

ResearchGate

Consultez les discussions, les statistiques et les profils des auteurs de cette publication à l'adresse suivante : https://www.researchgate.net/publication/311327322.

Développement d'une méthode de détection des infections latentes du chancre européen des arbres fruitiers (Neonectria ditissima) dans les pépinières de pommiers et de poiriers

	ans le European Journal of Plant Pathology - Décembre 2016 7/s10658-016-1115-3		
n . 10.100	//510036/910-1112-9		
ITATIONS		LECTURES	
;		177	
auteur	s, notamment :		
4	Marcel Wenneker		Peterfrans Jong
	Université et recherche de		Université et recherche de Wageningen
	Wageningen		124 CITATIONS 376 DE PUBLICATIONS
	287 CITATIONS 933 DE PUBLICATIONS		
	VOIR LE PROFIL		VOIR LE PROFIL
	Bart P H J Thomma		
	Université et recherche de Wageningen		
	335 CITATIONS21,220 DE PUBLICATIONS		
	VOIR LE PROFIL		
	VOINTEETHORIE		
Certains	des auteurs de cette publication travaillent également sur ces projets connexes :	:	
Project	Approches de génétique inverse pour identifier le facteur de pathogénicité Voir l	e projet	
	The second section of the section of	100	
Project	génomique fonctionnelle pour les maladies du tabac Voir le projet		

Tout le contenu de cette page a été téléchargé par Marcel Wenneker en décembre. 022016.

L'utilisateur a demandé l'amélioration du fichier téléchargé.



Développement d'une méthode de détection des infections latentes du chancre européen des arbres fruitiers (*Neonectria ditissima*) dans les pépinières de pommiers et de poiriers

Marcel Wenneker & Peter F. de Jong & Nina N. Joosten & Paul W. Goedhart & Bart P. H. J. Thomma

Accepté: 18 Novembre 2016

L'auteur Cet 2016.article est publié en accès libre sur Springerlink.com.

Résumé Le chancre des arbres fruitiers causé par Neonectria ditissima est un problème grave dans les régions productrices de pommes où les températures sont modérées et les précipitations élevées tout au long de l'année, notamment dans le nord-ouest de l'Europe, au Chili et en Nouvelle-Zélande. Des mesures de lutte sont appliquées pour protéger les d'infection primaire, principalement cicatrices foliaires, de l'invasion par un inoculum externe. Cependant, des infections latentes peuvent se produire lorsque de jeunes pommiers sont infectés sans symptômes pendant la propagation. Cette étude visait à développer une méthode de détection des infections latentes du chancre des arbres fruitiers. Des inoculations avec des suspensions de conidiospores de N. ditissima ont été effectuées dans des pépinières sur les tiges principales d'arbres de deux ans de trois cultivars de pommiers et d'un cultivar de poirier. Les inoculations ont été effectuées pendant la période d'abscisse naturelle à l'automne. Aucune lésion visible ou formation de chancre n'était présente au moment de l'arrachage des arbres inoculés. Il semble que les infections puissent rester latentes pendant la période allant de l'infection à l'arrachage (2 mois) et pendant les mois4 suivants de stockage au froid des arbres. Néanmoins.

P.O. Box AA 16,6700Wageningen, Pays-Bas

M. Wenneker (*) · P. F. de Jong · N. N. Joosten Recherche appliquée sur les plantes, Université et recherche de Wageningen, P.O. Box AE 200,6670Zetten, Pays-Bas e-mail : marcel.wenneker@wur.nl

Biometris, Plant Research International, Université et recherche de Wageningen, P.O. Box AA 16,6700Wageningen, Pays-Bas.

B. P. H. J. Thomma

Eur J Plant

basosymptômes ont généralement été induits dans les semaines8 suivant le transfert du matériel de plantation infecté du champ de la pépinière dans une chambre climatique à température et humidité relative élevées. La méthodologie présentée est développée pour détecter les infections latentes de N. ditissima dans les pépinières, avant la plantation dans les vergers, et elle peut contribuer à réduire le problème du chancre européen des arbres fruitiers dans la production commerciale.

