

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	19
INTRODUCTION GENERALE	25
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	35
EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE.....	36
I. GENOTYPAGE BACTERIEN	39
Marqueurs moléculaires comme outil d'investigation	39
Technique de génotypage	40
Approches MLSA/MLST, MLVA	42
II. EXPLORATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE.....	45
Variations génétiques	45
Diversité génétique intra-population.....	45
Structure des populations et flux de gènes.....	46
Représentation des relations génétiques	50
Diversité phénotypique	53
III. ABOUTISSEMENT ET PORTEE DES INVESTIGATIONS.....	54
MODELE D'ETUDE : LE FLETRISSEMENT BACTERIEN.....	56
IV. LE COMPLEXE D'ESPECES CHEZ <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>	56
Description.....	56
Taxonomie et diversité génétique	56
Distribution et spectre d'hôte.....	58
Cycle infectieux, conservation et survie	60
Facteurs de virulence.....	63
Epidémiologie.....	63
Stratégies de lutte et de gestion.....	64
V. GENOTYPAGE APPLIQUE AUX SOUCHES DU ceRs	68
Diversité génétique, génétique des populations et phylogénie de la collection mondiale inférée par analyse MLSA.....	69
Marqueurs VNTRs à fort pouvoir de discrimination des souches du ceRs.	70

OBJECTIFS ET QUESTIONS DE RECHERCHE.....	71
CHAPITRE 1. DÉVELOPPEMENT DU SCHÉMA MLVA DU PHYLOTYPE III.....	75
INTRODUCTION.....	77
METHODOLOGIE.....	80
RESULTATS ET DISCUSSION	103
CONCLUSION PARTIELLE.....	105
CHAPITRE 2. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU ceRs ET ÉPIDÉMIOLOGIE	107
INTRODUCTION.....	109
MATERIELS ET MÉTHODES	112
Constitution de la collection de souches du ceRs.....	112
Traitement des échantillons	114
Collection de souches.....	116
Caractérisation moléculaire des souches en collection	116
Enquête épidémiologique	120
Analyse des données.....	122
RESULTATS ET DISCUSSION	125
Ampleur de l'échantillonnage et collection de souches du ceRs.....	125
Phylotypes, spectre d'hôtes et distribution géographique.....	128
Identification de l'écotype 'Brown rot' IIB-1 et de sept séqueviers	130
Populations endémiques diversifiées et complexes de souches malgaches de l'écotype africain phylotype III.....	142
Synthèse et analyses des données d'enquêtes	163
CONCLUSION PARTIELLE.....	166

CHAPITRE 3. ÉVALUATION PRÉLIMINAIRE DE LA RÉSISTANCE DES VARIÉTÉS CULTIVÉES À MADAGASCAR.....	169
INTRODUCTION.....	171
MATERIELS ET METHODES	172
Matériel végétal	172
<i>Ralstonia solanacearum</i>	172
Dispositif expérimental et inoculation	172
Suivi et mesure des symptômes	174
Analyses des données	174
RESULTATS ET DISCUSSION	176
CONCLUSION PARTIELLE.....	180
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	183
EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE : RS3-MLVA16 et RS2-MLVA9, deux puissants outils hautement résolutifs pour caractériser respectivement les souches du phylotype III et du phylotype II.....	185
DEUX MODELES EPIDEMIOLOGIQUES CONTRASTES AU SEIN DU ceRs : l'écotype 'Brown rot' et l'écotype 'Africain'	188
EVALUATION DE LA RESISTANCE GENETIQUE des principales variétés de pomme de terre cultivées à Madagascar : pas de résistance aux souches malgaches ; résistance génétique des variétés 720118 (Jaingy) et 800934 (Miova) aux souches I-31	191
PRIORITES DANS LA STRATEGIE DE LUTTE contre le fletrissement bactérien dû aux souches de quarantaine IIB-1	192
APPROFONDIR LES CONNAISSANCES SUR LE PHYLOTYPE III et ériger en modèle d'étude la capacité à développer des infections latentes.....	194
ET DEMAIN	194
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	197
ANNEXES	219

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Evolution chronologique de développement de marqueurs ADN	38
Tableau 2 – Correspondance entre les récentes et anciennes classifications chez ceRs	59
Tableau 3 – Les variétés de pomme de terre identifiées par FIFAMANOR comme résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien	65
Tableau 4 – Amplifiabilité des marqueurs VNTR testés par N'Guessan <i>et al.</i> (2013).....	79
Tableau 5 – Amorces spécifiques et produits PCR attendus pour l'identification de l'espèce, le phylotype et le sequevar II	117
Tableau 6 – Indices de polymorphisme des 9 loci constitutifs du schéma RS2-MLVA9 mesurés dans la collection CMG-II.....	135
Tableau 7 – Indices de polymorphisme nucléotidique au niveau des sept loci MLSA/MLST dans un ensemble de 144 souches phylotype III isolées dans les Hauts Plateaux malgaches.....	143
Tableau 8 – Similarité entre la topologie des arbres phylogénétiques au seuil statistique de 5 %.....	143
Tableau 9 – Indices de polymorphisme des 16 loci constitutifs du schéma RS3-MLVA16 mesurés dans la collection CMG-III	151
Tableau 10 – Indices de diversité génétique, niveau de liaison entre haplotypes au sein de chaque ZAE et au niveau de la parcelle	154
Tableau 11 – Indices de diversité génétique et degré de déséquilibre de liaison des loci au niveau de chaque population.....	156
Tableau 12 – Caractéristiques des variétés de pomme de terre utilisées.....	173
Tableau 13 – Caractéristiques des souches utilisées.....	173
Tableau 14 – Incidence du flétrissement bactérien sur les huit variétés de pomme de testées.....	181
Tableau 15 – Résultat de l'analyse de variance des effets du facteur ‘variété’ et du facteur ‘souche’ sur la variable ‘AUDPC’	181
Tableau 16 – Tableau comparatif de la diversité génétique et épidémiologique des deux écotypes modèles : écotype ‘Brown rot’ et écotype ‘Africain’ présents dans les Hauts Plateaux de Madagascar.....	190

LISTE DES FIGURES

Figure 1	– Symptômes de flétrissement bactérien causés par le ceRs	26
Figure 2	– Classification par phylotype de ceRs	29
Figure 3	– Répartition géographique des souches du ceRs à Madagascar	29
Figure 4	– Flétrissement bactérien sévissant dans les parcelles de culture de pomme de terre	31
Figure 5	– Evolution de la production pomme de terre en tubercules et semences-tubercules à Madagascar de 1972 à 2014	31
Figure 6	– Illustration de l'analyse de polymorphisme multilocus	43
Figure 7	– Schémas représentant les différents types de variations génétiques	47
Figure 8	– Illustration de l'homoplasie	52
Figure 9	– <i>Ralstonia solanacearum</i>	57
Figure 10	– Distribution géographique des souches du ceRs	57
Figure 11	– Les écotypes de ceRs et leur correspondance phylogénétique	61
Figure 12	– Représentation du cycle infectieux théorique chez les souches du ceRs	61
Figure 13	– Symptômes et détection préliminaire du flétrissement bactérien	62
Figure 14	– Localisation des bassins et zones de production de pomme de terre à Madagascar	108
Figure 15	– Zones agroécologiques destinées à la culture de pomme de terre à Madagascar	108
Figure 16	– Stades de développement de la pomme de terre et des symptômes de flétrissement bactérien	110
Figure 17	– Symptômes de flétrissement apparaissant précocement, au début de développement des feuilles	110
Figure 18	– Matériels prélevés : plante flétrie, portion de tige prélevée sur un plant flétri, tubercule infectée	113
Figure 19	– Traitement des échantillons et travaux de microbiologie de campagne	115
Figure 20	– Colonies virulentes typiques d'une souche du ceRs sur milieu Kelman	115
Figure 21	– Gel d'électrophorèse montrant les produits PCR	119
Figure 22	– Localisation des marqueurs MLSA, RS3-MLVA16 et RS2-MLVA9 sur le génome des souches de phylotype III (CMR15) et IIB-1 (UW551)	121
Figure 23	– Conduite d'enquête épidémiologique	121
Figure 24	– Les différentes espèces de plantes hôtes et autres matériels prélevés	126
Figure 25	– Localisation des sites d'échantillonnage sur les Hauts Plateaux de Madagascar	127
Figure 26	– Les différents types de sol sur lesquels se cultivent la pomme de terre	127
Figure 27	– Fréquence des phylotypes identifiés sur les Hauts Plateaux centrales de Madagascar, sur un transect Nord au Sud, sur les espèces-hôtes échantillonnées, et selon l'altitude	129
Figure 28	– Arbre phylogénétique construit à partir de 447 séquences partielles du gène <i>egl</i> par la méthode de Neighbor-Joining	131
Figure 29	– Réseau phylogénétique et arbre phylogénétique basé sur 7 séquences-type du gène <i>egl</i> identifiés à partir de 447 séquences partielles	133
Figure 30	– Répartition (présence/absence) des différents sequevars (A) dans les ZAEs prospectées et (B) chez les espèces-hôte échantillonnées	133
Figure 31	– Arbre couvrant minimum (ACM1) obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) de 285 souches ceRs phylotype IIB-1 (C285)	137

Figure 32 – Arbres couvrant minimum obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) des souches ceRs phylotype IIB-1 isolées de quatre parcelles de culture (P2-Z1, P2-Z2, P2-Z3, P2-Z4)	137
Figure 33 – Arbre couvrant minimum (ACM2) obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) de 255 souches de phylotype IIB-1 (CMG-II)	138
Figure 34 – Représentation de la structure génétique à k populations de la collection de souches IIB-1 (CMG-II) isolée dans les principaux bassins de production de pomme de terre (10 ZAEs)	140
Figure 35 – Représentation de la répartition des 3 populations sur l'ACM2	141
Figure 36 – Inférence de la structure génétique des populations des souches ceRs Brown rot (IIB-1) dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches sur la base des données RS2-MLVA9	141
Figure 37 – Arbres phylogénétiques de maximum de vraisemblance basés sur des séquences partielles de sept loci individuels (<i>gdhA</i> , <i>gyrB</i> , <i>rplB</i> , <i>leuS</i> , <i>adK</i> , <i>mutS</i> , <i>egl</i>) et de séquences concaténées des sept loci.....	145
Figure 38 – Comparaison d'arbres phylogénétiques de maximum de vraisemblance basés sur des séquences partielles de sept loci individuels en tenant compte des régions nucléotidiques recombinantes (arbre initial) et en enlevant les régions recombinantes	147
Figure 39 – Réseau phylogénétique des séquences concaténées des sept gènes dans la collection C144 de souches de phylotype III.....	149
Figure 40 – Arbres couvrant minimums obtenus à partir des données de génotypage MLST (7 loci).	149
Figure 41 – Arbres couvrant minimums obtenus à partir des données de génotypage RS3-MLVA16 (16 loci).....	152
Figure 42 – Résultats de l'analyse de variance moléculaire et différenciation génétique intra et inter-collections	153
Figure 43 – Inférence de la structure génétique des populations des souches ceRs phylotype III dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches sur la base des données RS3-MLVA16.....	155
Figure 44 – Résultats de l'analyse de variance moléculaire et différenciation génétique intra et inter-populations	158
Figure 45 – Exploitation de Péleronum sur les Hauts Plateaux malgaches	161
Figure 46 – Plantation de 'Pok pok' (<i>Physalis sp.</i>) sur les Hauts Plateaux malgaches.	161
Figure 47 – Centres de production de tabac à Madagascar.....	162
Figure 48 – Dispositif expérimental, scarification des racines et inoculation.	175
Figure 49 – Evolution du flétrissement bactérien exprimée en pourcentage de plants flétris par nombre de jours après inoculation	177
Figure 50 – Représentation de l'AUDPC : AUDPC par souche, AUDPC par variété.....	178

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1** – Liste et caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.
- Annexe 2** – Description des loci TR, amorces, combinaisons multiplexes, et conditions PCR utilisés dans cette étude.
- Annexe 3** – Description des sept loci MLSA/MLST, amorces et conditions PCR utilisés dans cette étude.
- Annexe 4** – Liste des numéros d'accessions GenBank des séquences partielles de gènes MLSA/MLST.
- Annexe 5** – Modèle de fiche d'enquête épidémiologique.

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Richesse allélique
ACM	Arbre Couvrant Minimum
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AEZ	Agroecological Zone
AFLP	Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomaux
AMOVA	Analyse de variance moléculaire
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation
AUDPC	Surface sous la courbe de progression de maladie
BDB	Blood Disease Bacterium
BIC	Bayesian Information Criterion
BioNJ	Méthode Neighbor-Joining
CADM	Congruence Among Distance Matrices
CC	Complexe Clonal
CSA	Centre de Service Agricole
DL	Déséquilibre de liaison
DLV	Double locus variant
DO	Densité optique
CADM	Congruence Among Distance Matrices
CEFFEL	Centre d'Expérimentations et de Formations en Fruits et Légumes
ceRs	Complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>
CIP	Centre International de la Pomme de terre
CIPV	Convention Internationale sur la Protection des Végétaux
CIRAD	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
CITE	Centre d'Information Technique et Economique
CM	Cameroun
CMG	Collection de souches malgaches
CMP	Commission des Mesures Phytosanitaires
CNV	Polymorphisme de nombre de copies
CREF	Collection de souches de référence
Core-PdtM	Corpus de fonds génétiques de pomme de terre
CSA	Centre des Services Agricoles
DL	Déséquilibre de liaison
DLV	Deux locus variant
EPS	ExoPolySaccharides
ET3	Effecteurs de type III
FAO	Food and Agriculture Organization
F_{ST}, G_{ST}, R_{ST}	Indice de différentiation
FEDER	Fonds Européens de Développement Régional
FERT	Association française de coopération internationale pour le développement agricole des pays en développement et émergents
FIFAMANOR	Fiompana Fambolena Malagasy Norveziana - Centre de Développement Rural et de Recherche Appliquée
GPS	Géo-positionnement par satellite
Hap	Nombre d'haplotypes
HGDI	Indice de discrimination de Hunter et Gaston
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance

H_E	Indice de diversité génétique non biaisé de Nei
Hd	Diversité haplotypique
IAM	Infinite Alleles Model (Modèle de mutation des allèles infinis)
ITS	Espaceur interne transcrit
JAI	Jours après inoculation
LV	Locus variant
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MG	Madagascar
ML	Méthode de vraisemblance
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	MultiLocus Variable number of tandem repeat Analysis
MP	Méthode de Parcimonie
MT	Mlva-type
NJ	Neighbour-Joining
NPB	Non pathogène du bananier
P	Pourcentage de loci polymorphes
PCR	Amplification par polymérisation en chaîne
PFGE	Electrophorèse sur gel en champ pulsé
PHI	Pairwise Homoplasy Index
π	Diversité nucléotidique
Prob	Probabilité d'appartenance
POCT	Programme Opérationnel de Coopération Territoriale
R	Coefficient de corrélation de Mantel
RAPD	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe
RDP	Recombination Detection Program
Rep-PCR	PCR de séquences répétées
RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RSSC	<i>Ralstonia solanacearum</i> species complex
S	Nombre de sites polymorphes
Sing	Nombre de singltons
SCC	Sous-Complexe Clonaux
seq	Sequevar
SMSA	Modified semi-selective agar medium from South Africa
SLV	Single locus variant
SMM	Stepwise Mutation Model (Modèle de mutation pas à pas)
SOOI	Sud-Ouest de l'Océan Indien
SST3	Système de sécrétion type III
ST	(Mlst) Séquence-type
TR	Séquence répétée en tandem
UMR-PVBMT	Unité Mixte de Recherche Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
UPGMA	Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean
VNTR	Séquence répétée en tandem
ZAE	Zone agroécologique
ZW	Zimbabwe
W	Coefficient de concordance de Kendall

AVANT-PROPOS



À l'échelle globale, l'émergence et l'invasion des maladies infectieuses sur les cultures constituent un défi largement reconnu représentant une menace grandissante sur la sécurité alimentaire, avec des répercussions socio-économiques importantes. La grande famine de 1845-1849 en Irlande, due aux épidémies dévastatrices non maîtrisées du mildiou de la pomme de terre causé par le champignon *Phytophthora infestans*, reflète parfaitement les problématiques des épidémies de maladies infectieuses. A cette époque, la souche responsable de l'épidémie était méconnue entraînant l'absence de traitement spécifique et adapté contre le pathogène. La maladie a plongé l'Irlande dans une pénurie alimentaire à grande échelle, accentuant la misère rurale existante, affamant ainsi la population, la privant de toute possibilité de subsistance, et a causé de très lourdes pertes humaines. La gestion de l'épidémie reste encore aujourd'hui difficile à contrôler dû à l'instabilité génétique de ses populations à évolution rapide, compromettant le déploiement de variétés résistantes et des fongicides. La clé du mystère réside dans l'analyse de la structure génétique de ses populations (Andrivon, comm.pers. 2016).

De nos jours à Madagascar, une maladie bactérienne extrêmement sévère provoque le rapide déclin de la filière pomme de terre. Il s'agit d'une épidémie de flétrissement bactérien causée par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs), l'une des maladies bactériennes les plus graves de la pomme de terre entraînant le flétrissement et la mort de la plante. Avec le riz, la pomme de terre est une culture vivrière économiquement importante dans les Hauts Plateaux de Madagascar. La production nationale est aujourd'hui menacée par ces épidémies spectaculaires sources d'instabilité alimentaire majeure et qui compromettent les moyens d'existence des ruraux. La maladie fait des ravages dans l'ensemble des bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux et ne cesse aujourd'hui de gagner du terrain. Bien que des variétés de pomme de terre identifiées comme résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien soient cultivées, elles succombent aujourd'hui au syndrome de flétrissement. Cette situation alarmante a nécessité une vaste étude épidémiologique pour proposer à court terme des solutions de lutte, objet principal de cette thèse.

La gestion et le contrôle d'une épidémie implique la caractérisation au préalable de l'agent pathogène et une évaluation de sa diversité, puis la compréhension de la biologie des populations bactériennes impliquées et si possible leur évolution. Combiner les informations obtenues avec les données spatio-temporelles impliquées dans l'émergence et la distribution de l'agent pathogène doit permettre une bonne compréhension de principaux traits épidémiologiques, comme identifier les sources d'infections, les réservoirs d'inoculum et les modalités de transmission. *In fine* ces données permettront d'orienter la mise en œuvre des stratégies de lutte adaptées visant à atténuer ou réduire la densité et la propagation de l'inoculum.

Les sciences et techniques issues de la biologie moléculaire ont révolutionné de nombreux domaines de la microbiologie et l'épidémiologie des maladies infectieuses. Très rapidement, le génotypage est devenu une méthode de choix dans la caractérisation de l'agent pathogène. A l'aide des marqueurs moléculaires, il permet d'appréhender la diversité d'une population bactérienne en différenciant avec précision les isolats qui la compose selon leurs similitudes et leurs différences. L'identité génétique assignée pour chaque isolat permet ensuite d'aborder les relations de parenté et leur passé évolutif (phylogénie), la structure et dynamique des populations (biologie des populations), et les différentes questions biologiques liées à la dynamique de la maladie.

En préalable à cette thèse, les connaissances actuelles sur la biologie des populations des souches du ceRs prévalentes à Madagascar étaient limitées et très incomplètes. Elles ne permettaient en aucun cas un suivi épidémiologique. A l'issue de nos prospections et des efforts de collection et de typage de souches par les approches MLSA (analyse du polymorphisme nucléotidique de plusieurs séquences partielles de gènes fonctionnels polymorphes) et MLVA (analyse du polymorphisme de plusieurs locus de séquences répétées en tandem), complétés par les analyses bio-informatiques des données génétiques recueillies, cette thèse discute de la diversité génétique des souches du ceRs présentes dans les bassins de production, la structure génétique des populations, la distribution et la dissémination des souches du ceRs ; et des solutions agronomiques à recommander pour une meilleure gestion et contrôle de la maladie.

