est inoculé en premier.

- a) Placer 5L de suspension bactérienne à 10^7 dans les pulvérisateurs et asperger abondamment les feuilles sur les faces supérieures et inférieures
- b) Placer des sacs plastiques transparents sur les plants, à raison de 2 sacs par blocs (1 sac = 4 ou 5 plants)
- c) Retirer les sacs 24 heures après inoculation en veillant bien à retirer les sacs des témoins en derniers

▪ Notations

Les symptômes sont annotés une fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation voir plus au besoin (avant prélèvement de feuilles par exemple). Les notations s'effectuent plantes par plantes, feuilles par feuilles. Sont notés :

- Le nombre de jeunes feuilles sensibles,
- Le nombre de feuilles et de fleurs attaquées,
- Les symptômes (taches huileuses, nécroses, jaunissement, mort),
- La localisation des symptômes (bordure, nervure, spot, blessure),
- Le pourcentage de surface attaquée (classe de 1 à 9).

▪ Mesure de la quantité de pathogènes par Q-PCR

A t=0 : 1^{ère} mesure par PCR quantitative. Deux à 3 jours après l'aspersion, prendre au hasard 3 feuilles aspergées par bloc pour de premières analyses. Cela correspond à 108 échantillons.

- Découper le périmètre de la feuille à 1,5cm du bord.
- Peser et répartir dans des grands sacs de broyage.
- Ajouter du Tris de façon proportionnelle à raison de 20 mL par g de matériel.
- Bien mélanger et récupérer 2 mL de broyat
- Centrifuger 10min à 20000g. Enlever le surnageant et garder le culot.
- À cette étape, les culots peuvent être congelés et gardés en vue de l'extraction.
- Procéder à l'extraction sur culot en appliquant le protocole DNeasy Plant.
- Passer les échantillons en PCR quantitative selon le protocole mis en place au laboratoire.

A J+15 : 2nd mesure par PCR quantitative

- Prélever 3 feuilles aspergées par bloc toujours au hasard (108 échantillons).
- Appliquer le même protocole que pour la mesure à t=0.

En fin d'expérimentation, soit à J+56 : 3^{ème} et dernière mesure par PCR quantitative.

- Mesure des feuilles peu ou pas symptomatiques.
- Suivre les étapes du protocole.

- Résistance systémique :

Pour cette expérimentation, il y a 36 plants au total soit 6 variétés et 6 plants par variétés. Les plantes sont disposées par blocs de 6 plants. Ce qui correspond à 6 blocs au total. Les blocs sont placés dans un Rotoplan en chambre climatique.

Préparer 5mL de suspension à 10^9 CFU/mL.

- a) Sectionner la seconde feuille la plus jeune de la plante à 2,5cm de la base.
- b) Injecter à l'aide d'une seringue, 100uL de solution bactérienne à 10^9 CFU/mL.
- c) Placer un cône sur la section puis brûler l'extrémité du cône.

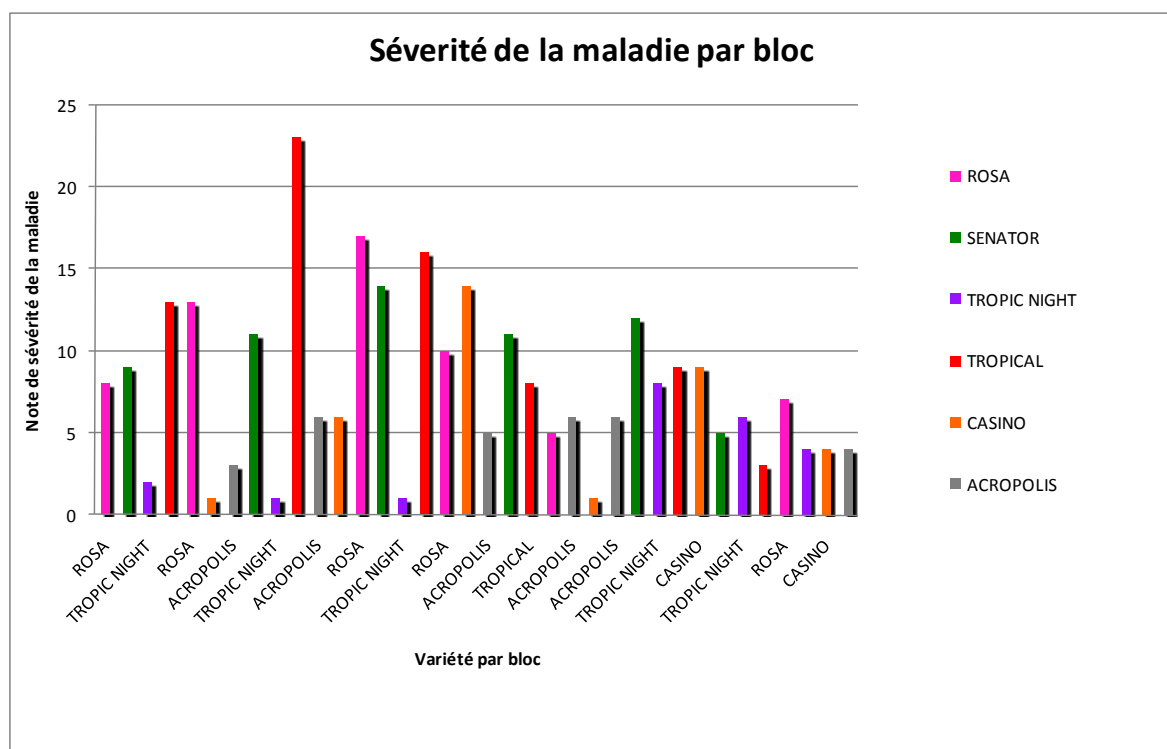
- d) Le lendemain (**J+1**), couper le bout du cône pour laisser les échanges gazeux.
- e) Retirer le cône au bout d'une semaine d'inoculation (**J+7**).
- f) Au bout de 4 à 6 semaines (**J+42**), prélever les pétioles (1 : feuille la plus jeune, 3,4,5 et 6 les plus vieilles), les sectionner par segments de 2 cm.