Mots clés Chancre de Nectria · Nectria galligena · Arbres de pépinière · Latence

Le chancre européen du pommier et du poirier est causé par le champignon pathogène *Neonectria ditissima* (syn. *Nectria galligena*; anamorphe *Cylindrocarpon heteronema*). Le champignon

induit généralement des chancres sur les pousses latérales, les branches mineures et la tige principale des arbres infectés (Cooke 1999). *N. ditissima* est un parasite des plaies (Swinburne 1975; Xu et al. 1998), et les cicatrices foliaires formées pendant l'abscission sont considérées comme le site d'infection le plus important (Crowdy 1952; Dubin et English 1974). Ces infections sont causées pendant des périodes prolongées de temps pluvieux par des ascospores sexuelles produites dans des périthèces, ainsi que par des conidiospores asexuées produites dans des sporodochies (Swinburne 1975; Beresford et Kim 2011).

Les cultivars de pommes diffèrent dans leur sensibilité aux

N. ditissima. Par exemple, alors que le cv. Jonathan est considéré comme assez résistant, les cvs. Elstar et Jonagold sont considérés comme modérément sensibles, et les cvs. Kanzi et Gala comme très sensibles (Pedersen et al. 1994;

 Van de Weg et al. 1992; Palm et al. 2011; Garkava-Gustavsson et al. 2013; Weber 2014). Bien que *N. ditissima* est principalement décrit comme un patho- gène du pommier, le poirier (*Pyrus communis*) souffre occasionnellement d'incidences sévères (Goos 1975; van der Scheer 1980).

La lutte contre *N. ditissima se* fait par des applications de fongicides en automne et au printemps pour protéger les cicatrices foliaires et les coupes de taille de l'infection (Cooke 1999; Weber 2014). La taille des chancres, le recouvrement des plaies avec de la peinture et l'élimination du bois malade sont également des pratiques importantes pour la lutte contre la maladie. Cependant, malgré ces mesures de contrôle, l'apparition d'épidémies ne peut être évitée (Weber 2014).

Récemment, de graves fovers de chancre ont été signalés dans de jeunes vergers aux Pays-Bas et dans d'autres pays du nord-ouest de l'Europe, en particulier sur certains cultivars de pommiers récemment introduits comme Kanzi et Rubens (Weber et Hahn 2013). Il est suggéré que la source principale d'infection par N. ditissima dans les vergers nouvellement plantés été apportée a l'introduction d'arbres provenant de pépinières, car un nombre significatif de jeunes arbres ont développé de grands chancres le long de la tige principale. Comme les arbres ne présentaient pas de symptômes au moment de la plantation dans les vergers, ils ont probablement été infectés pendant la propagation sans présenter de développement de symptômes (Brown et al. 1994; McCracken et al. 2003; Weber 2014). Plusieurs outils moléculaires ont été développés pour détecter N. ditissima (Langrell et Barbara 2001; Langrell 2002; Ghasemkhani et al. 2016). Cependant, compte tenu de la richesse des sites d'infection possibles au sein d'un même arbre, ces outils ne sont pas adaptés à la détection des infections latentes dans les arbres entiers. Par conséquent, l'objectif de ce travail était de développer une méthode de dépistage rapide et fiable pour l'occurrence d'infections latentes de N. ditissima dans les pommiers et les poiriers qui peut être utilisée avant la plantation dans le verger.

L'inoculum de *N. ditissima* a été obtenu en collectant des chancres frais sur les cvs de pommes. Topaz et Schone van Boskoop, qui ont été placés dans des sacs en plastique dans une chambre climatique pendant une 24heure48 à °C20, pendant laquelle les sporodochies se sont formées. Le jour de l'inoculation, les sporodochies ont été lavées avec de

l'eau distillée stérile, la suspension de contration a été filtrée à travers une toile à fromage, la concentration a été déterminée à l'aide d'un hémocytomètre et ajustée à 1×10^{-5} conidiospores mL⁻¹. La concentration finale de conidiospores a été diluée en série avec de l'eau distillée stérile pour obtenir une gamme de concentrations : 1×10^{5} ; 1×10^{4} ; 1×10^{3} ; 1×10^{2} ; $1 \times \text{conidiospores} 10^{1} \text{ mL}^{-1}$. L'eau distillée stérile a été utilisée comme