Ce manuscrit de thèse est organisé en quatre parties :

- Une **introduction générale** aux problématiques traitées dans ce travail. Nous présentons le contexte global et scientifique qui ont motivé la thèse, les questions de recherche auxquelles cette étude tentera de répondre, et les grandes lignes des différentes approches adoptées pour répondre aux objectifs de la thèse.
- Une **synthèse bibliographique** décrivant une vue générale de la technique du génotypage et les différentes exploitations possibles des données génétiques qui permettent de répondre aux objectifs posés, l'état de l'art des souches du ceRs, un état de l'art sur les systèmes de génotypage des souches disponibles, et d'indispensables notions sur la relation hôte-pathogène et la résistance au flétrissement bactérien.
- La **troisième partie** porte sur les travaux de recherche réalisés. Elle est constituée de **trois chapitres** distincts et complémentaires. Le **chapitre I** porte sur le développement d'un schéma MLVA pour le génotypage des souches du ceRs de phylotype III. Le **chapitre II** est dédié à l'analyse de la diversité génétique des souches du ceRs prévalentes dans les bassins de production et sur la structure des populations pour décrire l'épidémiologie du flétrissement bactérien. Le **chapitre III** rend compte des propriétés de résistance des variétés améliorées de pomme de terre cultivées à Madagascar vis-à-vis de souches représentatives de la diversité génotypique identifiée.
- La **dernière partie** du manuscrit est une **conclusion générale** et les **perspectives** qui découlent de mes travaux de recherche.

Résultats ayant donné lieu à publication

Ravelomanantsoa S, Robène I, Chiroleu F, Guérin F, Poussier S, Pruvost O, Prior P. (2016) A novel multilocus variable number tandem repeat analysis typing scheme for African phylotype III strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex. PeerJ 4 : e1949 <https://doi.org/10.7717/peerj.1949>

En préparation par S. Ravelomanantsoa *et al.*

- Genetic diversity and structure of the endemic *Ralstonia solanacearum* species complex phylotype III from Madagascar highlands.
- Emergence of exotic and epidemic ‘Brown rot’ strains in growing potato areas of Madagascar highlands (epidemiology and population structure).
- Pathogenicity of genetically diverse ceRs strains and susceptibility of some potato cultivars grown in Madagascar.

Communication à congrès

- ‘Brown rot’ strains of *Ralstonia solanacearum* caused devastating potato bacterial wilt in the highland of Madagascar in 11èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, Février 2014 (Poster S. Ravelomanantsoa).
- Epidemiology of potato bacterial wilt in Madagascar highlands: Genetic diversity and population structure of the *Ralstonia solanacearum* species complex (ceRs) in 12èmes Rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, France, Janvier 2016 (Talk S. Ravelomanantsoa).
- Insights into the recent outbreaks of potato bacterial wilt in Madagascar highlands: genotyping of the *Ralstonia solanacearum* species complex by MLVA in 6th International Bacterial Wilt Symposium, Toulouse, France, Juillet 2016 (Talk P. Prior).

Financement de la thèse

Cette thèse a reçu une allocation de recherche de doctorat de la Région Réunion et de l’Union Européenne, Programme Opérationnel de Coopération Territoriale (POCT) dans le cadre du Fonds Européens de Développement Régional (FEDER) ; et le soutien matériel et financier de l’Unité Mixte de Recherche Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (UMR-PVBMT) - CIRAD/Université de la Réunion.

INTRODUCTION GENERALE



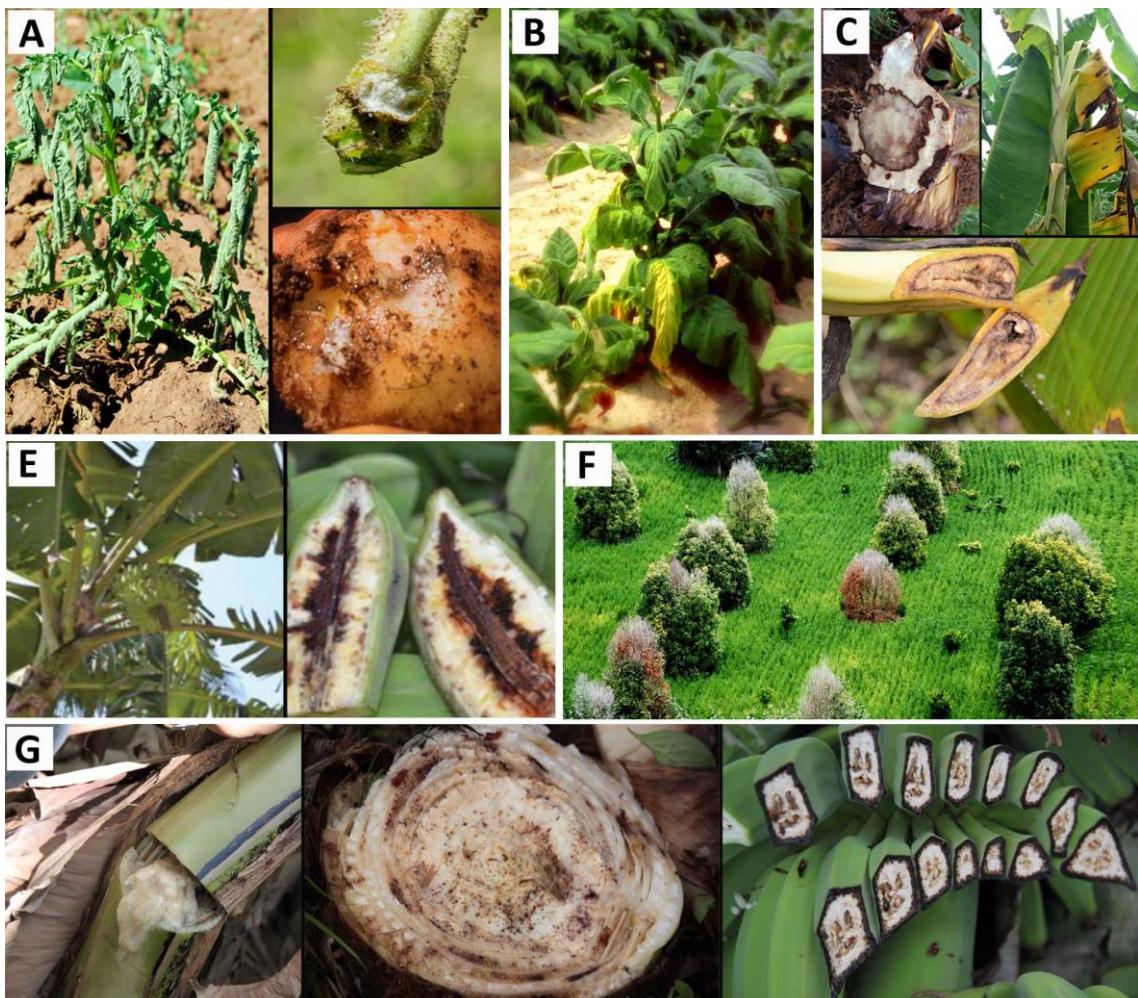


Figure 1 – Symptômes de flétrissement bactérien causés par le ceRs. (A) Pourriture brune de la pomme de terre. (B) Maladie de Granville du tabac. (C) Maladie de Moko. (D) Maladie de Bugtok. (E) Maladie de Sumatra chez le giroflier. (F) Maladie du sang chez le bananier. Crédits photos : (A) G. Cellier ; S. Ravelomanantsoa ; (B) <http://www.crosscreekseed.com>; (C) <http://farmextensionmanager.com/> ; <http://caricom.org> ; (F) <http://www.agroinsight.com/> ; (D) Talip et al. 2013 ; (G) <https://bananaroots.wordpress.com>.

‘A failure to monitor the spread of plant pests and diseases can have disastrous consequences on agricultural production and food security for millions of poor farmers’ : déclaration de Maria Helena Semedo, directrice générale adjointe de la FAO, chargée des Ressources naturelles, lors du meeting annuel de la Commission des Mesures Phytosanitaires (CMP), organe directeur de la Convention Internationale sur la Protection des Végétaux (CIPV), qui rassemble les meilleurs spécialistes en santé des plantes des 181 pays membres (Mars 2015).

Alors que le défi de l’agriculture du 21^{ème} siècle est d’augmenter la production de 70 % pour nourrir une population mondiale en forte croissance de plus de 9 milliards d’ici 2050 (FAO 2009), les menaces omniprésentes posées par les agents phytopathogènes – microorganismes qui provoquent des maladies chez les végétaux, constituent une contrainte majeure pour l’agriculture pouvant entraîner de sérieuses répercussions à long terme sur la production durable, la sécurité alimentaire et impacter l’économie mondiale. On peut évoquer ici quelques exemples classiques des conséquences désastreuses des maladies de cultures : • La grande famine en Irlande de 1845-1849 (Gráda & Eirksson 2006) évoquée précédemment a eu d’énormes impacts démographiques et économiques et de coûts humains. • La destruction complète des plantations de café en 1869 au Sri Lanka (Ceylan) par la rouille du café causée par le champignon *Hemileia vastatrix* (Kushalappa & Eskes 1989). Autrefois prospères, elles sont remplacées par la plantation de thé. • L’échec de la culture industrielle de l’hévéa au Brésil due à l’attaque du champignon *Microcyclus ulei* qui cause des brûlure des feuilles (Lieberei 2007). Pourtant berceau de l’hévéa, la culture est devenu complètement impossible au Brésil. • Les pertes importantes de récoltes dans des cultures de blé en Amérique du Nord vers les années 40 à cause de la rouille noire dont l’agent responsable est le champignon *Puccinia graminis tritici* (Carefoot & Sprott 1967). En 1999, une souche plus virulente nommée ‘Ug99’ a occasionné de lourds dégâts dans les cultures de blé d’Afrique de l’Est et constitue une menace réelle pour les autres pays producteurs de blé (Stone 2010). • Et récemment, la bactérie *Xylella fastidiosa* qui détruit les oliviers dans le Sud de l’Italie et qui constitue aujourd’hui une menace pour l’Europe (EPPO, Special Alert 2016).

Parmi les menaces pouvant compromettre la pérennité de l’agriculture d’aujourd’hui figure le **flétrissement bactérien causé par le complexe d’espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs)**. Elle figure parmi les maladies les plus dévastatrices des cultures vivrières et de rente à travers le monde, comme la pomme de terre, la tomate, le tabac, l’aubergine, le piment, la banane, le géranium, etc. (Elphinstone 2005a). La maladie est connue sous le nom de pourriture brune de la pomme de terre, maladie de Granville du tabac, maladie de Moko, maladie de Bugtok, maladie du sang chez le bananier, et le flétrissement du giroflier à Sumatra (**Figure 1**). Les pertes infligées aux champs et au stockage par le flétrissement bactérien peuvent être très lourdes. A titre d’exemple, récemment : • En Bolivie, les pertes de la récolte de pomme de terre sont signalées jusqu’à 75 % dans les zones à forte incidence et 100 % des pommes de terre entreposées (Castillo & Plata 2016). • En Malaisie, les pertes de rendement pour la culture de banane peuvent atteindre même jusqu’à 100 % (Tengku Ab. Malik *et al.* 2012). • Au Kenya, le flétrissement bactérien affecte plus de 70 % des exploitations de pommes de terre avec des pertes de rendement allant de 50 à 100 % (Muthoni *et al.* 2012). • En Ethiopie, une forte incidence du flétrissement bactérien est observée dans toutes les régions de culture du gingembre avec une importante perte estimée à 100 % (Habetewold kifelew *et al.* 2015).

Les souches qui unifient le ceRs sont structurées en quatre lignées phylogénétiques distinctes (phylogenotypes) correspondant aux souches originaires d’Asie (I), des Amériques (II), d’Afrique (III) et d’Indonésie (IV) (Prior & Fegan 2005) (**Figure 2**). L’ensemble de ces souches posent de très sérieux

problèmes agronomiques et économiques en raison de leur exceptionnelle gamme de plantes hôtes, leur large répartition géographique, leur capacité de survie, et la diversité génétique associée (Álvarez *et al.* 2010 ; CABI 2016 ; EPPO 2015). La dispersion d'un tel agent pathogène pose problème notamment s'agissant d'un organisme nuisible réglementé qui fait l'objet de mesures de quarantaine (Directive 2000/29/CE dans la zone de l'Union Européenne (EPPO 2015) et qui est sur la liste des agents potentiels de bioterrorisme aux Etats-Unis (USDA/APHIS 2005). Entre autres, le ceRs fait l'objet d'une épidémirosurveillance dans les pays où la maladie sévit et figure parmi les bactéries phytopathogènes vasculaires les plus étudiées (Mansfield *et al.* 2012).

Les souches du ceRs sont présentes à Madagascar.

Signalées pour la première fois en 1934 par Bourriquet (1946) sur des cultures de tabac, le flétrissement bactérien est observé dans les zones maraîchères des Hauts Plateaux, des côtes Ouest et Est de Madagascar (**Figure 3**) à l'état **endémique** avec une incidence significative sur les cultures maraîchères telles que la tomate, l'aubergine, le tabac, l'arachide, le haricot ou la pomme de terre, (Rasolofo 1965). La pomme de terre est une culture vivrière et économiquement importante à Madagascar. Elle est cultivée sur plus de 50 000 Ha (CEFFEL 2014) en trois saisons sur '*tanety*'¹ : culture pluviale (Novembre-Mars) et culture intermédiaire (Janvier-Mai), sur '*baiboho*'², plaines et rizières : culture de décrue ou contre-saison (Avril-Octobre). Le flétrissement bactérien se rencontre habituellement sur les cultures pluviales plantées sur les '*tanety*' d'altitude (1200-1700m) en période chaude et humide (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988 ; Rakotondramanana 1984) (données FIFAMANOR³). Elle se manifeste au stade d'initiation des tubercules et/ou stade de floraison de la pomme de terre. Durant des années, le flétrissement bactérien a été contrôlé par l'utilisation de semences saines, l'application de la rotation des cultures, et l'utilisation de variétés résistantes/tolérantes issues de la sélection de variétés améliorées – des accessions provenant du CIP⁴ et sélection réalisée depuis plusieurs années par FIFAMANOR. Une dizaine de variétés de pomme de terre estimées résistantes/tolérantes ont été, à cet effet, diffusées auprès des agriculteurs.

Cependant depuis 2009, **une épidémie de flétrissement bactérien sévit dramatiquement dans le bassin de production de pomme de terre** de la Région Vakinankaratra. La fréquence est accrue chez les cultures de contre-saison cultivées sur rizières et sur sols volcaniques (données FIFAMANOR) où la maladie n'avait jamais été observée et avec d'inhabituelles périodes de développement des symptômes (GRET/CITE 2000 ; MAEP-UPDR 2004a ; Rabakorihanta & Rakotondramanana 1984 ; Rakotondramanana 1984). Les symptômes apparaissent et se développent très tôt, au stade d'émergence complète et/ou au stade de développement végétatif. Les pertes aux champs sont importantes pouvant aller de 20 à 100 % et la maigre récolte est inapte à la conservation, à l'alimentation et à la commercialisation car les tubercules pourrissent rapidement (Andriamihaja 2013, enquêtes FIFAMANOR). Ces sept dernières années, **le flétrissement bactérien ne cesse de gagner du terrain et progresse dans l'ensemble des bassins primaires de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches, et également dans quelques zones d'extension (Figure 4).**

¹ Sols des plateaux et collines de type ferrallitique et à pH acide.

² Sols alluvionnaires laissés après la décrue, se situant le long des cours d'eaux.

³ Crée en 1972, c'est un centre national de recherche qui œuvre pour la promotion de la culture de pomme de terre à Madagascar.

⁴ Centre International de la pomme de terre, Lima - Pérou ; <http://cipotato.org/>.

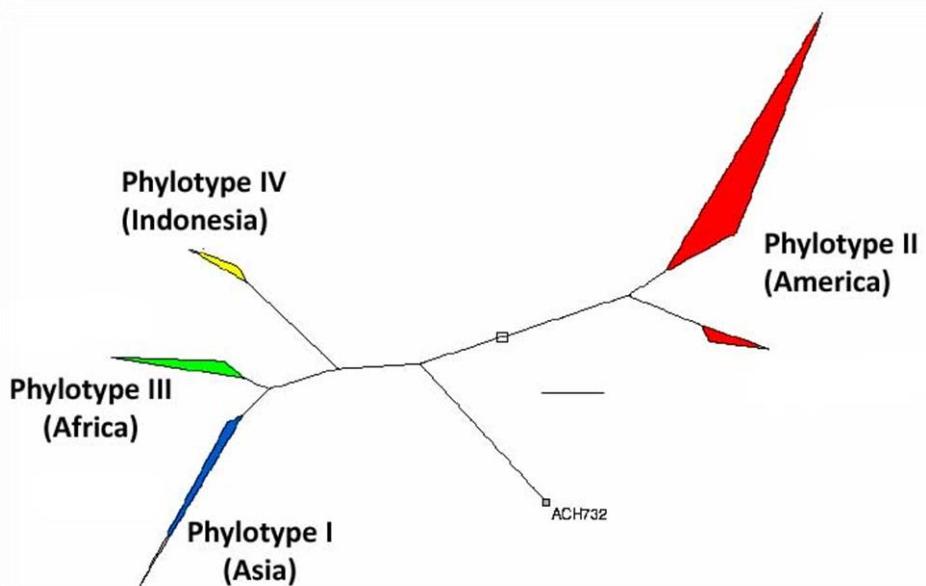


Figure 2 – Classification par phylotype de ceRs. Arbre phylogénétique construit à partir des données de séquences partielles du gène *mutS*. Figure adaptée de Prior et Fegan (2005).



Figure 3 – Répartition géographique des souches du ceRs à Madagascar. Source : <http://www.agriculture-biodiversite-oi.org>

Des données d'enquêtes récentes ordonnées par le Ministère de l'Agriculture malgache et la FAO ont révélé l'attaque du flétrissement bactérien dans la presque totalité des zones de production (FAO 2014 ; MinAgri 2015). La situation actuelle est alarmante avec un risque imminent de pandémie nationale. En pleine reconstruction après une sévère épidémie de mildiou non contrôlée vers 2003 – avec une chute flagrante d'environ 30 % de la production en tubercules et tubercules semences au niveau nationale (**Figure 5**) (FAOSTAT 2016), la filière pomme de terre à Madagascar demeure encore vulnérable. Cette recrudescence de flétrissement bactérien risque fort bien de la mettre en péril, repousse les efforts visant à assurer un bon niveau de sécurité alimentaire et donc la santé économique de Madagascar. Les agriculteurs sont aujourd'hui dans le désarroi total et abandonnent progressivement la culture. Dans ce contexte, la gestion du flétrissement bactérien est devenue une préoccupation d'ampleur nationale car les enjeux sont importants : • La pomme de terre contribue à la diversification alimentaire en zone urbaine, et complémente ou substitue le riz (base de l'alimentation) pendant la période de soudure (période où les récoltes précédentes sont épuisées et les nouvelles pas encore récoltées) en zone rurale (Andriamihaja 2013 ; GRET/CITE 2000 ; Rasolo *et al.* 1987). • C'est un des produits phares des Hauts Plateaux malgaches, notamment de la région Vakinankaratra qui produit environ 670 000 tonnes par an dont 40 % sont destinés pour la consommation et 60 % pour la vente (MinAgri 2015). Au niveau national, La pomme de terre est identifiée comme étant une filière d'exportation porteuse. En effet, Madagascar a exporté vers les îles voisines telles que les Comores, Maurice, Réunion, Mayotte, Seychelles (Lexp.mu 2004 ; Monty 2012 ; Rasolo *et al.* 1987). • La production nationale de tubercules semences de pomme de terre se retrouve aujourd'hui contrainte par le flétrissement bactérien. Les principales stations de production de tubercules semences sont malheureusement affectées par la maladie (données FIFAMANOR). L'indisponibilité en tubercules semences saines ne fait qu'aggraver la situation phytosanitaire à Madagascar car les producteurs ont recours à des tubercules semences non certifiées 'indemnes'. • Les terrains infestés sont devenus impropre à la culture non seulement de la pomme de terre mais aussi d'autres Solanées comme la tomate. Ce qui réduit les surfaces exploitables. • Il n'existe pas de lutte curative, et une des seules alternatives, la lutte *via* l'utilisation de variété résistante peut être compromise par une grande variabilité génétique du pathogène. Les variétés de pomme de terre historiquement éprouvées comme résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien succombent aujourd'hui à la maladie (données FIFAMANOR et enquêtes en 2013). La situation épidémiologique du flétrissement bactérien sur les cultures de pomme de terre sur les Hauts Plateaux malgaches a sans nul doute évoluée. **Quels sont les déterminants de la dynamique des épidémies de flétrissement bactérien dans les bassins de production** ? Voilà une question à laquelle nous allons tenter de répondre dans ce travail de thèse, *in fine* en vue d'orienter les décisions liées au développement de stratégies de contrôle efficaces contre cette maladie.

Mieux comprendre la maladie pour mieux la gérer.