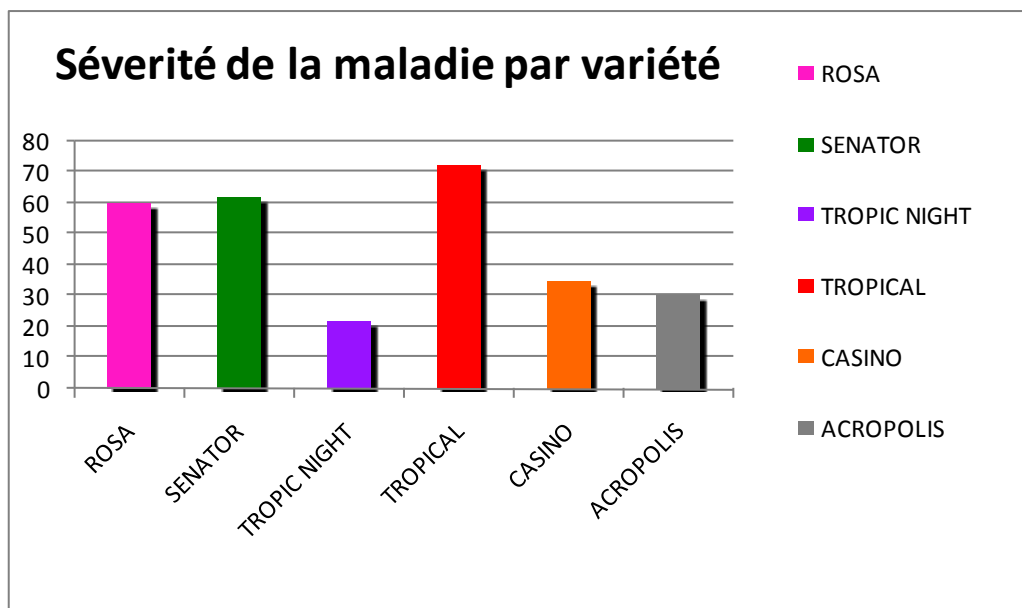
NB : Seuls les segments distaux et proximaux ne seront gardés (le segment proximal étant le tronçon le plus proche du tronc principal et le distal correspondant à celui plus proche de la feuille).

- Peser et répartir dans des sacs de broyage.
- Ajouter du Tris de façon proportionnelle à raison de 20 mL par g de matériel
- Bien mélanger et récupérer 2 mL de broyat dans des Eppendorf ®.
- Centrifuger 10min à 20000g. Enlever le surnageant et garder le culot.
À cette étape, les culots peuvent être congelés et gardés en vue de l'extraction.
- Procéder à l'extraction sur culot en appliquant le protocole DNeasy Plant.
- Passer les échantillons en PCR quantitative selon le protocole mis en place au laboratoire.

4. CONCLUSION

Les premiers essais montrent les résultats suivants. Ils ont été représentés par bloc afin de prendre en compte l'hétérogénéité des blocs au sein de la serre puis par variété afin d'identifier les variétés les plus résistantes.





On constate que Tropical est la variété la plus touchée par le flétrissement. Au contraire, Acropolis montrent de bons résultats de résistance.

D'autres analyses statistiques sont actuellement en cours.

Les étapes suivantes consisteront à :

- effectuer un screening variétale sur sept variétés conseillées par la société Anthura et susceptibles d'être tolérantes à *Xad*.
- effectuer une seconde répétition avec les 6 variétés (novembre 2012) puis une dernière répétition en 2013

Plan de la serre Anthurium NS2 :