Eur J Plant Pathol

contrôle. Pour tous les essais, la viabilité des conidiospores a été confirmée comme étant >95% en comptant le nombre de conidiospores germées lors de l'étalement de µ150 de la suspension de conidiospores pendant 24 h à 20 °C sur de la gélose aqueuse. Les inoculations ont été effectuées dans une pépinière sur les tiges principales d'arbres de deux ans des cultivars de pomme suivants (année de plantation entre parenthèses) Elstar (2004), Santana (2004) et Pinova (2005), et sur le cultivar de poire Conference (2007) pendant la période d'abscission naturelle en automne. Les feuilles ont été délicatement retirées des tiges principales des arbres afin de générer une blessure fraîche de cicatrice foliaire. Dans les cinq minutes suivant l'enlèvement des feuilles, les cicatrices ont été inoculées avec ul 10 d'une série de suspensions de conidiospores diluées 10 fois à l'aide d'une micropipette, ce qui a donné 0; 0,1; 1; 10; ou 100macroconidies 1000 par cicatrice foliaire, puis recouvertes de Vaseline (gelée de pétrole) après l'absorption des gouttelettes pour empêcher la dessiccation des conidiospores (Van de Weg 1989). Sept jours après l'inoculation, la vaseline a été enlevée à l'aide d'une brosse à dents.

Papier Cleanex.

Pour chaque densité d'inoculum, 15 arbres ont été utilisés et quatre inoculations sur la tige principale avec la même densité d'inoculum ont été effectuées sur chaque arbre. Les inoculations ont été effectuées fin octobre/début novembre à deux moments (deux cicatrices foliaires inoculées à chaque fois) séparés d'une semaine, et avec 4 ou 5 bourgeons entre les sites d'inoculation adjacents. Les feuilles ont été enlevées juste avant l'abscission. La première feuille enlevée était approximativement au numéro 15 de l'apex. Après l'inoculation, les arbres ont été laissés dans le champ de la pépinière pendant encore plusieurs mois2, jusqu'à la période d'arrachage commercial fin décembre/début janvier, moment auquel ils étaient complètement défoliés. Il est important de noter qu'au moment de l'arrachage commercial, les arbres n'avaient pas encore reçu la période de refroidissement nécessaire pour rompre leur dormance. L'inspection visuelle a révélé l'absence de symptômes de

N. ditissima, c'est-à-dire des chancres ou des lésions présents sur les cicatrices foliaires inoculées, au moment de la collecte des arbres dans le champ de la pépinière. Par conséquent, toutes les inoculations ont été considérées comme des infections latentes

potentielles.

À leur arrivée au laboratoire, 90 arbres par expérience (soit 6 densités d'inoculum × 15 arbres) ont été divisés en deux lots. Trente arbres (soit 6 densités d'inoculum × arbres5) ont été directement placés dans une chambre climatique à °C18 et 90 % d'humidité relative (HR). Ces arbres ont été placés dans des récipients5 (= répli- cats), composés d'un arbre par densité d'inoculum. Les autres arbres60 (c'est-à-dire les densités d'inoculum6 × arbres10) ont été placés dans une chambre froide pendant des mois4 à

5 °C, et traitées selon les conditions de stockage commerciales, afin de rompre la dormance.

Après plusieurs mois4, ces arbres60 ont été transférés de l'entrepôt frigorifique et 30 arbres ont été transférés dans une chambre climatique à 18 °C et 90 % d'humidité relative (mêmes conditions que les arbres qui ont été directement transférés après avoir été collectés dans le champ de la pépinière); dans des réplicats5 (conteneurs) avec un arbre1 par densité d'inoculum/conteneur. Les 30 arbres restants ont été empotés individuellement et placés dans un champ extérieur et exposés aux conditions naturelles dans un plan en blocs aléatoires avec un arbre par densité d'inoculum/bloc (5 répétitions). Il est important de noter qu'après avoir placé ces arbres dans la chambre climatique ou dans des conditions de semi-plein air, le développement normal des arbres a eu lieu avec la croissance des feuilles et la floraison. L'inspection visuelle a permis de constater que les arbres ne présentaient toujours pas de lésions causées par les maladies suivantes

N. ditissima après un stockage à °C5, et donc les cicatrices foliaires inoculées pourraient encore être considérées comme contenant des infections latentes potentielles.

Les arbres dans les chambres climatiques ont été placés dans du sable humide, dans l'obscurité, à une humidité relative de 90 % et à une température de 18 90 °C. Les arbres dans le champ extérieur ont été mis en pot dans du terreau standard et ont reçu une fertigation selon les pratiques standard.