En épidémiologie végétale, trois facteurs interviennent dans l'apparition d'une maladie : une population d'agents pathogènes virulents, un peuplement de plantes hôtes sensibles et des conditions environnementales favorables à l'expression de la maladie. L'ensemble évoluera dans un cadre spatio-temporel dont l'échelle d'étude restera à préciser. Une épidémie résulte de la rupture de l'équilibre de ce système tripartite. Elle désigne la propagation rapide de l'incidence d'une maladie dans une zone géographique donnée. S'agissant de la gestion des espaces cultivées, les interventions de l'homme dans ce système tripartite sont largement documentées (Agrios 2005 ; Lepoivre 2003). La compréhension de tout système épidémique complexe nécessite de caractériser différentes composantes liées à la biologie du pathogène, la génétique des populations, l'interaction hôte-pathogène, les modes de contamination et de propagation, etc.



Figure 4 – Flétrissement bactérien sévissant dans les parcelles de culture de pomme de terre. Crédits photos : G. Cellier ; S. Ravelomanantsoa.

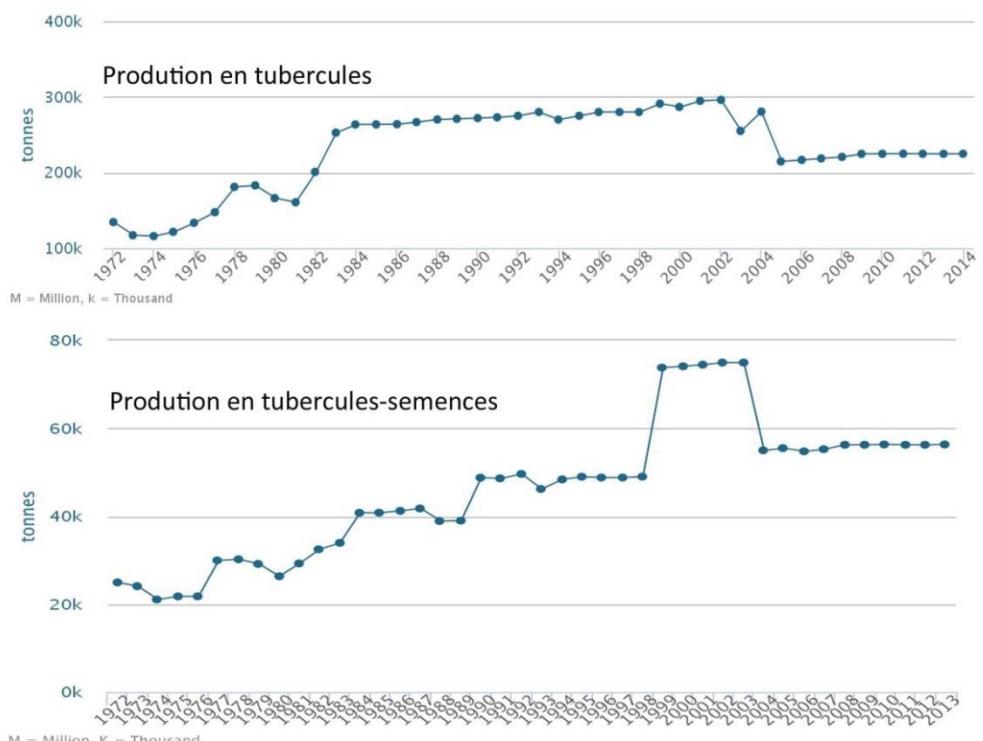


Figure 5 – Evolution de la production pomme de terre en tubercules et semences-tubercules à Madagascar de 1972 à 2014. Une chute de production est observée en 2004 qui coïncide avec le début d'épidémie de flétrissement bactérien qui s'est développée dans le bassin de production de la région Vakinankaratra. Source FAOSTAT 2016.

Connaitre et comprendre la diversité génétique est un préalable pour aborder la dynamique d'une épidémie.

La situation épidémiologique actuelle du flétrissement bactérien nous laisse extrêmement perplexe et d'évidence rend urgent et indispensable une vaste étude sur la diversité des souches du ceRs présentes dans les bassins de production de la pomme de terre. Ce prérequis est la base de toute stratégie de lutte qui pourrait être déployée en y associant des variétés résistantes/tolérantes à la maladie. En ce qui concerne les souches du ceRs présentes à Madagascar, très peu de données génétiques sont disponibles à ce jour. L'état des connaissances sur la diversité des souches malgaches est limité, depuis longtemps, à des données historiques de classification ancienne : en race physiologique en fonction du spectre d'hôtes et en biovar selon leur aptitude à métaboliser divers sucres et à dénitrifier les nitrites (Hayward 1994). Les travaux de références sur la diversité des souches malgaches ont montré une prédominance de souches race 1, biovar 1 (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988 ; Rahetlah 2008 ; Randriamampianina 1997 ; Randrianangaly 2003) qui affectent une diversité d'hôtes comme la pomme de terre, la tomate, l'aubergine, le tabac, l'arachide, le haricot, etc. (Rasolofo 1965). Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra (1988) avaient supposé, par ailleurs, l'existence d'un groupe particulier de souches encore non décrites assigné race 3 biovar 1, phénotypiquement proche des souches 'Brown rot' de race 3 biovar 2 (actuellement IIB-1) qui sont absentes à Madagascar. Nous savons aujourd'hui que ces souches décrites comme race 3 biovar 1 tombent dans le phylotype III Africain (Poussier *et al.* 2000). La classification en race 1 biovar 1 semble en revanche flou. En effet, les souches race 1 biovar 1 peuvent tomber dans deux groupes génétiques différents du phylotype II : IIA ou IIB. Bien que le système de différenciation en race/biovar rende compte de la diversité des souches du ceRs présents à Madagascar, il n'a pas de valeur taxonomique. A l'issu d'une caractérisation moléculaire d'une petite collection de souches malgaches ($n = 29$) récupérée sur une altitude comprise entre 12 m (sur divers solanées) et 1600 m (sur pomme de terre), Prior *et al.* (non publiés) ont confirmé la présence du phylotype III (signalé comme race 3 biovar 1) décrites antérieurement. Ce travail a en outre permis une première description de la présence des souches du ceRs du phylotype I, isolées en zone de plaine de basse altitude (15 à 30 m) mais également à 1321 m. Les souches du phylotype II et les souches de quarantaine IIB-1 n'ont aucunement été identifiées. La connaissance sur la diversité génétique du ceRs à Madagascar n'est en conséquence que fragmentaire. Cette situation atteste de l'urgence à disposer d'un référentiel complet sur le statut du flétrissement bactérien de la pomme de terre à Madagascar, notamment dans les régions productrices de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches.

Aborder les questions biologiques sous-tendant la diversité génétique et l'épidémiologie moléculaire nécessite des outils efficaces et robustes avec lesquels on peut décrire de subtiles variations génétiques. L'avènement des techniques de biologie moléculaire a beaucoup contribué à des avancées majeures dans le domaine de la pathologie et l'épidémiologie végétale. A l'aide de marqueurs moléculaires, les différentes techniques de génotypage sont devenues aujourd'hui incontournables dans la compréhension des maladies. Fiables, elles fournissent entre autres des informations uniques et significatives sur la variabilité génétique de l'agent pathogène dans l'espace et dans le temps. Ces données sont nécessaires pour mettre en œuvre des mesures de gestion appropriées des maladies infectieuses. Diverses études ont démontré les potentialités d'une analyse génétique dans divers sujets tels

- l'identification du pathogène, la biologie et génétique des populations, la phylogénie et la génétique évolutive ;
- répondre aux questions soulevées par l'épidémiologie des maladies infectieuses ;
- la surveillance des maladies infectieuses. Les informations qui en découlent ont contribué considérablement à l'extension des connaissances en pathologie et surtout à l'amélioration des stratégies de lutte.

Pour illustrer, citons deux importants cas d'étude :

- Epidémies violentes de la maladie à virus

Ebola en Afrique de l’Ouest : Les analyses génétiques du virus Ebola – responsable d’une maladie aigüe et mortelle chez l’homme, ont apporté des lumières sur le réservoir naturel, potentiellement issu des chauves-souris (Leroy *et al.* 2005) et identifié en Afrique Centrale (Gire *et al.* 2014) ; sur le mode transmission (Gire *et al.* 2014) ; et l’existence de multiple variantes génétiques avec une accumulation rapide de variation génétique inter et intra-hôte (Baize *et al.* 2014 ; Gire *et al.* 2014 ; Tong *et al.* 2015).

• Maladie du charbon : Les données génétiques de la bactérie *Bacillus anthracis* – agent infectieux de la maladie meurtrière ‘anthrax’ pouvant affecter aussi bien l’animal que l’homme et considérée comme un potentiel arme de bioterrorisme, ont permis de décrire sa diversité mondiale (Van Ert *et al.* 2007) ; et ses relations phylogénétiques (Derzelle *et al.* 2015) ; ses modes de transmission (Van Ert *et al.* 2007) ; et de retracer l’origine des souches dans les pays affectées (Alim *et al.* 2010 ; Derzelle & Thierry 2013). Les analyses génétiques ont également permis d’identifier la souche virulente ‘Ames’, véhiculée par courrier empoisonné à l’anthrax aux Etats-Unis en 2001 (Van Ert *et al.* 2007) ; et de remonter à l’origine de la souche, isolée en 1981 au Texas sur le cadavre d’une vache.

Une multitude de techniques de génotypage sont aujourd’hui disponibles pour différencier les souches et les populations constituées au sein d’une espèce bactérienne pathogène. Elles se distinguent chacune des unes aux autres par leur portabilité et rapidité de mise en œuvre, le degré de résolution, les domaines d’application, leur coût à la mise en œuvre (Sabat *et al.* 2013 ; Schlotterer 2004 ; van Belkum *et al.* 2001). Le choix d’une technique appropriée dépend cependant des objectifs poursuivis. Aujourd’hui, les techniques de **MLSA** et **MLVA** sont deux méthodes de génotypage de plus en plus utilisées pour caractériser les agents pathogènes de façon robuste. Elles ont l’avantage d’être discriminantes, rapides, spécifiques et portables. Diverses études ont démontré que la MLSA est essentiellement utilisée pour construire une phylogénie plus fiable de souches éloignées génétiquement et pour une analyse épidémiologique globale ; tandis que la MLVA, généralement plus discriminante que la MLSA, est plus appropriée pour une analyse épidémiologique fine réalisée sur des souches relativement proches, autrement dit épidémiologiquement liées (Achtman 2008 ; Essakhi *et al.* 2015 ; Lindstedt 2005 ; Lindstedt *et al.* 2013 ; Maiden 2006 ; Maiden *et al.* 1998 ; Sabat *et al.* 2013 ; Scholz & Vergnaud 2013). Ces deux techniques de génotypage seront utilisées dans nos travaux pour aborder les questions biologiques énoncées dans cette thèse.

Rapport Gratuit.Com

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



EPIDÉMIOLOGIE MOLECULAIRE

En pathologie végétale, une **épidémie** désigne une maladie infectieuse déclenchée par un agent pathogène, qui se manifeste sous forme de poussées soudaines et inhabituelles et se propage rapidement dans une région ou population végétale donnée pendant une période donnée (Rapilly 1991). Elle touche alors une part importante de la production et l'incidence de la maladie augmente de manière significative par rapport à la situation sanitaire habituelle, entraînant des conséquences phytosanitaires dramatiques. Il peut arriver qu'une épidémie disparaît pendant très longtemps. Dans le cas où la maladie est présente en permanence et dont l'incidence apparaît de façon constante dans une population donnée ou une région précise (foyers infectieux), on a une **endémie**. Cet état est souvent associé à une coévolution de l'agent pathogène et son hôte sur de longues périodes de temps. Un déséquilibre du système épidémiologique peut induire une endémie à un état d'épidémie. Enfin, une épidémie est qualifiée de **pandémie** lorsqu'elle touche une très large population sur un vaste territoire géographique, généralement à l'échelle mondiale.

Le concept du ‘tétraèdre épidémiologique’ rend compte que différents facteurs contribuent dans le développement d'une épidémie :

- Des facteurs liés à l'agent pathogène comme la diversité intra et inter-populations, évolution naturelle de l'agent pathogène par mutation ou sélection naturelle, le pouvoir pathogène, la densité d'inoculum, le potentiel invasif, etc.
- Des facteurs liés à l'hôte comme un pool génétique homogène, le degré de résistance, l'âge de la plante et son état physiologique, etc.
- Des facteurs liés à l'environnement comme la température, l'humidité, l'eau, les caractéristiques du sol, les vecteurs biologiques, etc.
- Des facteurs anthropiques comme les pratiques agricoles, échange et commerce de matériel végétal infecté, etc. qui favorisent souvent la dispersion de l'agent pathogène (Agrios 2005 ; Lepoivre 2003).

En épidémiologie, on recherche à comprendre l'histoire de la maladie, notamment en apportant un éclairage sur

- la nature de l'agent pathogène responsable de l'épidémie ;
- les sources et réservoirs possibles d'inoculum ;
- les modes et mécanismes de dispersion de l'agent pathogène, et
- la prévalence des types particuliers d'une espèce d'agent pathogènes.

Dans cette optique, l'épidémiologie repose en premier lieu sur la caractérisation de la diversité de l'agent pathogène qui constitue le premier maillon du système épidémiologique. En effet, la diversité génétique des agents pathogènes a toujours constitué un des importants facteurs compromettant tout succès de lutte génétique. Leur capacité à contourner la résistance des plantes hôtes, leur faculté d'adaptation et de dispersion rapide témoignent, parmi d'autres, leur diversité génétique. Dans ce concept de diversité génétique, il faut porter également notre regard sur la structure de ses populations. Certes dans le milieu naturel, les individus se développent en populations. Chaque population est caractérisée par un patrimoine génétique et possède une dynamique évolutive propre. Les populations sont susceptibles d'interagir entre elles au cours du temps, le plus souvent par des échanges génétiques. Leur capacité de développement et leur diversification sont conditionnées par différents mécanismes d'évolution menant à leur structuration et leur permettant de maintenir ou de créer une variation génétique qui leurs sont utiles pour s'adapter aux conditions du milieu. La dynamique d'une épidémie (progression de la maladie et son organisation spatiale) est alors associée avec la dynamique des populations d'agents pathogènes. La connaissance de la structure des populations de l'agent pathogène conditionne toute stratégie d'intervention pour le contrôle d'une épidémie.

Depuis que les outils de biologie moléculaire et de séquençage sont accessibles, le problème de diversité génétique des agents pathogènes est facilement appréhendé par le recours à la technique du **génotypage**, devenue aujourd’hui incontournable comme moyen d’investigation rapide pour mieux appréhender les maladies infectieuses dans ses multiples facettes. On parle alors d’**épidémiologie moléculaire**. Grâce aux **marqueurs moléculaires**, l’analyse du **polymorphisme génétique** permet de rendre compte des aspects de la **diversité génétique** d’un agent pathogène responsable d’une maladie infectieuse, de définir le profil de la **structure des populations** impliquées dans l’infection, d’étudier leur **interactions avec l’hôte**, d’expliquer l’occurrence d’une épidémie en un lieu donné, et de suivre son **évolution** dans le temps et dans l’espace avec les diverses pressions sélectives exercés par l’environnement difficiles auparavant à appréhender.

Tableau 1 – Evolution chronologique de développement de marqueurs ADN (Adapté de Maheswaran 2004).

Année	Acronyme	Nomenclature
1974	RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
1985	VNTR	Variable Number Tandem Repats
1986	ASO	Allele Specific Oligonucleotides
1988	AS-PCR	Allele Specific Polymerase Chain Reaction
	OP	Oligonucleotide Polymorphism
1989	SSCP	Single Stranded Conformational Polymorphism
	STS	Sequence Tagged Site
1990	RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
	AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
	STMS	Sequence Tagged Microsatellite Sites
1991	RLGS	Restriction Landmark Genome Scanning
1992	CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
	DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primer - PCR
	SSR	Simple Sequence Repeats
1993	MAAP	Multiple Arbitrary Amplicon Profiling
	SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
1994	ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
	SAMPL	Selective Amplification Of Microsatellite Polymorphic Loci
	SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
1995	AFLP (SRFA)	Amplified Fragment Length Polymorphism (selective Restriction Fragment Amplification)
	ASAP	Allele Specific Associated Primers
1996	CFLP	Cleavase Fragment Length Polymorphism
	ISTR	Inverse Sequence-tagged Repeats
1997	DAMD-PCR	Directed Amplification Of Mini Satellite DNA-PCR
	S-SAP	Sequence-specific Amplified Polymorphism
1998	RBIP	Retrotransposon Based Insertional Polymorphism
1999	IRAP	Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism
	REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
	MSAP	Methylation Sensitive Amplification Polymorphism
2000	MITE	Miniature Inverted-repeat Transposable Element
	TE-AFLP	Three Endonuclease AFLP
2001	IMP	Inter-MITE Polymorphisms
	SRAP	Sequence-related Amplified Polymorphism

I. GENOTYPAGE BACTERIEN

Chaque individu est caractérisé par une composition génétique qui lui est propre, appelée génotype. Le génotype désigne l'ensemble des gènes d'un individu à un ou plusieurs locus particuliers qui peut comporter différentes formes alléliques conduisant au polymorphisme génétique dans un groupe d'individus. En interaction avec l'environnement, le génotype agit sur l'ensemble des caractères observables ou détectables d'un individu – désignés comme étant le phénotype (Hartl *et al.* 1997 ; Lepoivre 2003).

Le génotypage consiste en **l'identification des caractères génétiques** communs à l'espèce mais qui présentent des variations au sein de cette espèce, permettant ensuite de **différencier** les individus entre eux. La méthode de génotypage la plus aboutie et la plus fidèle reste le séquençage et la comparaison de génomes complets, mais elle est onéreuse et surtout encore difficile de mise en œuvre (en tout cas dans le domaine de la recherche agronomique) pour étudier de grands effectifs de souches impliquées dans des épidémies (Field *et al.* 2004). Ceci a nécessité de développer des méthodes réalisables en routine : plus simples et rapides. Les méthodes de génotypage utilisées actuellement sont basées sur l'analyse de séquences spécifiques du génome bactérien, appelées '**marqueurs moléculaires**'. Il s'agit d'objets génomiques d'intérêts, car stables et recrutés pour être indépendants des variations environnementales. Le génotypage **permet d'attribuer un profil génétique à un individu donné** et de mettre en évidence les relations génétiques entre souches pathogènes de la même espèce.

MARQUEURS MOLECULAIRES COMME OUTIL D'INVESTIGATION

Un **marqueur moléculaire** correspond à un fragment d'ADN ou locus déterminé sur le génome et partagé par des individus d'une même espèce, et qui a la vocation d'être transmis de génération en génération. En se basant sur la définition d'un marqueur moléculaire idéal, avancé par de Vienne (1998) et Maheswaran (2004) ; un bon marqueur moléculaire pour le génotypage bactérien devrait être • suffisamment polymorphe i.e. qui présente plusieurs allèles (multiallélique) et varie d'un génome à l'autre (plusieurs variants à un locus donné) permettant de différencier des individus très proches ; • non épistatique i.e. le génotype en un locus est indépendant du génotype à d'autres loci ; • réparti régulièrement dans l'ensemble du génome physique ; • neutre (différents allèles ne doivent pas avoir d'effet sur le phénotype de l'individu) ; • détectable sur un grand nombre d'individus étudiés.

De nombreux marqueurs moléculaires ont été développés avec des applications diverses allant de la cartographie du génome et des gènes, l'étiquetage génétique, la sélection assistée par marqueurs, à l'analyse de diversité génétique, la biologie et génétique des populations et études d'évolution, d'épidémiologie, etc. (Maheswaran 2004 ; Schlotterer 2004b). Le choix des marqueurs dépend de ce fait de l'objectif scientifique précis assigné. Le pouvoir de résolution d'un marqueur réside dans sa vitesse de mutation : plus elle est rapide (horloge moléculaire rapide), plus la capacité du marqueur à différencier des types génétiques est forte. Le **Tableau 1** donne un résumé de l'évolution chronologique du développement de marqueurs moléculaires.

TECHNIQUE DE GENOTYPAGE

Avec l'avènement des marqueurs moléculaires, une multitude de méthodes de génotypage sont aujourd'hui disponibles pour différencier les souches et les populations au sein d'une espèce bactérienne donnée. L'objectif d'une méthode de génotypage est de mettre en évidence les caractères variables au sein d'une espèce cible. On peut classer ces méthodes en trois catégories, basées sur la restriction enzymatique, l'amplification génique par polymérisation en chaîne ou PCR, le séquençage de l'ADN (Bidet & Bingen 2012 ; Li *et al.* 2009 ; van Belkum *et al.* 2007).