Les arbres ont été évalués chaque semaine pour l'apparition de chancres, à partir de la première semaine après le transfert, jusqu'à

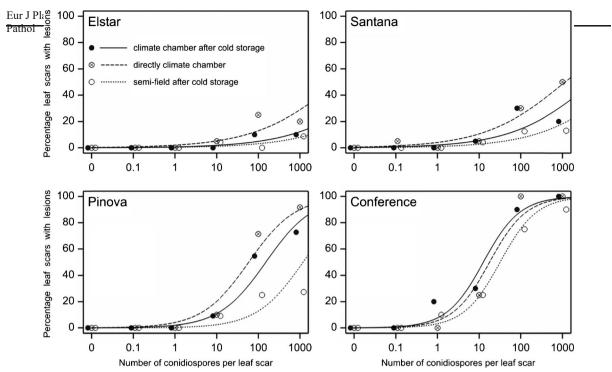
12 semaines. Les lésions de croissance supérieures à 5 mm ont été enregistrées comme des lésions actives.

La régression logistique a été utilisée pour relier la fraction de l'incidence des lésions au log10 de la densité de l'inoculum pour chaque cultivar. Avant la transformation logarithmique a été 1ajoutée à la densité de l'inoculum pour éviter de prendre le logarithme de Le modèle de régression 0.logistique était alors $logit(\pi) = \alpha_i + \beta_i Log10(densité + 1)$ dans lequel π désigne la fraction de lésions, et l'indice i désigne les trois différents traitements. Pour les cultivars de pomme et de poire, l'effet β_i de la densité logarithmique n'était pas significativement différent entre les traitements et donc un effet commun β a été as- sumé. Les effets des traitements ont été résumés par des tests par paire du paramètre d'interception α_i au niveau de signifi- cation de 5 %.

L'évaluation des différentes méthodes d'évaluation des infections latentes de *N. ditissima* a été faite en notant le développement des lésions sur les cicatrices des feuilles inoculées (Fig. 1). Pour tous les cultivars de pommier, les premières lésions ont été observées lorsque 10 conidies ont été utilisées par cicatrice foliaire, tandis que le cv. de poirier Conference a développé des lésions déjà lorsque la spore a été utilisée. Conference a développé des lésions dès l'utilisation des spores1. Les incidences de lésions les plus faibles ont été enregistrées dans les champs extérieurs.

Pour le cv. Elstar, l'incidence des lésions a augmenté à des densités de 100 et conidiospores1000 par cicatrice foliaire.





Pourcentage1 de cicatrices foliaires présentant des lésions après inoculation avec différentes concentrations de conidiospores de *N. ditissima*.



Le pourcentage total de lésions est resté relativement faible, avec environ 20 à 30% des inoculations donnant lieu à des lésions pour les deux densités de conidiospores. Lorsque les arbres du pommier cv. Santana ont été placés dans la chambre climatique directement après l'arrachage, l'incidence des lésions a augmenté à des densités de conidiospores plus élevées. Cependant, lorsque les arbres ont été conservés en chambre froide, les incidences n'ont pas augmenté avec des densités de spores de 100 à 1000 spores par cicatrice foliaire. Pour le cv. Pinova, à des densités d'inoculum plus élevées, les incidences des lésions ont rapidement augmenté lorsque les arbres ont été placés dans la chambre climatique, conduisant à des incidences de lésions très élevées. Cependant, dans le champ extérieur après le stockage au froid. aucune augmentation de l'incidence des lésions n'a été observée entre 100 et 1000 conidiospores par cicatrice foliaire. Pour le poirier cv. Conference pour les conidiospores 100 par cicatrice foliaire, une incidence de plus de 80% a été enregistrée.

Il n'y avait pas de différences significatives dans les inci- dences des lésions entre les cultivars de pommes placés dans la chambre climatique directement après l'arrachage par rapport à ceux placés après une période de 4 mois en chambre froide (Tableau 1). Cependant, les arbres des cvs. Elstar et Santana placés dans la chambre climatique directement après l'arrachage du champ de la pépinière ont montré des incidences de lésions plus élevées par rapport aux arbres placés dans le champ extérieur après un stockage au froid. Pour le cv. Pinova, les deux méthodes ont montré des incidences de lésions significativement plus élevées par rapport aux arbres qui ont été placés dans des conditions extérieures. Pour le poirier cv. Conference, aucune différence significative n'a été observée dans l'incidence des lésions entre les trois méthodes appliquées. Nous avons également confirmé que la dose d'inoculum est un paramètre important pour l'établissement des infections, comme cela a été documenté précédemment (Dubin et English, Van de Wegner et al. 1974; Van de Weg 1989; Weber 2014).