Les méthodes basées sur la restriction enzymatique consistent en la digestion des acides nucléiques (ADN, ARN) par une ou plusieurs enzymes de restriction qui découpent les gènes en fragments de taille différentes aux niveaux des sites de reconnaissance spécifiques. Dans cette catégorie, on distingue :

- la méthode d'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (**RFLP**) où les fragments séparés après électrophorèse sont hybridés avec une sonde ADN (technique de Southern) (Southern 1975) ;
- le **ribotypage** utilisant des gènes codant pour les ARN ribosomaux (ARNr) comme sondes (Bingen *et al.* 1994),
- et la technique d'électrophorèse en champ pulsé (**PFGE**) qui est une variante de la méthode RFLP. (Herschleb *et al.* 2007).

Les méthodes basées sur l'amplification génique utilisent la technique d'amplification par polymérisation en chaîne ou **PCR**, qui consiste à dupliquer en grand nombre (un facteur d'un milliard) un segment de matériel génétique (à partir d'une faible quantité de l'ordre du picogrammes). On distingue :

- l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (**RAPD**) basée sur l'amplification d'une matrice génomique par une amorce unique choisie aléatoirement (Williams *et al.* 1990), une méthode qui n'est pratiquement plus utilisée aujourd'hui ;
- la méthode d'analyse du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (**AFLP**) (Vos *et al.* 1995) ;
- la méthode **PCR-RFLP** basée sur la digestion du produit PCR par une ou des enzymes de restriction ;
- les méthodes PCR de séquences répétées (**Rep-PCR**) dont le principe est basé sur l'amplification des zones à répétitions (REP, ERIC, BOX) qui sont dispersées dans le génome (Gilson *et al.* 1984 ; Hulton *et al.* 1991 ; Koeuth *et al.* 1995 ; Lupski & Weinstock 1992 ; Stern *et al.* 1984 ; Versalovic *et al.* 1991) ;
- et la méthode **MLVA** basée sur l'amplification de plusieurs locus de séquences répétées en tandem (VNTR).

Les méthodes basées sur le séquençage de l'ADN concernent généralement le séquençage partiel d'un ou plusieurs gènes conservés et polymorphes. L'étude concerne donc l'analyse des variations nucléotidiques au niveau des loci cibles. Les marqueurs couramment utilisés sont :

- **les gènes de la région ITS** : ARNr 16S et 16S-23S qui sont présents chez les bactéries ;
- **les gènes de ménages** non soumis à pression de sélection et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules ;
- **les gènes associées à la virulence** qui sont assez polymorphes (Li *et al.* 2009 ; Yıldırım *et al.* 2011).

La valeur de chaque méthode dépend des performances attendues, de sa praticabilité et des domaines d'application pour lesquels elle a été développée (Sabat *et al.* 2013 ; Schlotterer 2004 ; Struelens 1996 ; van Belkum *et al.* 2007).

Critères de performance

1. **La typabilité** : c'est la capacité à attribuer un génotype à toutes les souches typées. C'est le pourcentage de souches assignées à un génotype sur le nombre total de souches testées.
2. **Le pouvoir discriminant** : c'est la capacité d'une méthode à attribuer un génotype différent à deux souches n'ayant aucun lien épidémiologique, choisies au hasard au sein d'une population d'une espèce donnée. C'est une qualité importante recherchée pour un système de génotypage. Il est exprimé par l'indice de discrimination de Simpson (Simpson 1949) modifiée par Hunter et Gaston (Hunter & Gaston 1988) : $HGDI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$, où N représente le nombre total de souches du panel d'échantillons, S est le nombre total de génotypes décrits, n_j indique le nombre de souches appartenant au $j^{\text{ème}}$ génotype. Une valeur de $HGDI$ proche de 1 indique un fort pouvoir discriminant du système de génotypage.
3. **La reproductibilité** : c'est la capacité de la méthode à attribuer le même génotype à un isolat testé lors d'essais indépendants intra- et inter-laboratoires. Dans ce cas, il faut tenir compte de l'influence des différentes étapes impliquées dans le génotypage d'une souche par une méthode donnée comme dans la préparation du matériel génétique (par exemple, la variation du milieu de culture des souches ou de la méthode d'extraction de l'ADN) ; dans l'utilisation de différents ou même réactifs et équipements ; dans l'observation, l'enregistrement et l'interprétation des résultats. A ce propos, il faut disposer d'un protocole standardisé visant à fournir une méthode de génotypage fiable.
4. **La stabilité** : c'est la capacité à reconnaître la relation clonale des isolats dérivés d'une souche ancestrale commune, en dépit des variations qui peuvent survenir au cours de la conservation et de la réplication.
5. **La concordance épidémiologique** : c'est la capacité de faire des groupes de parenté et d'établir un niveau de parenté en accord avec le profil épidémiologique connu.
6. **La concordance avec d'autres méthodes de génotypage**. Il est intéressant d'évaluer pour les méthodes de génotypage utilisées, si les souches fortement similaires sont regroupées ou présentent une relation clonale avec d'autres méthodes.

Critères de praticabilité

7. **La flexibilité** de la méthode de typage pour une gamme d'espèces bactériennes, i.e. que le principe et les aptitudes et les équipements requis sont identiques même avec des modifications mineures du protocole.
8. **La rapidité** : le génotypage doit idéalement être effectué en 'temps réel' avec des résultats disponibles dans un laps de temps le plus court possible.
9. **L'accessibilité** qui dépend fortement sur la disponibilité des réactifs et des équipements, ainsi que les compétences requises.
10. **La facilité d'emploi** qui fait référence à la simplicité des manipulations, à l'adéquation à traiter un nombre élevé d'échantillons, à la facilité d'interprétation et au coût de la méthode, à la possibilité de lancer des analyses informatisées à partir des résultats obtenus de génotypage et de les stocker dans une banque de données informatique. Cette banque de données permet ensuite la mise en place de systèmes de génotypage automatisés et standardisés utiles dans la mise en place de systèmes de surveillance épidémiologique.

APPROCHES MLSA/MLST, MLVA

Les techniques de génotypage appropriées pour des études épidémiologiques ont été développées par des cliniciens. Elles exploitent des marqueurs stables à fort pouvoir discriminant pour différencier les souches au sein de la population. Plus les marqueurs ont une vitesse d'évolution rapide plus ils sont appropriés pour des études épidémiologiques locales sur du court terme et à des échelles fines. Comme pour la phylogénie, les marqueurs qui évoluent lentement sont plus appropriés pour des études épidémiologiques retracant le passé évolutif ancien, donc sur du long terme et concerne une échelle globale. Aujourd'hui, la méthode de typage et d'analyse par séquençage multi-locus (**MLSA/MLST**) et la méthode d'analyse du polymorphisme de plusieurs locus de séquences répétées en tandem (**MLVA**) sont les plus couramment utilisées comme outil épidémiologique.

La méthode MLSA/MLST est considérée comme la méthode de référence chez bon nombre de bactéries comme *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, etc. (Maiden 2006 ; Maiden *et al.* 1998 ; Pérez-Losada *et al.* 2013 ; Roumagnac *et al.* 2006 ; Urwin & Maiden 2003). C'est une technique hautement reproductible basée sur des séquences d'ADN pour une caractérisation non ambiguë des souches bactériennes. La méthode utilise au moins sept gènes (ou fragment de gènes) qui présentent des variations intraspécifiques pour caractériser les souches bactériennes et se base sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique des gènes à partir d'un échantillonnage. La méthode MLST diffère de la méthode MLSA dans la façon dont les données sont analysées. Le MLST consiste à analyser les profils alléliques générés après alignement des séquences nucléotidiques. Chaque locus d'intérêt est séquencé puis chaque allèle identifié est associé à un caractère numérique. Une série de nombres ou code numérique correspondant au numéro allélique à chaque locus constitue ainsi le profil allélique de la souche typée (**Figure 6A**). La méthode MLSA utilise en outre la concaténation de séquence à la place du profil allélique pour déterminer la séquence-type (**Figure 6B**). Basés sur la séquence de gènes relativement conservées, ces deux méthodes sont largement utilisées pour déterminer les relations de parenté entre les séquences et permet de réaliser des études d'épidémiologie globale (ou macro-épidémiologie) (Glaeser & Kämpfer 2015 ; Maiden 2006 ; Maiden *et al.* 1998 ; Turner & Feil 2007). Dans de nombreuses études, l'approche MLSA a permis une meilleure approche pour la classification phylogénétique et une étude cohérente de l'histoire évolutive d'un individu au sein de l'espèce étudiée (phylogénie) par la reconstruction d'arbres phylogénétiques (Azevedo *et al.* 2015 ; Castillo & Greenberg 2007 ; Martens *et al.* 2008 ; Vinuesa 2010 ; Wicker *et al.* 2012).

La méthode MLVA permet de discriminer des souches bactériennes comme *Salmonella Enteritidis*, *Ralstonia solanacearum*, etc. et notamment des souches qui présentent de faibles variations génétiques comme *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Xanthomonas citri*, etc. (Bertrand *et al.* 2015 ; Denœud & Vergnaud 2004 ; Eyre *et al.* 2013 ; Lindstedt *et al.* 2013 ; Parkinson *et al.* 2013 ; Poulin *et al.* 2015 ; Pruvost *et al.* 2014 ; Ravelomanantsoa *et al.* 2016 ; SHAN *et al.* 2015 ; Van Belkum 2007 ; Zaluga *et al.* 2013). Les VNTRs sont généralement des fragments intergéniques (localisés entre les gènes) mais peuvent aussi se retrouver dans des fragments codants. Ces sont des séquences hypervariables dont la taille des motifs répétés peut varier de quelques bases à plus d'une centaine (Vergnaud & Pourcel 2009). Généralement, ces variations génétiques au niveau des VNTR sont dues à un processus de mésappariement par glissement des brins d'ADN lors de la réPLICATION. Contrairement à la méthode MLSA/MLST, la méthode MLVA repose sur la comparaison de la taille des amplicons (produits PCR) et la détermination du nombre de répétitions (allèles) sur un locus donnée. Un code numérique composé d'une série de chiffres correspondant au

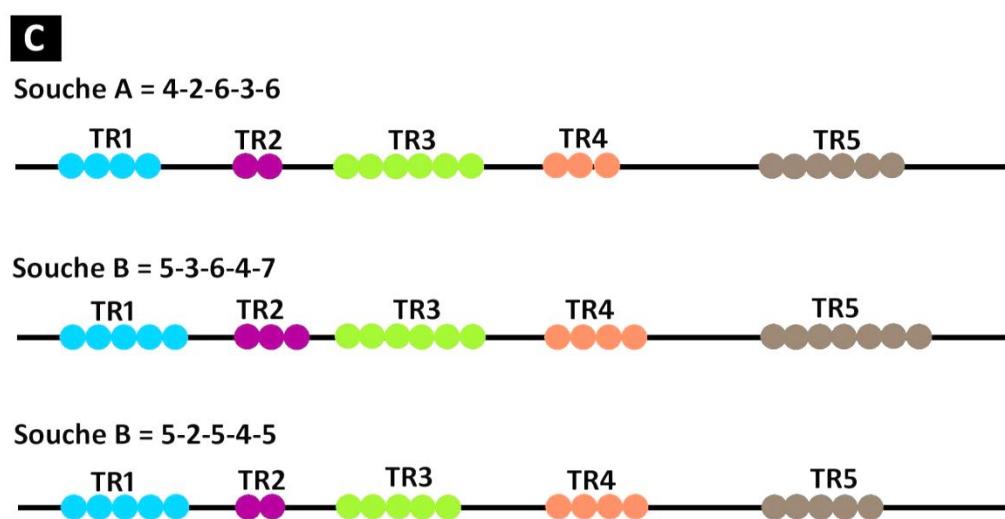
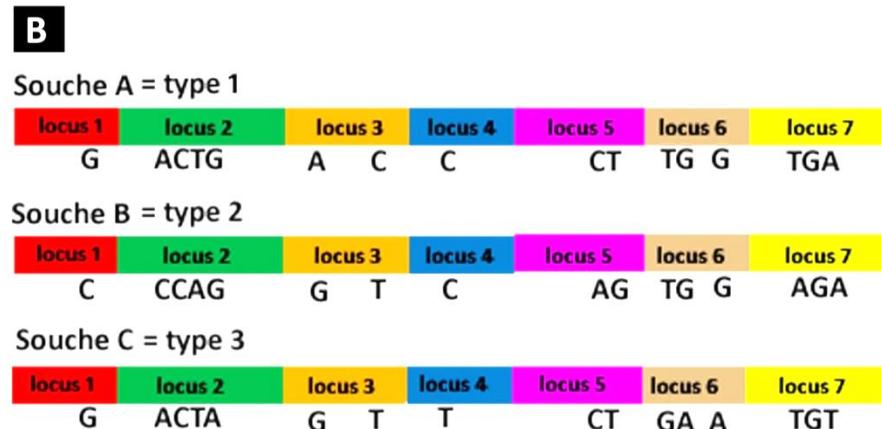
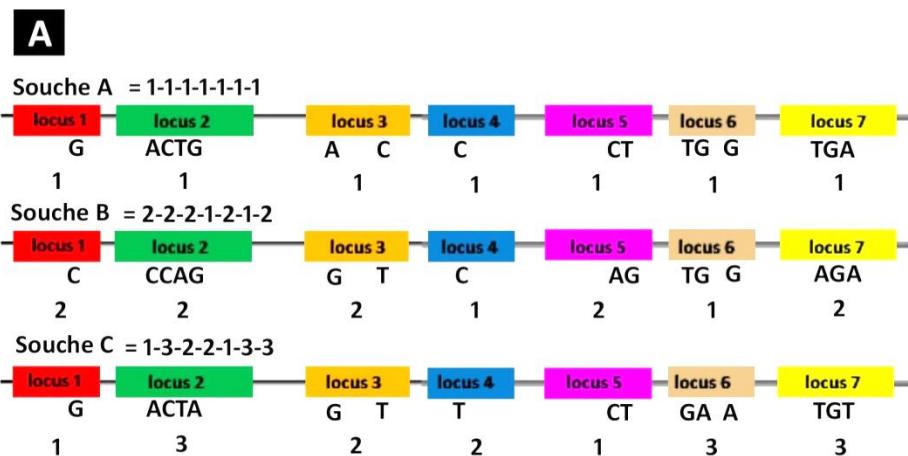


Figure 6 – Illustration de l'analyse de polymorphisme multilocus. (A) MLST : le numéro allélique à chaque locus constitue le profil allélique de la souche typée. (B) MLSA : comparaison des séquences concaténées de sept locus. (C) MLVA : un code numérique composé d'une série de chiffres correspondant au nombre d'unités répétées à chaque locus constitue le profil génétique d'une souche typée.

nombre d'unités répétées à chaque locus constitue le profil génétique d'un individu (**Figure 6C**). La méthode MLVA qui est généralement plus discriminante que les autres méthodes présentées, est donc plus appropriée pour des investigations d'épidémiologie locale. La performance à associer des souches épidémiologiquement liées permet de tracer et d'identifier les sources/foyers d'infection (Lindstedt *et al.* 2013).

II. EXPLORATION DE LA DIVERSITE GENETIQUE

VARIATIONS GENETIQUES

Malgré l'existence d'un important fond génétique commun au sein d'une espèce, les individus d'une population peuvent présenter des différences, de même que les populations entre elles. Au cours de l'évolution, les variations qui surviennent sur le matériel génétique sont sources de **diversité génétique**. Ces changements sont héritables et transmis à la descendance, donnant naissance à des variants (sous-clones) qui présentent des caractères nouveaux (**nouveaux allèles**) différents des cellules parentales d'origine. Les principales modifications observées au niveau des séquences nucléotidiques peuvent être :

- une **substitution** qui correspond par un remplacement de plusieurs nucléotides par d'autres (**Figure 7A**) ; • **insertion et/ou délétion** i.e. addition et/ou perte de quelques paires de bases (**Figure 7A**) (de Vienne 1998 ; Emerson *et al.* 2008 ; Rodriguez-Murillo & Salem 2013 ; Schork *et al.* 2000 ; Väli *et al.* 2008). Le polymorphisme générée se traduit en : • un **polymorphisme mononucléotidique** (SNP) représenté par une *variation d'une seule paire de bases sur un locus donné, entre individu d'une même espèce* ; • un **polymorphisme de nombre de copies** (CNV) dans lequel le nombre de copies d'un même locus est variable entre les individus dû à des événement de duplication et de délétion (Brynildsrud *et al.* 2015 ; Riehle *et al.* 2001) ; • un **polymorphisme de répétitions** localisé généralement au niveau des séquences répétées en tandem, résultat d'une contraction (délétion) ou expansion (insertion) d'un motif répété par la suite d'une mutation par glissement (Bichara *et al.* 2006 ; Gemayel *et al.* 2010) ou une recombinaison (Bi & Liu 1996 ; Richard & Pâques 2000) (**Figure 7C**).

Chez les bactéries, des variations génétiques peuvent également se produire par **transfert horizontal** de matériel génétique d'une cellule à l'autre. C'est un processus dans lequel une bactérie intègre du matériel génétique provenant d'une autre bactérie (différent genre ou espèce) sans en être le descendant (échange de gènes ou recombinaison génétique). Trois événements de transfert sont possibles :

- **la transformation** : incorporation d'ADN libre de l'environnement directement dans la bactérie ;
- **la transduction** : transfert de matériel génétique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire d'un phage ou d'un virus ;
- **la conjugaison** : transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par contact direct (**Figure 7B**) (Mazodier & Davies 1991). Le transfert horizontal de gènes joue un rôle majeur dans la diversification rapide, l'adaptation et l'évolution des génomes bactériens (Doolittle *et al.* 2003).

DIVERSITE GENETIQUE INTRA-POPULATION

En épidémiologie notamment en génétique des populations, la variabilité génétique est estimée au sein de la population (diversité intra-population) et entre les populations (diversité inter-population). La population est généralement considérée comme une unité génétique d'évolution (Mayr 2001). Sous le nom de **population**, on désigne un ensemble d'individus de la même espèce cohabitant dans un même milieu écologique, qui ont la possibilité d'interagir entre eux et qui sont reliés génétiquement les uns aux autres. Autrement dit, une population correspond à un ensemble d'individus qui forme un pool génétique (composé par des gènes identiques mais qui diffèrent par ses combinaisons d'allèles) qui la caractérise. Analyser le niveau de variation génétique d'une population équivaut à mesurer la diversité pour définir la composition génétique aux niveaux des allèles et génotypes, en utilisant des marqueurs génétiques. Pour décrire la diversité génétique intra population, les paramètres de diversité génétique les plus couramment utilisés sont le taux de polymorphisme, la richesse allélique, la diversité de Nei ; et en

complément pour les données de séquences, la diversité nucléotidique et la teneur en G+C. Ces paramètres sont estimés par locus et la moyenne est prise sur tous les loci.

- **Le taux de polymorphisme (P)** exprime le pourcentage de loci polymorphes dans la population étudiée. $P = \sum_{i=1}^i P_i/N$, où P_i = proportion de loci polymorphes dans une population et N = nombre de populations.
- **La richesse allélique** calculée par raréfaction (A) exprime le nombre d'allèles observés à un locus donné calculé en fonction de la taille de l'échantillon (Petit *et al.* 1998). La méthode est basée sur la probabilité $P_{ik}^{(g)}$ pour un allèle k , observé N_k fois parmi les N gènes dans la population i , d'être absente dans un échantillon de taille réduite g où $g < N$, prise comme référence pour la comparaison de toutes les populations ; où $P_{ik}^{(g)} = C(N_i - N_{ik}, g)/C(N_i, g)$, expression dans laquelle $C(N_i, g)$ représente le nombre de combinaisons de N objets pris g à g (ou $N - N_k$ objets dans le cas du numérateur). La richesse allélique à un locus donné est obtenue en sommant les K_i allèles observés dans la population. $A = K_i - \sum_{k=1}^K P_{ik}^{(g)}$
- **L'indice de diversité génétique non biaisé de Nei (H_E)** (Nei 1978) est définie comme étant la probabilité de tirer au hasard deux allèles différents à un même locus. $H_E = \frac{n(1-\sum p_i^2)}{n-1}$, où n = nombre d'individu étudiés, et p_i est la fréquence de l'allèle i à ce locus. On définit la diversité génétique H_E d'une population comme la moyenne de diversité observée pour l'ensemble des gènes étudiés.
- **La diversité nucléotidique (π)** est estimée à partir de séquences d'ADN. C'est le nombre moyen de différences nucléotidiques par site entre paire de séquences prises au hasard (Nei & Li 1979). $\pi = n/(n-1) \sum X_i X_j \pi_{ij}$, où n est le nombre de séquences analysées pour une population, X_i et X_j sont les fréquences estimées des séquences de types i et j dans la population totale et π_{ij} est la proportion de nucléotides différents entre les séquences i et j .

STRUCTURE DES POPULATIONS ET FLUX DE GENES

La loi de Hardy-Weinberg a été proposée au début du XX^e siècle démontrant qu'en absence de mécanismes évolutifs, la fréquence allélique reste constante de génération en génération. Si on atteint cet équilibre, la population n'évolue pas. Cet équilibre de Hardy-Weinberg fournit une référence pour l'étude de populations réelles. Cependant, la composition génétique des populations varie au cours du temps, de génération en génération et les populations sont structurées dans le milieu naturel. La structuration des populations est modulée par diverses forces évolutives, plus ou moins dépendantes les unes des autres. • Comme nous l'avons vu, la **mutation** génétique peut survenir spontanément d'une génération à l'autre ou causée par des facteurs environnementaux, entraînant peu de changement direct des fréquences alléliques. Le taux de mutation donne des informations sur l'évolution des fréquences alléliques au sein d'une population et une indication sur le potentiel adaptatif des populations. • La **sélection naturelle** est liée aux variations imprévisibles des conditions du milieu. Elle agit uniquement sur des variations existantes et augmente la fréquence des variations favorables permettant aux organismes de s'adapter à leur milieu au fil des générations. L'analyse d'effets de la sélection sur la composition génotypique des populations permet de comprendre comment le polymorphisme se maintient dans les populations naturelles (adaptation). • La **dérive génétique** est définie comme une variation aléatoire de la fréquence allélique. La dérive génétique s'exerce plus facilement sur une petite population et tend à fixer différents allèles (nocifs, neutres ou bénéfiques) dans des populations. Une réduction de taille d'une population peut

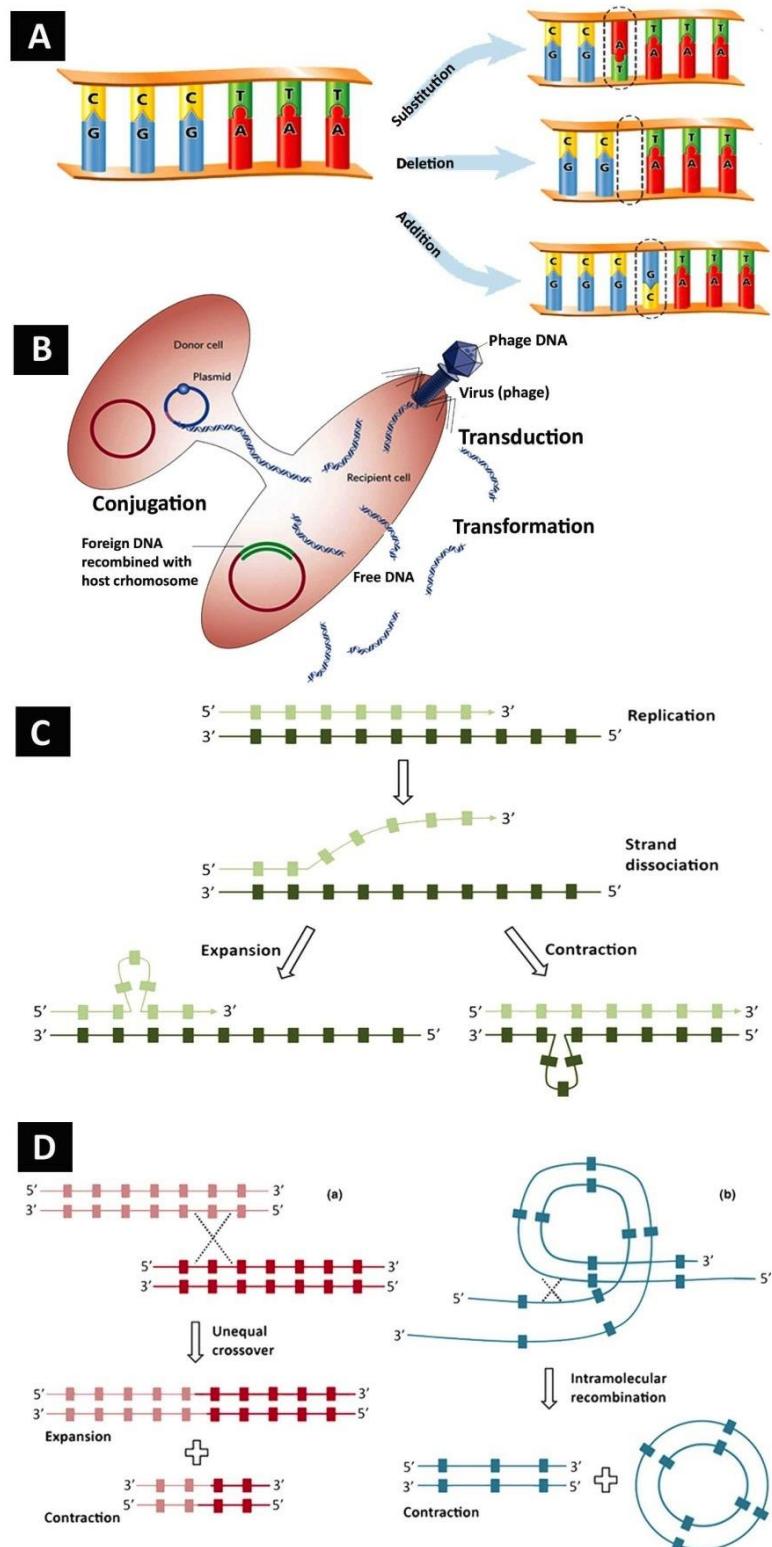


Figure 7 – Schémas représentant les différents types de variations génétiques. (A) Mutations : Substitution – Déletion – Insertion. (B) Mécanismes de transfert horizontaux chez la bactérie (Stewart 2013). (C) Mécanisme réarrangement par glissement des séquences répétées en tandem (motifs répétés représentés par les blocs) (Zhou *et al.* 2014). (D) Mécanismes de recombinaison des séquences répétées. (*a*) recombinaison inégale, (*b*) recombinaison intramoléculaire (Zhou *et al.* 2014).

être causée d'une part, par un effet fondateur où certains individus isolés de leur population initiale s'implantent dans un nouveau territoire et forment une nouvelle population dont le patrimoine génétique n'est pas représentatif de la population initiale ; d'autre part, par un effet d'étranglement où une population est susceptible de traverser occasionnellement des périodes durant lesquelles seul un petit nombre d'individus survivent. Lors de ces goulets d'étranglement, la variation génétique peut être perdue par l'effet du hasard. • **Le flux de gènes** désigne le transfert efficace d'allèles entre populations favorisant ainsi l'introduction de nouveaux allèles. Il a un impact sur l'organisation spatiale de la diversité génétique à différentes échelles spatiales. Le flux de gènes tend à homogénéiser les fréquences alléliques entre les populations d'où réduction des différences entre les populations au fil du temps, favorisant la mise en place d'adaptation. Le transfert horizontal des gènes est un mécanisme qui génère un flux de gènes constant favorisant l'acquisition de fonctions à forte valeur adaptative (fitness). En outre, ces quatre forces interagissent les unes avec les autres à différentes échelles spatio-temporelles. Par exemple, l'action combinée de la sélection naturelle et des mutations tend à maintenir les fréquences alléliques de la population à une valeur d'équilibre pour des populations de tailles conséquentes occupant un milieu stable. Comme le flux de gènes tend à l'homogénéisation de la composition génétique de différentes populations entre elles, il peut contrecarrer l'effet de la mutation, de la sélection et de la dérive génétique qui confère une différenciation entre populations. Le flux de gènes peut compenser l'effet de la dérive génétique. Comme la sélection agit uniquement sur certains loci soumis à la sélection, elle pourrait constituer une barrière aux flux de gènes pour ces régions génomiques. Cependant, pour de faible pression de sélection, le flux de gènes peut s'opposer à l'adaptation (Hartl *et al.* 1997 ; Robinson *et al.* 2010).

L'analyse de ces processus d'évolution des populations, la mise en évidence de la présence ou non de recombinaison et de l'étendue de la recombinaison lors de la diversification ont permis de décrire les structures de populations suivantes : • **Population clonale** qui présente un fort déséquilibre de liaison, i.e. une forte association d'allèles entre loci en absence de recombinaison et la mise en évidence du même génotype ou d'un complexe clonal dont la divergence est initiée à partir d'un génotype fondateur. La divergence se fait généralement par des mutations neutres héritées. • **Population panmictique** où la population évolue par recombinaison ou par transfert horizontal de gènes. On a un équilibre de liaison, i.e. que les allèles sont distribués aléatoirement. • **Population épidémique** qui est panmictique mais apparaît comme clonale (avec les complexes clonaux) en situation d'épidémie du fait que le génotype responsable de l'épidémie est surreprésenté dans la population étudiée. Dans de telles populations les taux de recombinaison sont faibles et des lignées séparées se composent de souches isolées, étroitement liées (clones) qui se diversifient principalement par mutation (Smith *et al.* 2000 ; Smith *et al.* 1993). Ces clones particuliers peuvent s'adapter à leur hôte et persister dans le temps. • On dit qu'une population a **une structure mixte** quand les souches évoluent par expansion clonale entrecoupée d'événements de recombinaison. L'expansion clonale est le résultat d'une adaptation à une nouvelle niche écologique ou un nouvel hôte. La divergence est ainsi modulée par la sélection naturelle ou par dérive génétique. • On distingue également des populations qui sont en déséquilibre de liaison mais dont les sous-populations qui les composent présentent de la recombinaison interne à chaque sous-population mais pas entre elles. Dans ce cas, les **populations** peuvent être **géographiquement ou écologiquement isolées**, ou il y a des barrières biologiques limitant l'échange de gènes. En outre, les conditions environnementales, l'hôte (espèce ou cultivar), la distribution spatiale des génotypes de l'hôte, les pratiques culturelles et les facteurs anthropiques semblent influencer la composition génétique et la structure des populations (Scortichini 2005).

La structure des populations ainsi que le flux de gènes entre les populations peuvent être estimés par le ‘F-statistique de Wright’ qui est un indice de déviation par rapport aux proportions de Hardy-Weinberg (Wright 1949). Le degré de diversification génétique sur un ensemble de loci est donné par l’**indice de différenciation G_{ST} de Nei** (Nei 1973) qui est une généralisation du F_{ST} de Wright (Wright 1949) calculé sur un seul locus di-allélique. G_{ST} est défini par : $G_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$, où H_S est la moyenne des hs sur l’ensemble des locus ; (hs = moyenne arithmétique sur l’ensemble des sous-populations de la diversité génétique à un locus par sous population) ; et H_T est la moyenne arithmétique des ht sur l’ensemble des locus (ht = diversité génétique sur un locus sur la population totale). La valeur du G_{ST} est comprise entre 0 et 1 avec une valeur seuil significative $p < 0,05$. Pour les données de séquences nucléotidiques, on calcule également le N_{ST} (Lynch & Crease 1990) qui est analogue au G_{ST} . G_{ST} considère la proportion de la diversité allélique totale entre les populations tandis que N_{ST} tient compte la diversité nucléotidique, les similarités entre haplotypes (groupes d’allèles de différents loci) et de la distance génétique. Pour les données de séquences répétées en tandem, on calcule le F_{ST} (Nei 1977) ou le R_{ST} (Slatkin 1995). Le F_{ST} mesure la différenciation génétique en fonction des fréquences alléliques et assume que chaque mutation engendre une forme allélique unique (modèle de mutation IAM, Infinite Allele Model) (Kimura & Crow 1964) tandis que le R_{ST} tient compte des variations alléliques et assume une mutation avec une perte ou un gain d’un motif (modèle de mutation SMM, Stepwise Mutation Model) (Kimura & Ohta 1978). Les indices de différenciation donnent une indication sur la distribution de la variation génétique au sein et entre les populations. Une valeur égale à 0 suggère que deux populations sont à l’équilibre et possèdent des mêmes fréquences alléliques (panmixie). Une valeur très faible indique un flux de gènes élevé (migration) avec une population à large distribution (dérive génétique). Une valeur de 1 implique que les deux populations ne partagent aucun allèle entre elles et évoluent de manière indépendante.

La différenciation des populations peut être également abordée par une **analyse de variance moléculaire (AMOVA)** qui quantifie directement la variation moléculaire au sein d’une population et entre les populations alléliques (Excoffier *et al.* 1992). Elle est réalisée sur une matrice de distances génétiques euclidiennes entre individus et donne la proportion de la variance entre populations par rapport à la variance totale. Une valeur de F_{ST} est aussi donnée.

Le déséquilibre de liaison (DL) est caractéristique d’une population. Elle correspond à une association non aléatoire entre allèles à différents loci. L’équilibre de liaison n’est pas atteint en un peu de générations, donc on s’attend à un DL élevé entre loci au niveau d’une population récente qui évolue par expansion clonale. Lorsque les loci sont très rapprochés, l’évolution vers l’équilibre pourrait être régulée par des mutations (Feingold 1991). Par ailleurs, le déséquilibre de liaison peut évoluer d’une génération à l’autre sous l’effet d’autres mécanismes relatifs à l’évolution démographique de la population comme les mélanges de populations, la dérive génétique et l’effet fondateur, et par la sélection naturelle. Le déséquilibre de liaison d’une population est estimé par les coefficients D' (Lewontin 1964) et r^2 (Hill & Robertson 1968) :

- $D = p_{ij} - p_i p_j$ (Lewontin & Kojima 1960) où p_{ij} est la fréquence de l’haplotype porteur de l’allèle i au premier locus et de l’allèle j au second locus, et $p_i p_j$ les fréquences de ces allèles dans la population ; $-0.25 < D < 0.25$. Lorsque $D = 0$, on a un équilibre de liaison.
- $D'_{ij} = \frac{D_{ij}}{D_{ij,max}}$; où $-1 < D' < 1$. Dans cette équation $D_{ij,max}$ est défini comme $D_{ij,max} = (p_i p_j, (1 - p_i)(1 - p_j))$ si $D_{ij} < 0$; $D_{ij,max} = (1 - p_i) p_j, p_i (1 - p_i))$ si $D_{ij} > 0$. Lorsque $D' = 1$, il y a déséquilibre complet.

- $r^2 = \frac{D^2}{p_i (1-p_i) p_j (1-p_j)}$ où r est la corrélation entre deux allèles, $0 \leq r^2 \leq 1$. Il prend la valeur de 1 lorsque chaque allèle du premier locus est associé à un allèle unique au second (déséquilibre de liaison parfait) ; $r^2 = 0$, deux locus sont en équilibre de liaison complète.

Le coefficient D est plus précis pour la mesure des recombinaisons alors que le coefficient r^2 résume à la fois les recombinaisons et les mutations (Flint-Garcia *et al.* 2003).

Un **test de recombinaison génétique** sur les séquences de gènes (comme les loci MLSA) permet en outre d'évaluer si la recombinaison génétique contribue de manière significative à la diversité génétique des marqueurs. Par ailleurs, la détection d'événements de recombinaison est aussi utile dans la représentation des relations de parenté entre les séquences sur un arbre phylogénétique car les recombinaisons pourraient perturber le signal phylogénétique global (Martin & Beiko 2010).

Pour les séquences de gènes qui présentent un polymorphisme nucléotidique, des **tests de neutralité sélective** peuvent détecter un phénomène de sélection ou un écart à l'équilibre démographique de la population, comme un goulet d'étranglement ou une expansion de population. Lorsque le polymorphisme génétique s'explique par un équilibre entre la mutation et la dérive, *D de Tajima* (Tajima 1989) et *Fs de Fu* (Fu 1997) sont de 0. Dans le cas contraire, un balayage sélectif (apparition et propagation d'un mutant avantageux dans la population) ou une expansion démographique récente aboutit une valeur négative de *D de Tajima* et *Fs de Fu*, qui exprime un excès de mutations à faible fréquence (allèles rares). Par ailleurs, un excès de mutations à fréquence intermédiaire entraîne une valeur positive de *D de Tajima* et *Fs de Fu*, qui pourrait être dû à un effet de sélection balancée (maintien d'allèles avantageux ancestraux) ou à une diminution démographique (goulet d'étranglement génétique).

Avec les données génétiques d'un ensemble d'individus échantillonées, la **structure génétique** de l'échantillon (**cluster**) peut être détectée par approche bayésienne par exemple avec le modèle statistique Geneland (Guillot *et al.* 2005 ; Guillot *et al.* 2008). Il s'agit de déterminer sans *a priori* le nombre le plus probable de k groupes génétiquement différenciés dans l'échantillonnage étudié et la probabilité qu'un individu appartienne à une unité populationnelle sous un modèle de fréquence allélique corrélée ou non. La structure génétique associée avec les données géographiques permet ensuite d'évaluer la **structure spatiale** des populations identifiées. Cette structure spatiale rend compte de la dynamique (dispersion) des individus dans l'espace. Cette approche permet d'identifier les migrants.

REPRESENTATION DES RELATIONS GENETIQUES

La diversité génétique peut également être analysée et représentée sur un diagramme pour établir les relations génétiques (Robinson *et al.* 2010). Les données de séquences nucléotidiques, comme les marqueurs MLSA permettent la construction d'**arbres phylogénétiques**. Les différences ou les similarités observées sur un ou plusieurs gènes (marqueurs moléculaires) permettent de déduire les relations de parenté entre les souches. Il s'agit entre autres de réaliser un alignement multiple des séquences de gènes, grouper des souches apparentées i.e. qui présentent un ancêtre commun, et générer un arbre phylogénétique où les séquences les plus proches ne divergent qu'au fil des dernières branches de l'arbre, tandis qu'une ancestralité commune éloignée est marquée par un positionnement sur des branches très divergentes. En d'autres termes, chaque noeud de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants et les arêtes illustrent les liens de liaison.

On distingue trois principales méthodes de reconstruction d'arbre phylogénétique (Didelot 2010). • **Les méthodes fondées sur les distances** entre séquences prises deux à deux qui regroupent ensemble les séquences les plus proches entre elles et de situer les différents niveaux de hiérarchie entre elles sur la base de l'intensité de leur ressemblance : la méthode UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean) et la méthode NJ (Neighbour-Joining). Ces méthodes prennent en compte le nombre de substitutions de nucléotides pour estimer la distance entre deux séquences. • **Les méthodes fondées sur les caractères** qui prennent en compte le nombre de mutations (substitutions/insertions/délétions) qui affectent chacun des sites de la séquence : la méthode de Parcimonie (MP), la méthode de vraisemblance (ML). Ces méthodes sont plus précises. • **La méthode bayésienne** qui calcule la probabilité postérieure de toutes les topologies d'arbres phylogénétiques par la combinaison d'une probabilité *à priori* avec la fonction de vraisemblance. La méthode ML est la plus robuste. L'analyse phylogénétique complète les analyses obtenues sur la base des distributions alléliques.

Cependant si les séquences de gènes utilisés comme marqueurs sont sujettes aux transferts horizontaux de gènes, il faut utiliser un **réseau phylogénétique** pour représenter leurs évolutions dans lequel les séquences sont représentées par des noeuds et leurs relations évolutives sont représentées par des arêtes (Kunin *et al.* 2005 ; Legendre 2000).

L'**homoplasie** des séquences fait aussi parti des problèmes fondamentaux de l'inférence phylogénétique. Cet état brouille l'information phylogénétique pouvant entraîner de fausses interprétations des relations de parenté. L'homoplasie indique la ressemblance d'un état de caractère non hérité d'un ancêtre commun, les séquences de gènes peuvent afficher des similitudes mais ne possèdent pas les mêmes histoires de vie. On distingue trois types d'homoplasie (**Figure 8**) : • **la convergence évolutive** (présence de caractères similaires dans divers séquences sans lien de parenté, souvent lié à une adaptation au milieu), • **l'évolution parallèle** (deux séquences relativement proches évoluent de façon indépendante et présentent des caractères similaires, le caractère est issu d'un ancêtre commun), • **la réversion évolutive** (deux séquences présentent des états similaires par suite d'un retour à l'état ancestral d'au moins l'une d'entre elles. Ce retour à l'état initial se manifeste par une mutation (perte) au niveau de la séquence, la principale source d'homoplasie étant la recombinaison). Il a été démontré que la probabilité d'homoplasie d'un site augmente avec le nombre d'événements de recombinaison affectant le site. Ainsi, l'homoplasie est couramment utilisée comme indicateur de la prévalence de la recombinaison (Maynard Smith & Smith 1998 ; Smith 1999). Ainsi, dans la construction d'un arbre phylogénétique, il faut quantifier l'incertitude de la phylogénie inférée en estimant d'une part, l'influence de chaque nucléotide sur la phylogénie inférée et de retirer ceux qui ont une influence trop forte, par exemple à l'aide de la méthode Jackknife, pour éviter l'homoplasie qui n'a pas de valeur en phylogénie. D'autre part, si les jeux de données présentent une forte hétérogénéité, il est préférable d'explorer les différents modèles de substitution qui permettent de calculer les probabilités de remplacement d'un nucléotide par une autre décrivant la façon la plus réaliste possible le processus biologique d'évolution des séquences (Tagu & Risler 2010).