Un résultat important de ces expériences est que la méthode de la chambre climatique a révélé au moins le même pourcentage de lésions, mais souvent plus élevé, que la plantation d'arbres dans des conditions naturelles. De plus, Le fait de placer les arbres dormants dans la chambre climatique directement après l'arrachage n'a pas eu d'effet négatif sur les inci- dences des lésions. On peut donc conclure que cette méthode peut convenir pour détecter les infections latentes de *N. ditissima* avant de planter des arbres de divers cultivars de pommes et de poires dans le verger.

Une autre observation importante est qu'aucune lésion visible ou formation de chancre n'était présente au moment où les arbres inoculés ont été déracinés, c'est-à-dire environ 2 mois après l'inoculation avec les spores de *N. ditissima*. De même, après des mois4 de stockage au froid des arbres, aucune lésion visible n'était présente. Cela montre que les infections pendant la chute des feuilles dans les pépinières restent quiescentes jusqu'après la plantation dans le verger. Même avec une pression d'inoculum élevée, ces infections peuvent rester latentes pendant la période allant de l'infection à l'arrachage (2 mois) et pendant les 4 mois suivants de stockage au froid des arbres. Par conséquent, ces infections ne sont pas détectées dans les pépinières.

Pour l'évaluation des infections de *N. ditissima* dans les lots de matériel végétal commercial, la taille de l'échantillon et la stratégie d'échantillonnage sont importantes. En supposant une distribution aléatoire de la maladie.

300 arbres sont nécessaires pour détecter une incidence de 1% d'arbres infectés de manière latente avec une probabilité de 95%, et

200 arbres sont nécessaires pour détecter une incidence de 1,5% avec une probabilité de 95% (Janse et Wenneker 2002). Le nombre total d'arbres affectés observés dans l'échantillon reflète le pourcentage total d'arbres infectés dans la population.

La méthodologie présentée ici est développée pour détecter les infections latentes de *N. ditissima* dans les arbres de pépinière, avant la plantation dans les vergers. Les outils moléculaires pourraient être utilisés pour vérifier la présence de *N. ditissima* comme agent causal lorsque des lésions sont observées (Ghasemkhani et al. 2016). Cette méthode pourrait contribuer à réduire le problème du chancre européen des arbres fruitiers dans la production commerciale.



Entitle 1 Détination 1 du paramètre d'interception α_i pour chaque traitement dans le modèle de régression logistique et résultats des tests par **Fall-Que**s traitements.

Traitement après arrachageElstarSantanaPinovaConférence												
Chambre climatique dans tout le bâtiment	-5.904	ba	-5.235	b	-6.720	b	-7.393	a				
Stockage au froid (4 mois) puis chambre climatique	-6.972	ab	-5.924	ab	-7.451	b	-7.052	a				
Entrepôt frigorifique (4 mois) puis semi-ferme	-7.450	a	-6.665	a	-9.046	a	-7.966	a				

^a Des lettres différentes dans une colonne indiquent des différences significatives au niveau de signification de 5%.

Remerciements Cette recherche a été financée par le ministère néerlandais des Affaires économiques et le Conseil néerlandais de l'horticulture (Productschap Tuinbouw).

Accès libre Cet article est distribué selon les termes de la licence internationale Creative Commons Attribution 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), qui permet une utilisation, une distribution et une reproduction sans restriction sur n'importe quel support, à condition de citer de manière appropriée le ou les auteurs originaux et la source, de fournir un lien vers la licence Creative Commons et d'indiquer si des modifications ont été apportées.