En épidémiologie, une question importante est de savoir si deux ou plusieurs isolats dérivent de la même souche et de prouver la clonalité entre des isolats susceptibles d'être liés épidémiologiquement (Struelens 1998). La notion de **clone** définit un ensemble de souches bactériennes isolées indépendamment les unes des autres i.e. provenant de lieux différents et prélevés à différents moments, mais qui montrent des caractères génétiques très proches impliquant le fait qu'elles ont un ancêtre commun récent. Les souches impliquées dans une épidémie peuvent avoir une relation de clonalité qui n'exclue pas la présence de recombinaison voire de variation génétique. En effet durant la dissémination

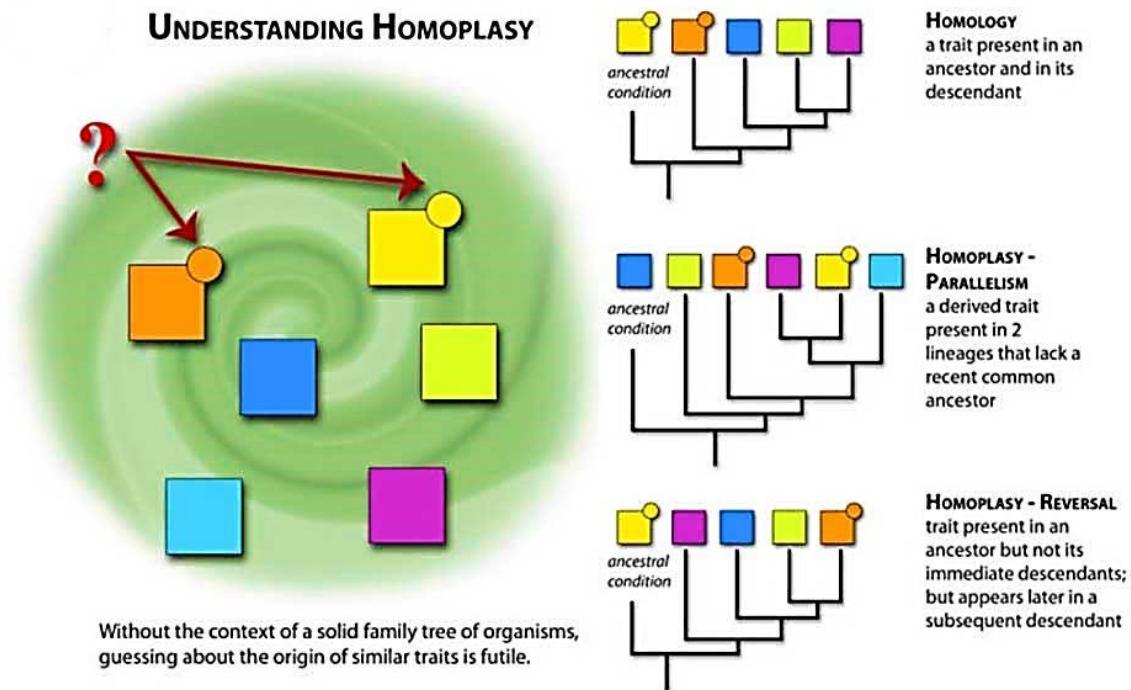


Figure 8 – Illustration de l'homoplasie : allèles identiques en longueur mais issus d'un ancêtre différent. Crédit illustration : Z. Deretsky.

des clones, les marqueurs moléculaires peuvent être soumis à des forces d'évolution, d'où le concept de **complexe clonal**. Pratiquement, les isolats qui présentent le même profil allélique sont définis comme clones et les groupes d'isolats qui montrent des profils étroitement proches forment un complexe clonal. A partir des différents profils alléliques existants dans la population étudiée, générés par les données de génotypage MLST et MLVA, les liens génétiques entre les haplotypes peuvent être visualisés à partir d'un **arbre couvrant minimum** ('minimum spanning tree' des anglo-saxons) dont le concept d'origine applique le principe de parcimonie à la phylogénie. C'est un arbre réticulé dont la somme des longueurs de branches est minimale évoquant la quantité minimum d'évolution (Edwards & Cavalli-Sforza 1965). La taille de la population analysée ou l'ajout de nouveaux génotypes n'influent pas la structure de l'arbre car le principe de parcimonie sous-jacent permet de conserver les points de connexion des différents groupes. L'arbre couvrant minimum est construit avec l'algorithme goeBurst (Francisco *et al.* 2009) où chaque cercle représente un haplotype et les segments reliant deux haplotypes sont pondérés de distance euclidienne minimale entre les deux haplotypes. Les haplotypes sont regroupés en fonction du nombre de loci qui les différencient et leur fréquence. Les souches liées épidémiologiquement sont distantes entre elles d'un locus (**SLV** ou 'single locus variant') et forment un complexe clonal. L'analyse de l'arbre couvrant minimum fournit par ailleurs des informations sur la divergence allélique de l'haplotype central prédict comme fondateur ou ancêtre commun potentiel des haplotypes liés dans un complexe clonal. Sur la base de parcimonie, l'haplotype qui a le plus de grand nombre de SLV dans le complexe clonal est le fondateur primaire. Si deux haplotypes possèdent le même nombre de SLV alors celui qui a le plus grand nombre de DLV ('double locus variant') est choisi.

DIVERSITE PHENOTYPIQUE

En interaction avec l'environnement, le génotype agit sur l'ensemble des caractères observables ou détectables d'un individu désignés comme étant le phénotype. Les variations génétiques présentes au niveau des différents gènes conduisent à d'innombrables génotypes et phénotypes qui constituent la diversité. Ainsi, la diversité phénotypique basée sur des caractères déterminés génétiquement peut refléter une partie de la diversité génétique. Par ailleurs, pour les caractères qui dépendent principalement des effets du milieu, la variation phénotypique peut ne pas rendre compte de la variation génétique.

Chez les bactéries pathogènes, la diversité génétique peut s'observer au travers du **pouvoir pathogène** de l'agent infectieux. Le pouvoir pathogène est caractérisé par la virulence et l'agressivité de la souche, qui peut varier selon les souches. La virulence d'une souche traduit sa capacité à induire la maladie (terme qualitatif) alors que l'agressivité est caractérisée par la sévérité des symptômes (terme quantitatif). Ainsi, un isolat peut être virulent ou avirulent sur un cultivar donné, et un isolat virulent peut être plus ou moins agressif. La virulence et l'agressivité sont deux composantes de la fitness d'un agent pathogène (valeurs adaptatives). L'expression de l'agressivité est sensible aux conditions environnementales et à la physiologie de l'hôte, les informations recueillies sur l'étude du pouvoir pathogène combinées avec les données génétiques contribuent, par exemple, à l'identification des loci impliqués dans le pouvoir pathogène, et peuvent renseigner sur les relations hôte-pathogène comme l'existence ou non de mécanismes de coévolution. La connaissance du pouvoir pathogène permet également d'apprécier la résistance de l'hôte, qui est une information importante dans le choix des variétés à déployer.

III. ABOUTISSEMENT ET PORTEE DES INVESTIGATIONS

Pour résumer, les variations génétiques peuvent témoigner de l'évolution et de l'adaptation d'un agent pathogène. L'évolution résulte de différentes forces qui structurent les populations. Ce qui amène l'épidémiologiste à travailler à l'interface de la génétique des populations et de l'épidémiologie descriptive avec comme outils d'investigation les marqueurs moléculaires les mieux adaptés aux questions de recherche posées. Les informations fournies à partir de l'exploration de la diversité génétique peuvent être synthétisées de la manière suivante :

- les relations de parenté et les relations génétiques entre haplotypes renseignent sur l'origine de l'agent pathogène, le type de souches associé à l'épidémie et les sources d'inoculum possibles,
- le flux de gènes et la structure spatiale de la diversité génétique des populations renseignent sur la dispersion des souches,
- la connaissance de la structure des populations : clonal, panmictique, épidémique, ou mixte, renseigne sur la nature de la maladie épidémie/pandémie, émergence localisée ou endémie,
- la connaissance des différentes formes de diversification (mutation, recombinaison, sélection) renseigne sur l'évolution de l'agent pathogène,
- et enfin la diversité phénotypique (pouvoir pathogène) donne une indication sur le comportement chaque type identifié de diversité.

D'un point de vue appliqué, de telles données ont des perspectives d'utilisation dans la mise au point des outils d'aide à la décision pour la gestion efficace de l'épidémie comme dans la sélection de variétés résistantes à déployer, le développement d'outils de diagnostic, le contrôle, le suivi et la surveillance épidémiologique.

L'épidémiosurveillance est le suivi de l'évolution des agents pathogènes présents et la détection de l'introduction de nouveaux organismes nuisibles sur un territoire donné. Elle assure un diagnostic précis et rapide des infections à potentiel épidémique. Elle est basée en générale sur la mise en place d'un réseau de partenaires effectuant périodiquement une veille sur le territoire, avec prélèvement et analyse d'échantillons présentant des symptômes. Comme le génotypage, aux moyens des marqueurs génétiques, identifie chaque individu typé en leur attribuant une carte d'identité ou empreinte génétique, chaque empreinte génétique est stockée en une base de données de profils génotypiques numériques consultables *via* des applications Web. Grâce à ce système de surveillance épidémiologique, on peut reconnaître les profils existants (librairie numérique de profils génomiques) et identifier ceux qui sont nouvellement définis. Le système d'épidémiosurveillance mis en place est ainsi de type comparatif ou archivé fournissant des profils numériques reproductibles, permettant la comparaison d'un large nombre de souches. Il existe aujourd'hui un certain nombre d'outils de génotypage accessibles en réseau ou en ligne intégrant les bases de données de génotypage (Carriço *et al.* 2012 ; Sabat *et al.* 2013 ; Struelens *et al.* 1998) comme PulseNet⁵ (Swaminathan *et al.* 2006) ; Harmony (Murchan *et al.* 2003) ; EPIS⁶ et TESSy⁷ de l'ECDC⁸ (Van Walle 2013) ; PubMLST⁹, MLST.net¹⁰ (Aanensen & Spratt 2005) ; MLVAbank¹¹ ;

⁵ PulseNet International : <http://www.pulsenetinternational.org/>

⁶ EPIS (Epidemic Intelligence Information System)

⁷ TESSy (The European Surveillance System)

⁸ ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) : <http://ecdc.europa.eu/en/data-tools/Pages/home.aspx>

⁹ PubMLST (Public databases for molecular typing and microbial genome diversity) : <http://pubmlst.org/>

¹⁰ MLST (Multi Locus Sequence Typing).net : <http://www.mlst.net/>

¹¹ MLVAbank : <http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/>

MLVA-Bacterial genotyping¹², MIRU-VNTRplus¹³ (Weniger *et al.* 2010), MLVA-NET¹⁴ (Guigon *et al.* 2008), GPMS¹⁵, etc.

Rapport Gratuit .Com

¹² MLVA bacterial genotyping : <http://www.mlva.eu/>

¹³ MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units - Variable Number of tandem repeats) : <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>

¹⁴ MLVA-NET : <http://bigsdb.web.pasteur.fr/>

¹⁵ GPMS (Genomes and PolyMorphismS) : <http://minisatellites.u-psud.fr/>

MODELE D'ETUDE : LE FLETRISSEMENT BACTERIEN

IV. LE COMPLEXE D'ESPECES CHEZ *RALSTONIA SOLANACEARUM*

DESCRIPTION

R. solanacearum est une β -proteobactérie, gram-négative, en forme de bâtonnet aux extrémités arrondies ($0,5\text{-}0,7 \times 1,5\text{-}2,0\mu\text{m}$) (Figure 9B), non sporulée, non encapsulée. Les flagelles, lorsqu'elles sont présentes, sont polaires (Denny & Hayward 2001 ; Kelman 1953) (Figure 9A). Sur milieu tétrazolium Kelman (chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium), les colonies virulentes typiques présentent une forme irrégulière, de couleur blanche opaque avec un aspect muqueux dû à la production d'exopolysaccharides (EPS), et après quelques jours d'incubation présentent une couleur rose à son centre (Kelman 1954 ; OEPP/EPPO 2004 ; Schaad *et al.* 1988) (Figure 9C). Les variants spontanés non virulents forment des colonies sans exopolysaccharides de plus petite taille, uniformément rondes, d'aspect butyreux, et de couleur rouge foncé (Figure 9D). Les colonies ne sont pas fluorescentes mais peuvent diffuser un pigment mélаниque (brun) dans le milieu (Schaad *et al.* 1988) (Figure 9E).

TAXONOMIE ET DIVERSITE GENETIQUE

Le complexe d'espèces *R. solanacearum* tombe dans le genre des Burkholderia. Les souches qui unifient ce groupe présentent une grande variabilité génétique et phénotypique intraspécifique. A cet égard, plusieurs systèmes de classification ont été proposés. Historiquement, la classification a subdivisé l'espèce *R. solanacearum* en • 5 races physiologiques en fonction du spectre d'hôtes (Buddenhagen *et al.* 1962), • 5 biovars selon leur aptitude à métaboliser divers sucres et à dénitirifier les nitrites (Hayward 1994). Cependant, ces deux classifications n'ont pas la valeur de taxon. La classification établie sur la base de marqueurs génétiques (RFLP¹⁶, ARNr 16S¹⁷ et ARNr 16S-23S¹⁸, *pglA*¹⁹ et *egl*²⁰) a d'abord identifié la division 'Asiaticum' (comprenant des souches en provenance d'Asie) et la division 'Americanum' (des Amériques) (Cook *et al.* 1989 ; Cook & Sequeira 1993 ; Fegan *et al.* 1998b ; Gillings & Fahy 1994 ; Seal *et al.* 1992 ; Taghavi *et al.* 1996). Plus tard, l'analyse des données des séquences de la région ITS 16S-23S, des gènes *egl* et *hrpB*²¹, et des marqueurs AFLP²² a permis la classification en 4 groupes génétiques ou 'phylotypes' qui reflète leur origine géographique : • **Phylotype I** (souches principalement de l'Asie). • **Phylotype II** (souches principalement des Amériques). Le phylotype II est

¹⁶ AFLP : polymorphisme de longueur de fragment de restriction.

¹⁷ ARNr 16S : fragment d'ARN ribosomique nucléaire ITS

¹⁸ ARNr 16S-23S : fragment d'ARN ribosomique situé dans la région espaceur interne transcrit (ITS) i.e. entre le 16S et le 23S

¹⁹ *pglA* : gène polygalacturonase.

²⁰ *egl* : gène endoglucanase.

²¹ *hrpB* : gène associé dans la virulence.

²² AFLP : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés

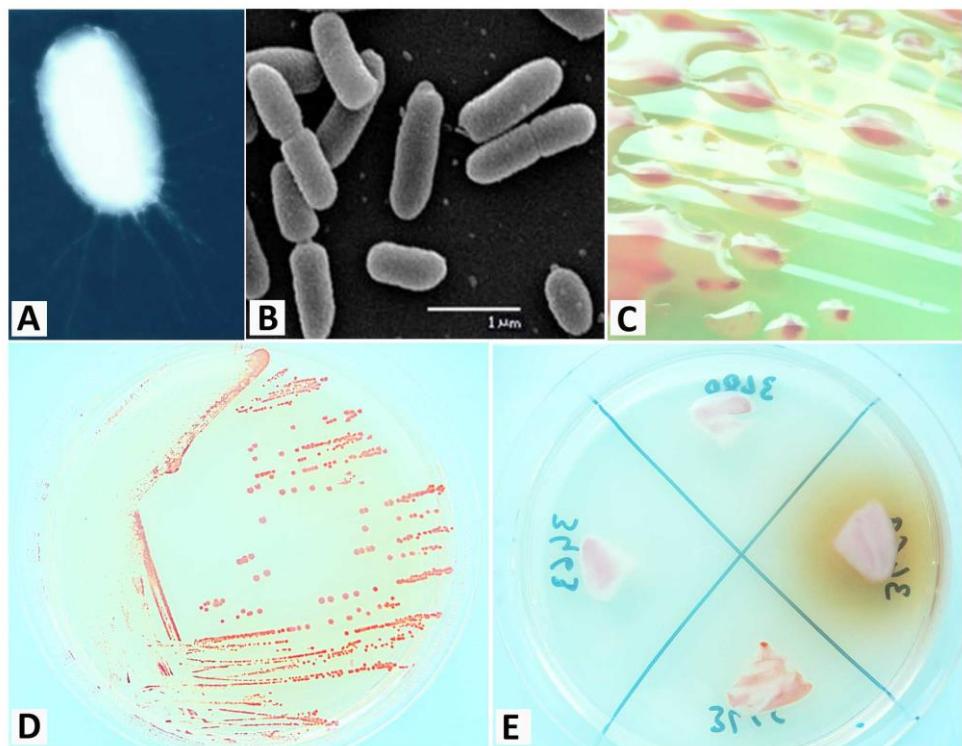


Figure 9 – *Ralstonia solanacearum* (A) Forme en bâtonnet et flagelles polaires (Mansfield *et al.* 2012). (B) Colonie en microscopie électronique de balayage (Guarisch-Sousa *et al.* 2016) (C) Colonies de souches virulentes et (D) non virulents sur milieu Kelman. (E) Colonies diffusant un pigment mélânique. Crédits photos : S. Ravelomanantsoa.

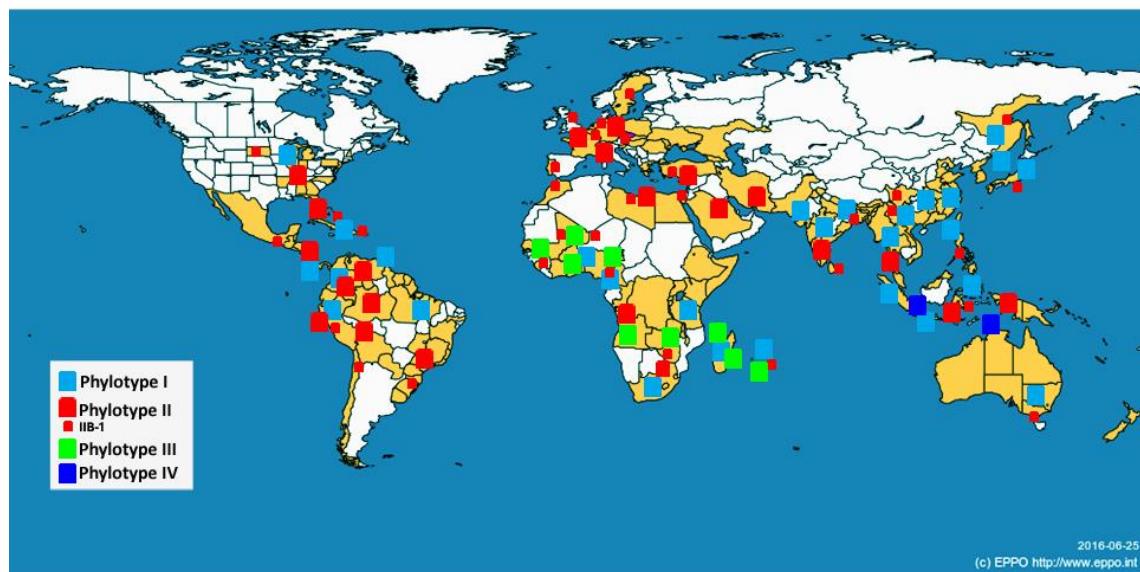


Figure 10 – Distribution géographique des souches du ceRs.

subdivisé en deux lignées IIA et IIB d'où se distinguent des groupes de souches d'intérêts agronomique comme le phylotype IIB sequevar 1 (IIB-1) responsable de la pourriture brune de la pomme de terre (en anglais 'Potato 'Brown rot'). • **Phylotype III** (souches de l'Afrique et des îles de l'Océan Indien). • **Phylotype IV** (souches de l'Indonésie, mais aussi du Japon, des Philippines, de Corée et d'Australie) (Fegan & Prior 2005 ; Fegan & Prior 2006 ; Jeong *et al.* 2007 ; Poussier *et al.* 2000a ; Poussier *et al.* 2000b ; Villa *et al.* 2005). Cette classification phylogénétique a été confirmée par une approche microarray²³ du génome entier (Guidot *et al.* 2007). La subdivision des phylotypes en clades et sequevars a été démontrée respectivement par une analyse par séquençage de 9 gènes (MLSA) (Wicker *et al.* 2012), par séquençage partielle du gène endoglucanase (*egl*) (Fegan & Prior 2005). Le concept de complexe d'espèce s'applique à *R. solanacearum* compte tenu de la diversité phénotypique et génétique observée, et surtout de l'existence de deux autres espèces apparentées à cet environnement phylogénétique : *R. syzygii*, agent du flétrissement du giroflier en Indonésie et le 'Blood Disease Bacterium' (BDB), agent du flétrissement du bananier dans la même zone géographique (**Figure 1**) (Buddenhagen *et al.* 1962 ; Fegan & Prior 2005 ; Taghavi *et al.* 1996). Récemment à partir des données de séquençage de génomes complets, Remenant *et al.* (2011) et Safni *et al.* (2014) ont proposé une nouvelle nomenclature du complexe d'espèces : ***R. pseudosolanacearum* sp. nov** (regroupant les phylotypes I et III), ***R. solanacearum*** (comprenant les souches assignées au phylotype II), ***R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. *nov*** (regroupant les souches assignées au phylotype IV), ***R. syzygii* subsp. *nov*** (ancien *R. syzygii*), ***R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. *nov*** pour les souches de l'écotype 'BDB' (**Tableau 2**). Nous avons choisi d'utiliser dans cette thèse la classification en 'complexe d'espèces *R. solanacearum*' ou 'ceRs' pour désigner les agents pathogènes responsables du flétrissement bactérien.

DISTRIBUTION ET SPECTRE D'HÔTE

Les souches du ceRs sont réparties sur les cinq continents et sont capables de coloniser des milieux écologiques différents, ce qui leurs confèrent la deuxième place parmi les agents pathogènes d'importance économique dans le monde (Mansfield *et al.* 2012). Ces souches sont largement répandues dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées (**Figure 10**) (CABI 2016 ; EPPO 2015). Le phylotype II présente une large distribution mondiale. Le phylotype I est présent dans les quatre continents : Amérique, Afrique, Océanie notamment en Australie, et en Asie, avec une prépondérance dans le continent asiatique. La présence du phylotype I n'a pas été déclarée jusqu'à ce jour en Europe. Le phylotype III est localisé dans le continent Africain et dans la zone SOOI où il semble être endémique. Enfin, le phylotype IV se retrouve en Indonésie et Australie.

Par ailleurs, les souches du ceRs présentent une gamme de plantes hôtes exceptionnellement large et en expansion continue. Ces souches sont impliquées dans le flétrissement de 450 espèces végétales cultivées et sauvages distribuées dans 54 familles botaniques différentes (monocotylédones et dicotylédones), dont la majorité d'entre elles appartiennent à la famille des Solanacées et des Musacées (Hayward & Hartman 1994 ; Kelman 1953). Certaines lignées comprennent des souches qui partagent les mêmes caractères écologiques, nommées par le terme 'écotype' (Cohan 2006).

²³ La technique "microarray" est basée sur l'analyse de puces à ADN.

Tableau 2 – Correspondance entre les récentes et anciennes classifications chez ceRs.

Complexe d'espèce <i>Ralstonia solanacearum</i>																
Espèce	<i>R. pseudosolanacearum</i>					<i>R. solanacearum</i>					<i>R. syzygii</i>					
Origine	Asie			Afrique		Amériques					Indonésie					
Phylotype	I			III		IIA			IIB			IV				
Clade	1			6		2		3	4		5		ND	7	8	ND
Sequevar	13	30	44			19	42		5	39						
	14	31	45			20	43		35	41						
	15	32	46	16	12	21	44		36	50						
	17	33	47			22	48		37	52						
	18	34	48			23	49		38	53						
	29															
Biovar	3			4		5		1	2T		1		2		1	
												2T		2T		BDB
Race	1			4		5		3	2		3		2		Rsy	

Ralstonia solanacearum est un complexe d'espèce ; subdivisé récemment en 3 espèces à partir des données de séquençage de génome complet (Prior *et al.* 2016 ; Remenant *et al.* 2011, Safni *et al.* 2014) ; génétiquement structuré en phylotypes par l'analyse des variations nucléotidiques de la région ITS 16-23S (Prior et Fegan 2005) ; classé en sequevars à partir du polymorphisme d'une portion du gène *egl* (Fegan & Prior 2005); regroupé en clades par analyse de séquençage multilocus (Wicker *et al.* 2012). Les races sont déterminées en fonction de spectres d'hôtes et les biovars selon leur aptitude à métaboliser divers sucres et à dénitrifier les nitrites (Hayward 1994).

On distingue (**Figure 11**) :

- l'écotype '**Brown rot**' tolérant au froid ou 'souches froides' causant la pourriture brune de la pomme de terre (potato 'Brown rot') mais aussi sur la tomate. Cet écotype regroupe l'écotype '**American Brown rot**' (phylotype IIB-1) et l'écotype '**African Brown rot**' (phylotype III).
- L'écotype '**Moko**' (phylotype IIA et IIB),
- l'écotype '**Bugtok**' (phylotype IIB),
- l'écotype '**BDB**' (Banana Blood Disease) dont les souches sont uniquement pathogènes du bananier (unique hôte),
- l'écotype '**NPB**' (phylotype IIB4-NPB) ('Not Pathogenic to Banana') avec un spectre de virulence englobant les Solanées, les Aracées, les Cucurbitacées et certaines Musacées ornementales,
- l'écotype '**Ginger**' (phylotype I) pathogène du gingembre,
- l'écotype '**Mulberry**' (phylotype I) qui infecte le mûrier (Cellier *et al.* 2012 ; Fegan & Prior 2005 ; Wicker *et al.* 2012).

CYCLE INFECTIEUX, CONSERVATION ET SURVIE

La bactérie est généralement établie dans le sol ou la rhizosphère. Attirée par des molécules nutritives de l'xsudat racinaire, l'oxygène et divers acides aminés et organiques, la bactérie se déplace à l'aide de flagelles polaires vers son hôte, plus précisément vers un emplacement optimal pour son activité métabolique (chimiotactisme et aérotactisme) et colonise ensuite la rhizosphère (Kelman & Hruschka 1973 ; Yao & Allen 2006a ; Yao & Allen 2006b ; Yao & Allen 2007). Pour la première phase d'infection, la bactérie s'attache à la cellule végétale et pénètre au niveau des racines par des blessures naturelles (comme l'émergence d'une racine secondaire) ou mécaniques (occasionnées par les insectes, nématodes ou des outils). L'infection peut être également obtenue par des blessures mécaniques dans la partie végétative. La bactérie migre ensuite vers les vaisseaux du xylème où elle se multiplie activement. La bactérie une fois dans la plante n'est plus mobile (Tans-Kersten *et al.* 2001). L'obstruction des vaisseaux empêche la circulation de l'eau dans la plante qui entraîne ensuite son flétrissement irréversible. Après cela, la bactérie est à nouveau libérée dans le sol. Certaines souches du ceRs sont, en outre, capables d'infections latentes dans les tubercules de pommes de terre ainsi que dans d'autres plantes hôtes réservoirs (Hayward 1991 ; Skoglund *et al.* 1993). Ainsi, la plante conservera un aspect sain et deviendra un porteur sain pouvant disséminer la bactérie. La **Figure 12** est une représentation schématique du cycle infectieux.

La bactérie se développe à une température comprise entre 24 et 30°C, généralement dans des conditions d'aérobiose stricte (CABI 2016 ; Denny & Hayward 2001 ; EPPO 2004 ; Kelman 1953). Sa croissance est inhibée pour des températures inférieures ou égales à 10°C et au-delà de 37°C. Des périodes de temps pluvieux sont associées à une incidence élevée de la maladie en favorisant sa dispersion. En l'absence d'hôte sensible, les souches du ceRs peuvent persister dans le sol, sur les débris végétaux, voire comme publié récemment, sous forme d'endophyte dans les tissus des champignons telluriques (Spraker *et al.* 2016). Elles peuvent être hébergées par des plantes réservoirs (comme les adventices dans les alentours immédiats des parcelles de culture) sous forme d'infections latentes. Ces réservoirs contribuent à l'amplification et la dissémination de la bactérie sans montrer de symptômes.

Phylotype	Origine	Clade	Ecotypes		
I	Asie	1	Flétrissement bactérien	Ginger	Mulberry
IIA	Ameriques	2	Flétrissement bactérien	Moko	
		3	(BW)		
IIB	Ameriques	4	"Emergent" NPB	Moko	
		5	BW tomate et geranium	Brown Rot	Moko
III	Afrique	6	Flétrissement bactérien	Brown Rot	
IV	Indonesie	7	Flétrissement bactérien	BDB	
		8	R.syzygii, maladie de Sumatra sur giroflier		

Figure 11 – Les écotypes de ceRs et leur correspondance phylogénétique. *Source : Wicker 2015*

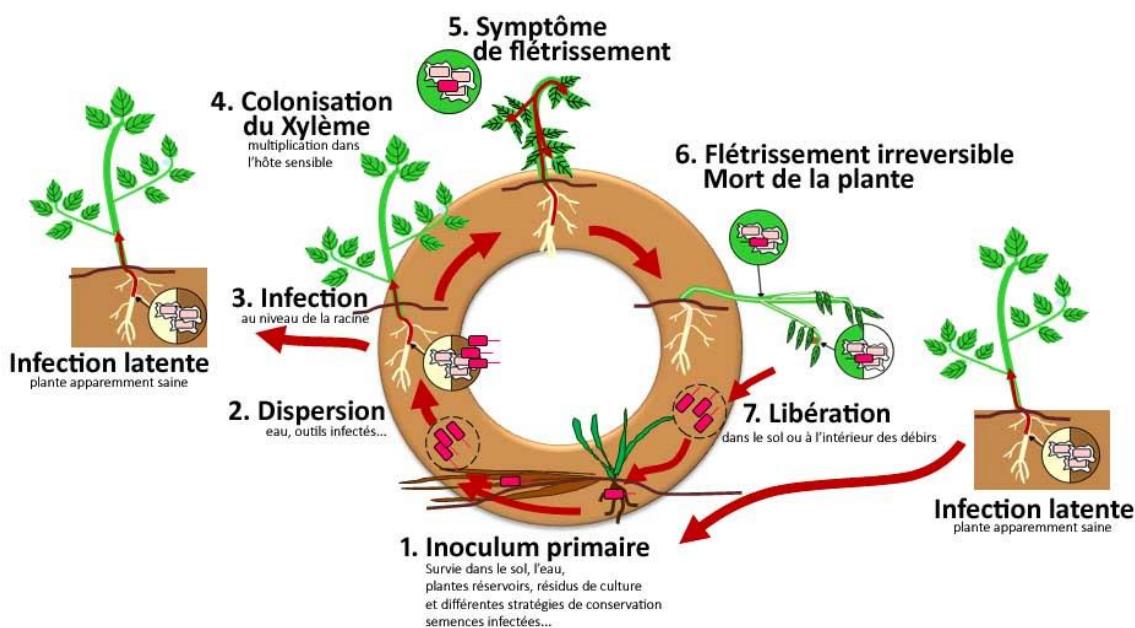


Figure 12 – Représentation du cycle infectieux théorique chez les souches du ceRs.

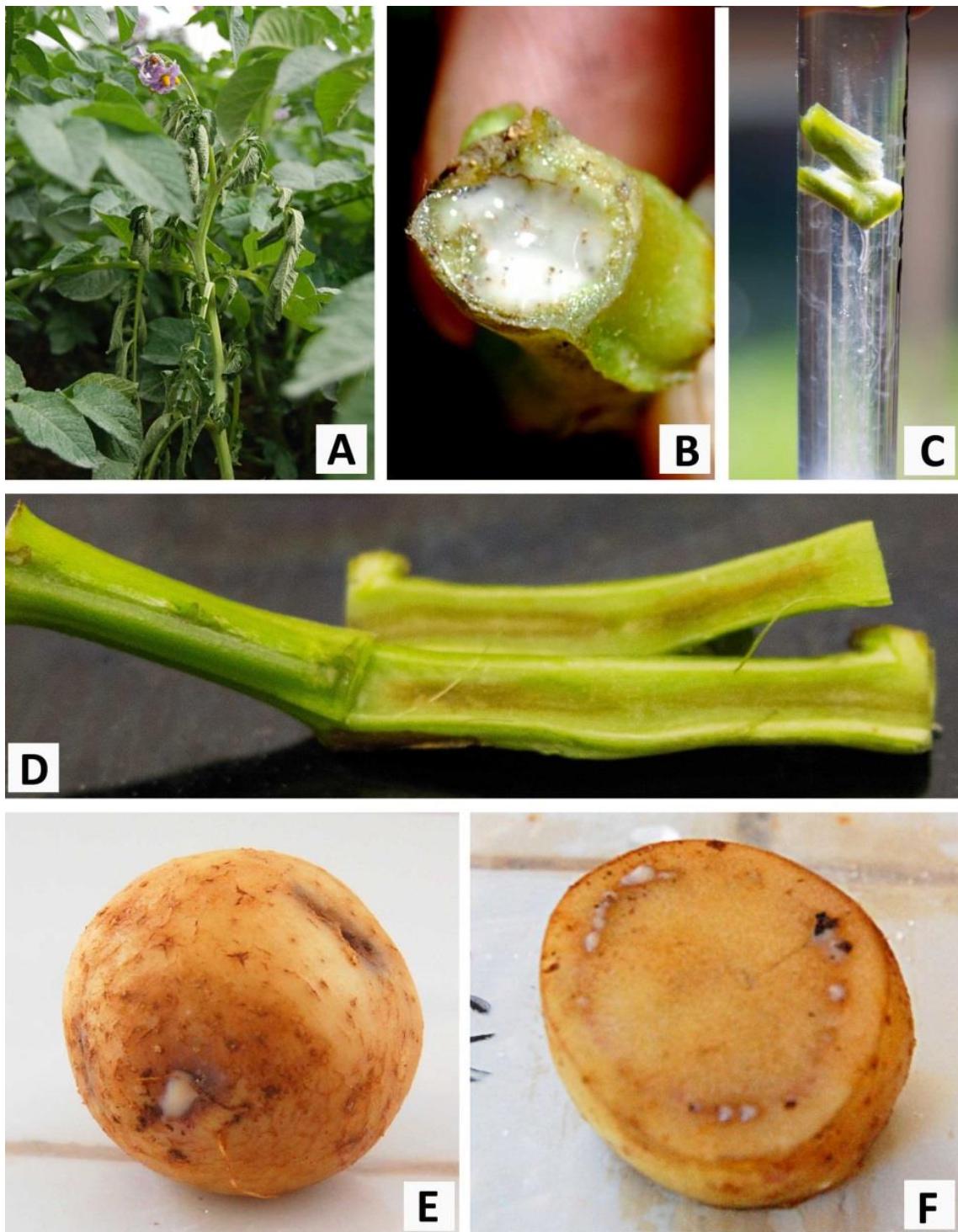


Figure 13 – (A) Symptômes et détection préliminaire du flétrissement bactérien sur plante en cours de flétrissement. (B) Section de tige présentant un exsudat bactérien. (C) Test de l'eau. (D) Coloration brunâtre des vaisseaux. (E) Suintement d'exsudat bactérien au niveau des yeux. (F) Anneau vasculaire de coloration brunâtre avec présence d'exsudat bactérien. Crédits photos : (A, B, E, F) S. Ravelomanantsoa ; (C, D) G. Cellier.

La bactérie peut aussi survivre dans l'eau d'irrigation (Granada & Sequeira 1983 ; Wenneker *et al.* 1999). Dans des conditions environnementales défavorables, la bactérie peut également présenter différentes stratégies de survie comme l'état viable mais non cultivable (Grey & Steck 2001), et la formation de biofilm (Yao & Allen 2007). Lorsque les conditions sont propices, comme la présence d'une hôte sensible, une souche non virulente peut redevenir virulente (Denny *et al.* 1994 ; Poussier *et al.* 2005). Le type de sol peut en outre conditionner la survie des souches du ceRs dans le sol (French 1994 ; Prior *et al.* 1993). En comparant les oxisols et vertisols, Prior *et al.* (1993) ont conclu que les oxisols (sols ferralitiques) sont favorables au développement des souches et que les vertisols ont une action suppressive qui est liée à la présence de montmorillonite, argile qui à l'état de dessiccation, referme la porosité du réseau et empêche la survie des souches. L'humidité du sol affecte également la persistance du pathogène, qui tend à survivre mieux dans un sol humide, mais la croissance est inhibée dans un sol inondé ou desséché (Hayward 1991 ; Moffett *et al.* 1981). En outre, un sol à pH acide faiblement fertile favorise le développement des bactéries (Messiha *et al.* 2007).

FACTEURS DE VIRULENCE

Divers facteurs de virulence sont impliqués dans la colonisation des cellules de la plante et dans la dégradation des composants des parois cellulaires pour libérer les nutriments essentiels à la croissance des bactéries et à leur dispersion dans le tissu de l'hôte, à savoir :

- la sécrétion d'enzymes pectonolytiques et cellulolytiques (β -1,4-cellobiohydrolase (*CbhA*) ; β -1,4-endoglucanase (*Egl*) ; endopolygalacturonase (*PehA*) ; exopolygalacturonases (*PehB* et *PehC*) ; pectin-méthyl-esterase (*Pme*) ; sécrétés par l'intermédiaire d'un système de sécrétion type II (SST2) ;
- la synthèse d'un mucus d'EPS (EPS I) considéré comme le principal facteur de blocage du transport de la sève en raison de leur accumulation dans les vaisseaux du xylème ;
- les gènes *hrp* qui codent pour le système de sécrétion type III (SST3), un déterminant majeur de la pathogénie. Le SST3 est similaire à une seringue moléculaire permettant d'injecter directement un ensemble de protéines effectrices appelées effecteurs de type III (ET3) à l'intérieur de la cellule de la plante (Álvarez *et al.* 2010).

EPIDÉMIOLOGIE

Source d'inoculum, mode de contamination et dispersion

Comme le spectre de plantes hôtes des souches du ceRs est très large, différentes espèces végétales ligneuses ou herbacées pourraient alors conserver cette bactérie à l'état symptomatique ou comme porteurs sains. Les débris de plantes, les plantes adventives qui servent d'hôte intermédiaire, et les matériaux de multiplication végétative (tubercules semences, boutures) contaminés constituent d'importantes sources d'inoculum primaire. La bactérie peut se propager ensuite par le sol ou substrat, par les eaux d'irrigation et de ruissellement ou par les outils (Álvarez *et al.* 2010). L'homme est également un facteur de contamination lors des opérations culturales, et un facteur de dissémination par la multiplication, le transport de matériel végétal infecté d'un endroit à un autre. La bactérie peut également survivre sur le bois (plusieurs jours), le métal (plusieurs semaines), le caoutchouc (plusieurs mois), le fumier de bovins (2-4 semaines) et les déchets de l'industrie de la transformation de pommes de terre (1-2 mois) (Wenneker *et al.* 1998). Enfin, la transmission de proche en proche par les insectes comme les abeilles (*Trigona corvina*), les guêpes (*Polybia* spp), et les mouches (*Drosophila* spp) sont possibles par

contamination de l'insecte ou transfert mécanique. Les insectes vecteurs propagent les infections de manière passive où les souches s'accrochent sur les parties du corps de l'insecte. Néanmoins, un mode de transmission biologique est possible. C'est le cas de la maladie de Sumatra du giroflier (*R. syzygii*) qui est transmis par *Hindola* sp, un homoptère cercopide. Lorsque l'insecte se nourrit dans les tissus conducteurs d'une plante infectée, il peut transmettre la bactérie par injection ou piqûre sur une autre plante. La transmission est de type persistant avec une période de latence d'environ 24 h mais peut être d'une durée plus courte (Agrios 2008 ; Eden-Green *et al.* 1992 ; Supriadi 2005).

Symptômes et détection préliminaire

Au champ, le flétrissement bactérien affecte les plantes en cours de croissance et de végétation. Les symptômes externes se manifestent généralement par une épinastie foliaire (flexion vers le bas) qui s'ensuit par un flétrissement (**Figure 13A**), une chlorose des feuilles (jaunissement progressif des feuilles) qui réduit l'activité photosynthétique de la plante, entraînant ensuite l'affaiblissement de la plante, et le flétrissement généralisé et irréversible dû à la dégradation et l'obstruction des vaisseaux conducteurs par les bactéries qui affecte les mécanismes de nutrition de la plante hôte. Une procédure de diagnostic rapide pour identifier la maladie sur le terrain consiste à couper une tige symptomatique. Une section de tige infectée montre une coloration brune du système vasculaire (**Figure 13D**) et la présence d'un exsudat bactérien blanchâtre (**Figures 13B**), qui forme des filaments lorsqu'on laisse diffuser dans un verre d'eau (**Figure 13C**). La maladie peut également toucher les tubercules comme pour le cas de la pourriture brune. Le tubercule de pomme de terre infecté contient un exsudat bactérien laiteux dans les tissus vasculaires (**Figure 13E**). Des suintements peuvent être observés au niveau des yeux (**Figure 13F**). Au stade avancé de l'infection, les tissus brunissent et le tubercule pourrit.