Références

- Beresford, R. M., & Kim, K. S. (2011). Identification des conditions climatiques régionales favorables au développement du chancre européen du pommier. *Phytopathology*, 101, 135-146.
- Brown, A. E., Muthumeenakashi, S., Swinburne, T. R., & Li, R. (1994). Detection of the source of the infection of apple trees by *Cylindrocarpon heteronema* using DNA polymorphisms. *Plant Pathology*, 43, 338-343.
- Cooke, L. R. (1999). L'influence des pulvérisations de fongicides sur l'infection des plants du cv. Bramley's seedling par Nectria galligena. European Journal of Plant Pathology, 105, 783-790.
- Crowdy, S. H. (1952). Observations sur le chancre des pommes (*Nectria galligena*). IV. L'infection des cicatrices foliaires. *Annales de Biologie Appliquée*, 39, 569-587.
- Dubin, H. J., & English, H. (1974). Factors affecting apple leaf scar infection by *Nectria galligena* conidia. *Phytopathology*, 64, 1201-1203.
- Garkava-Gustavsson, L., Zborwska, A., Sehic, J., Rur, M., Nybom, H., Englund, J.-E., Lateur, M., van de Weg, E., & Holefors, A. (2013). Criblage de cultivars de pommes pour la résis- tance au chancre européen, Neonectria ditissima. Acta Horticulturae, 976, 529-536.
- Ghasemkhani, M., Holefors, A., Marttila, S., Dalman, K., Zborowska, A., Rur, M., Rees-George, J., Nybom, H., Everett, K. R., Scheper, R. W. A., & Garkava-Gustavsson.
 - L. (2016). PCR en temps réel pour la détection et la quantification, et caractérisation histologique de *Neonectria ditissima* dans les pommiers. *Arbres*, 30,1111 -1125.
- Goos, U. (1975). Nectria galligena auch auf Birnen. Mitteilungen des Obstbauversuchsringes des Alten Landes30,, 239.
- Janse, J. D., & Wenneker, M. (2002). Possibilités d'évitement et de contrôle des maladies bactériennes des plantes lors de l'utilisation d'un système d'irrigation.

- du matériel végétal testé (certifié) ou traité contre les agents pathogènes.
- Pathologie végétale, 51, 523-536.
- Langrell, S. R. H. (2002). Détection moléculaire de Neonectria galligena (syn. Nectria galligena). Mycological Research, 106, 280-292.
- Langrell, S. R. H., & Barbara, D. J. (2001). Magnetic capture hybridization for improved PCR detection of Nectria galligena from lignified apple extracts. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 5-.11.
- McCracken, A. R., Berrie, A., Barbara, D. J., Locke, T., Cooke, L. R., Phelps, K., Swinburne, T. R., Brown, A. E., Ellerker, B., & Langrell, S. R. H. (2003). Relative significance of nursery infections and orchard inoculum in the development and spread of apple canker (*Nectria galligena*) in young orchards. *Plant Pathology*, 52, 553-566.
- Palm, G., Harms, F., & Vollmer, I. (2011). Mehrjärige Befallsentwicklung des Obstbaukrebses an verschiedenen Apfelsorten an drei Standorten. Mitteilungen des Obstbauversuchsringes des Alten Landes, 66360-363.
- Pedersen, H. L., Christensen, J. V., & Hansen, P. (1994). Susceptibilité de 15 cultivars de pommes à la tavelure, à l'oïdium, au chancre et aux acariens. Fruit Varieties Journal, 48, 97100.
- Swinburne, T. R. (1975). Le chancre européen du pommier (Nectria galligena). Review of Plant Pathology,54, 787-799
- Van de Weg, W. E. (1989). Criblage de la résistance à *Nectria* galligena Bres. dans les pousses coupées du pommier. *Euphytica*, 42 .233240.
- Van de Weg, W. E., Giezen, S., & Jansen, R. C. (1992). Influence de la température sur l'infection de sept cultivars de pommes par Nectria galligena. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 27, 631-635.
- van der Scheer, H. A. T. (1980). Kanker bij vruchtbomen. Mededeling nr. december 18,1980. Wilhelminadorp (Goes): Proefstation voor de Fruitteelt.
- Weber, R. W. S. (2014). Biologie et lutte contre le champignon du chancre du pommier *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) dans une perspective nord-ouest européenne. *Erwerbs-Obstbau*, *56*, 95-.107.
- Weber, R. W. S., & Hahn, A. (2013). Obstbaumkrebs (Neonectria galligena) und die Apfelsorte 'Nicoter' (Kanzi) an der Niederelbe. Mitteilungen des Obstbauversuchsringes des Alten Landes, 68, 247-256.
- Xu, X.-M., Butt, D. J., & Ridout, M. S. (1998). The effects of inoculum dose, duration of wet period, temperature and wound age on infection by *Nectria galligena* of pruning wounds on apple. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 511-519.



Pathol



Voir les statistiques de publication