Diagnostic

Divers outils permettant l'identification de la bactérie du ceRs sont décrites en détail dans la Directive 2006/63/CE de la commission du 14 juillet 2006 modifiant les annexes II à VII de la directive 98/57/CE du Conseil concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* (EU 1998), ou les références sont indiquées ci-dessous. A savoir : • l'isolement sur un milieu sélectif de Kelman ou milieu nutritif SMSA²⁴ et observation de la morphologie des colonies, • la mise en évidence des granules de poly-β-hydroxybutyrate (PHB), • des méthodes sérologiques basées sur la visualisation d'une réaction de reconnaissance entre un antigène (protéine de l'agent pathogène) et l'anticorps (protéine spécifique dirigée contre l'antigène), • des méthodes moléculaires PCR (test de réaction en chaîne par polymérase) qui permet de copier spécifiquement et de façon exponentielle une partie ciblée du génome ADN de l'agent pathogène afin de détecter sa présence, le test biologique qui consiste à inoculer la bactérie chez la plante et observer les symptômes du flétrissement.

STRATEGIES DE LUTTE ET DE GESTION

Aucune méthode curative n'est disponible aujourd'hui pour lutter contre le flétrissement bactérien causé par les souches du ceRs. Les méthodes de lutte sont essentiellement d'ordre prophylactique en adoptant les bonnes pratiques culturales comme choisir des parcelles non infestées, utiliser des tubercules

²⁴ SMSA pour "Modified semi-selective agar medium from South Africa"

Tableau 3 – Les variétés de pomme de terre identifiées par FIFAMANOR comme résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien.

Nom en malgache	Code CIP	Code FIFAMANOR	Comportement à la bactériose vasculaire
Les variétés identifiées résistantes/tolérantes de 1992-2008			
Jaingy	720 118	-	R - MR
Miova	800 934	-	R - MR
Diamondra 1	800 946	H1(1)	MR
Rosita	720 044	K7	R
Tiana	379 418.1	K20	MR
Bemanga	394 903.3	S2	R - MR
-	394 895.7	S1	MR
-	395 438.1	S8	R - MR
-	391 002.6	S9	MR
Bandy Akama	-	variétés paysannes	
Pota mena maso	-		
Les variétés estimées résistantes/tolérantes de 2008-2013			
Jaingy	720 118	-	R - MR
Diamondra 1	800 946	H1(1)	MR
Bemanga	394 903.3	S 2	R - MR

R : Résistant ; MR : Moyennement résistant. Source : R. Randriatsalama, sélectionneur de FIFAMANOR

semences sains, pratiquer la rotation des cultures, détruire les adventices, les plants et les résidus végétaux contaminés, désinfecter les outils et équipements, et entretenir les cultures, amendement et fertilisation du sol. Il s'agit de mesures préventives qui réduisent le potentiel d'inoculum et limitent la dissémination des bactéries. L'usage de pesticides comme les bactéricides ou les inducteurs de résistance chez la plante, l'usage de produits chimiques à action bactériostatique pour contrôler le flétrissement bactérien ont été exploités sans réel succès. Cependant, l'utilisation de produits chimiques a son lot de désagréments, en particulier la détérioration des écosystèmes et les risques pour la santé humaine sans compter le fait que les composés chimiques peuvent entraîner l'apparition d'une résistance chez les bactéries. Par ailleurs, le coût de son application est onéreux. L'utilisation de la lutte physique comme la solarisation, le traitement à la chaleur a également été proposé mais c'est une pratique très technique et difficile d'application. La lutte biologique aux moyens de microorganismes antagonistes ou inducteurs de résistance (comme des souches avirulentes, des bactériophages, des champignons) s'avère prometteur en conditions contrôlées. Cependant son application au champ est restreinte ou un échec. Les activités antibactériennes des principes actifs de plantes sont également exploitées pour contrôler le flétrissement bactérien (Lemaga *et al.* 2005 ; Saddler *et al.* 2005 ; Yuliar *et al.* 2015).

L'utilisation de la résistance variétale constitue la stratégie de choix pour limiter les pertes de production. Une douzaine d'espèces sauvages ou cultivées apparentées à *Solanum tuberosum* sont utilisées comme sources potentielles de résistance (Fock *et al.* 2001 ; Machida-Hirano 2015). La résistance au flétrissement bactérien a été observée chez *S. phureja* (Fock *et al.* 2000), *S. commersonii* (Kim-Lee *et al.* 2005 ; Laferriere *et al.* 1999), *S. stenotomum* (Fock *et al.* 2001) et *S. chacoense* (Chen *et al.* 2013). Cependant, le challenge est particulièrement difficile car les propriétés de résistance peuvent fortement être influencées par l'environnement et le comportement des variétés peut varier selon le type de souches (Champosieau *et al.* 2009 ; Hanson *et al.* 1996 ; Wang *et al.* 1998). Par exemple, chez la pomme de terre, la résistance au flétrissement bactérien a été identifiée chez une variété diploïde, *Solanum phureja* (Schmiediche 1990). La résistance a été efficace dans tous les climats tempérés et contre tous types de souches identifiées. Cependant, lorsque les variétés résistantes ont été cultivées dans des climats chauds et humides, la résistance s'est affaiblie (Schmiediche 1990). De plus, la résistance varie en fonction de l'intensité de la lumière (Sequeira & Rowe 1969). Chez la tomate variété Hawaii 7996, des QTL de résistance semblent présenter une résistance phylotype spécifique : QTL Bwr-12 spécifique au phylotype I et QTL Brw-3 spécifique au phylotype II (Carmeille *et al.* 2006 ; Wang *et al.* 2000). Ce contexte nous montre bien comment la diversité génétique des souches du ceRs constitue un sérieux obstacle au contrôle du flétrissement bactérien et que pour s'en affranchir, il est d'intérêt avant tout de se renseigner sur la biodiversité des souches du ceRs.

Les programmes de sélection pour développer des variétés résistantes sont mis en œuvre dans de nombreuses régions du monde. Le Centre International de la Pomme de terre (CIP) basé à Lima au Pérou et au Kenya en Afrique subsaharienne, est le centre de référence qui œuvre pour le développement de variétés résistantes au flétrissement bactérien, adaptées pour les conditions des climats tempérées et tropicaux. Il met à la disposition des sélectionneurs du monde entier, sur demande, du matériel génétique issu de création ou de sélection avancée. Au cours des années 90, des variétés avancées ont été développées par le CIP après 14 ans de programme de sélection pour le flétrissement bactérien. Différentes variétés tolérantes ont été cultivées à Madagascar, au Burundi, au Rwanda, au Zaïre et au Brésil (French *et al.* 1998 ; Hayward 1991). Récemment, les chercheurs du CIP ont publié une variété de pomme de terre améliorée CIP 394 895.7 qui semble présenter une tolérance élevée à la souche de quarantaine du ceRs IIB-1 (Gutarra *et al.* 2015). Ce résultat est prometteur face à l'ampleur des épidémies qui sévissent dans différents pays du monde.

A Madagascar, le Centre FIFAMANOR est le centre national de recherche qui œuvre pour la promotion de la culture de la pomme de terre, dont la sélection pour la résistance au flétrissement bactérien fait partie intégrante des principales activités de recherche depuis 1972. Appuyé par le CIP et en collaboration étroite avec les petits exploitants agricoles ruraux (recherche participative), FIFAMANOR a identifié et diffusé une dizaine de variétés de pommes de terre comme étant résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien (**Tableau 3**), résultat d'une vingtaine d'années de recherche. Cependant, il n'a pas été précisé à quel(s) groupe(s) de souches elles sont résistantes. Alors que pendant plusieurs années la culture de ces variétés a permis de contrôler le flétrissement bactérien, elles sont aujourd'hui sensibles à la maladie.

V. GENOTYPAGE APPLIQUE AUX SOUCHES DU ceRs

On dispose à ce jour d'une quarantaine de génomes séquencés dont 7 génomes refermés : GMI1000 (I), CFBP2957 (IIA), UY031 (IIB-1), P673 (IIB-4), Po82 (IIB-4), K60 (IIB-7), CMR15 (III), PSIO7 (IV) (Bocsanczy *et al.* 2014 ; Guarischi-Sousa *et al.* 2016 ; Remenant *et al.* 2010 ; Salanoubat *et al.* 2002 ; Xu *et al.* 2011). La taille moyenne du génome est de ~5,59 Mpb qui sont organisées en deux réplicons : le **chromosome** (~3,56 Mpb) et le **mégaplasmide** (~1,99 Mpb) avec un pourcentage en G+C de ~66,6 %. En outre, certaines souches peuvent héberger des plasmides comme les souches CMR15 (pRSC35 : 35 kpb, % G+C = 61,3) et PSIO7 (pRSI13 : 12,8 kpb, % G+C = 61,0) (Remenant *et al.* 2010).

Les travaux de génomique comparative portant sur 19 génomes couvrant les 4 phylotypes montrent que le pangénome du ceRs est composé de ~16.757 gènes dont ~17 % représente le génome de base (core génome) (Ailloud *et al.*, 2015). Les deux réplicons ont une structure mosaïque qui témoigne des transferts horizontaux de gènes et de sa grande plasticité. En effet, diverses études du génome ont démontré que les souches du ceRs sont capables de transformation naturelle (acquisition d'ADN exogène) (Ailloud *et al.* 2015 ; Bertolla *et al.* 1999 ; Boucher *et al.* 1988 ; Brumbley *et al.* 1993 ; Coupat-Goutaland *et al.* 2011 ; Fall *et al.* 2007 ; Guidot *et al.* 2009 ; Salanoubat *et al.* 2002 ; Wicker *et al.* 2012).

Différentes méthodes de génotypage ont été développées et utilisées pour caractériser les souches du ceRs et explorer leur diversité. Citons comme exemple : • la méthode RFLP qui a catégorisé les souches du ceRs en 2 grandes divisions : I et II (Cook *et al.* 1989 ; Hayward 1991) ; • la méthode PFGE qui a permis d'identifier la présence de souches isolées sur géranium dans l'eau d'irrigation issus d'un étang du Nord de Floride et chez les adventices aquatiques, en état de latence. (Hong *et al.* 2008) ; • la technique RAPD pour caractériser les relations génétiques des souches provenant du Nord et du Sud des Philippines (Cueva *et al.* 2013), discriminer et grouper différentes souches collectées de zones agroécologiques différentes de l'Inde (Prasannakumar *et al.* 2012), et étudier la diversité génétique des souches isolées de 7 zones de production du Bangladesh (Nishat *et al.* 2015) ; • la méthode PCR-RFLP pour la caractérisation d'une collection mondiale de souches du ceRs qui a confirmé la division en deux groupes 'Asiaticum' et 'Americanum' et a révélé la présence d'un sous-groupe 'Africanum' (Poussier *et al.* 2000b ; Poussier *et al.* 1999) ; • la technique AFLP a confirmé les résultats obtenus des études PCR-RFLP ci-dessus (Poussier *et al.* 2000b) ; • la méthode Rep-PCR a été comparée avec la RAPD pour discriminer les souches collectées en Inde (Prasannakumar *et al.* 2012 ; Ramsubhag *et al.* 2012) ; • l'amplification des fragments d'ADN ribosomique nucléaire ITS pour la caractérisation du ceRs et la classification en phylotypes (Fegan & Prior 2005) ; • le séquençage complet du génome a permis de confirmer la classification en phylotypes, d'évaluer les liens génétiques entre les souches assignées aux 4 phylotypes (Remenant *et al.* 2010) et de mettre en évidence les transferts de gènes horizontaux chez ceRs (Ailloud *et al.* 2015 ; Guidot *et al.* 2009) ; • le séquençage partiel du gène *egl* pour la classification en sequevar des souches du ceRs (Fegan & Prior 2005) , du gène *mutS* (un gène impliquée dans la réparation des mésappariements de l'ADN) pour décrire la diversité des souches émergentes de ceRs en Guyane (Deberdt *et al.* 2014) ; • le séquençage des gènes ARNr 16S, *hrpB* et *egl* pour étudier les relations phylogénétiques des souches provenant d'Asie (Villa *et al.* 2005) ; • la méthode MLSA pour explorer la diversité génétique, les forces évolutives qui modulent l'évolution des populations d'une collection mondiale de ceRs (Castillo & Greenberg 2007) et de retracer l'histoire évolutive probable des

quatre lignées phylogénétiques (Wicker *et al.* 2012) ; • la technique MLVA a été utilisée pour mettre au point des schémas de génotypage spécifique aux phylotypes (N'Guessan *et al.* 2013) ; et l'identification de marqueurs pour discriminer les groupes de souches IIB-1 ou 'Brown rot' (Parkinson *et al.* 2013).

DIVERSITE GENETIQUE, GENETIQUE DES POPULATIONS ET PHYLOGENIE DE LA COLLECTION MONDIALE INFEREE PAR ANALYSE MLSA

Deux schémas de génotypage MLSA ont été utilisés : • un schéma basé sur 8 gènes publié par Castillo *et al.* (2007) dont 5 gènes de ménages : *ppsA*, *gyrB*, *adk*, *gdhA* et *gapA* ; et 3 gènes associées à la virulence : *hrpB*, *fliC*, et *egl* ; • et un schéma amélioré de Castillo *et al.* (2007) basé sur 9 gènes publiés par Wicker *et al.* en 2012, dont 7 gènes de ménages : *gdhA*, *mutS*, *ppsA*, *adk*, *leuS*, *rplB* et *gyrB* ; et 2 gènes associés à la virulence : *egl* et *fliC*.

L'analyse du polymorphisme des huit gènes réalisé par Castillo *et al.* (2007) a montré une importante diversité génétique de ceRs avec une évolution conditionnée par isolement géographique. Dans l'ensemble la recombinaison semble ne pas contribuer à la diversification en phylotype, suggérant une structure géographique de la diversité génétique. Les gènes impliqués dans la survie seraient soumis à une sélection purificatrice tandis que les gènes directement impliquées dans la pathogénèse (comme l'*egl*) sont soumis à une sélection par la diversification. La classification phylogénétique à partir des neuf gènes a été congruent avec celle obtenue par Fegan et Prior (2005) avec une distinction nette des 4 phylotypes et des groupes IIA et IIB, où le groupe IIB est plus diverse que le groupe IIA probablement dû à une divergence récente. Les phylotypes I et II présentent une structure clonale qui témoignerait de leur large distribution mondiale.

Le schéma de Wicker *et al.* a retenu six gènes du schéma précédent et a rajouté les gènes *mutS*, *leuS* et *rplB*. Wicker *et al.* (2012) ont confirmé la division en phylotypes I à IV et une diversité supérieure chez les phylotypes III et IV par rapport aux phylotypes II et I. Des événements de recombinaison ont été détecté au niveau des gènes *mutS* et *leuS* au sein et entre les phylotypes, où le phylotype I est le plus recombinant. Le phylotype IV est considéré comme le donneur majeur de portion de gènes à tous les autres phylotypes, le phylotype II donneur au phylotype I, le groupe IIA reçoit des phylotype III et IV alors que le groupe IIB reçoit du phylotype IV. Aucun échange génétique a été identifié entre les groupes IIA et IIB et entre les phylotypes I et III. Le scénario de l'évolution proposé par ces auteurs stipule que le phylotype IV est le plus ancestral, suivi du phylotype II d'un côté qui a divergé en deux groupes IIA et IIB, et de l'autre côté le cluster phylotype I-III qui a divergé ensuite en I et III. A partir de la structure de l'arbre phylogénétique, les 4 phylotypes sont subdivisés en 8 clades (**Tableau 2**). Le phylotype I présente une structure panmictique tandis que les phylotypes III à IV présentent relativement une structure clonale avec des recombinaisons au sein de chaque phylotype. Le phylotype II aurait émergé du continent Américain qui s'est ensuite propagé à l'échelle mondiale. Le phylotype I est probablement originaire d'Asie du Nord ou de la région Afrique Australe où il diverge suivie d'une migration en Amérique, Europe, Indonésie et Afrique de l'Ouest.

MARQUEURS VNTRs A FORT POUVOIR DE DISCRIMINATION DES SOUCHES DU cERS.

Quatre schémas MLVA spécifiques aux différents phylotypes ont été développés par N'Guessan *et al.* (2013) pour discriminer les souches du ceRs dont : • un schéma basé sur 13 loci VNTR pour le phylotype I (codé dans ce manuscrit RS1-MLVA13 dont RS2AL03, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, RS1L13, RS1L14, RS3L17, RS3L18, RS3L19, RS3L20, RS2BL23, et RS4L26 ; • un schéma basé sur 12 loci VNTR pour le phylotype II (RS2-MLVA12) dont RS2AL01, RS2AL02, RS2AL03, RS2AL04, RS1L05, RS3L17, RS3L19, RS2BL21, RS2BL22, RS2BL23, RS2BL24, et RS2BL26 ; • un schéma basé sur 11 loci VNTR pour le phylotype III (RS3-MLVA11) dont RS2AL03, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, RS3L17, RS3L18, RS3L19, RS3L20, RS2BL23 et RS4L26 ; • un schéma basé sur 6 loci VNTR pour le phylotype IV (RS4-MLVA6) dont RS2AL01, RS1L05, RS1L10, RS3L17, RS3L19, et RS4L26. • De plus, Parkinson *et al.* en 2013 ont publié 5 loci VNTR hautement polymorphes pour le phylotype IIB-I (RS2B-MLVA5) dont L504, L539, L540, L563, L578. • Guinard *et al.* en 2015 a développé un schéma basé sur 8 loci VNTR pour le phylotype I (RS1-MLVA8) (Guinard, comm. pers., 2016).

Comme attendu eu égard aux données bibliographiques, N'Guessan *et al* (2013) a montré que le génotypage MLVA des souches du ceRs est plus discriminant que le génotypage par séquençage partiel du gène *egl* et le génotypage MLSA. En effet, comme anticipé les marqueurs MLVA ont pu d'une part, différencier les souches IIB-1 (clade 5) monomorphes et liées épidémiologiquement, d'autre part, les souches de l'écotype 'Moko' et de l'écotype IIB4-'NPB' groupés dans le clade 5 qui sont phénotypiquement divergentes. Il a été déduit que la majorité des marqueurs VNTRs utilisés suivent un modèle d'évolution pas à pas qui correspond à l'ajout / retrait d'une répétition. En utilisant les cinq marqueurs VNTR (L504, L539, L540, L563, L578), Parkinson *et al.* (2013) ont pu différencier les souches monophylétiques du groupe IIB-1. En comparant les profils alléliques des souches du ceRs étudiées (collection de souches mondiales plus les souches épidémiques prélevées dans trois localités géographiquement éloignées localisées dans le Royaume Uni), la source et le réservoir d'inoculum (*Solanum dulcamara*, une plante à racines aquatiques qui se trouve en amont des rivières) et le mode de contamination des parcelles (rivière qui sert d'eau d'irrigation des parcelles de culture) ont pu être identifié. Par comparaison des profils alléliques des souches isolées d'une localité (isolées en 2008) avec ceux des souches anciennes datées de 15 ans isolées au même endroit (isolées en 1993 et 1994), la stabilité des marqueurs VNTR dans le temps a été confirmé ainsi que l'association du même type de souche avec l'espèce *Solanum dulcamara*.

Dans cette thèse, nous proposons l'application de ces deux méthodes de génotypage MLSA/MLST et MLVA pour répondre aux questions de recherche énoncées ci-dessous.

OBJECTIFS ET QUESTIONS DE RECHERCHE



Un des défis majeurs auquel la communauté scientifique Malgache est aujourd’hui confrontée pour assurer une production durable et une sécurité alimentaire, consiste à développer des mesures de contrôle ou d’éradiation du flétrissement bactérien causé par le ceRs. Le but principal de mes recherches est d’explorer la diversité génétique des souches du ceRs présentes dans les Hauts Plateaux afin de comprendre les graves épidémies qui sévissent dans les bassins de production de pomme de terre à Madagascar.

1- Constitution des ressources

La première approche de ce travail de thèse a été de constituer une collection de souches du ceRs géo-référencées représentatives des principaux bassins de production de pomme de terre touchés par l’épidémie de flétrissement bactérien, de déterminer les lignées phylogénétiques (phylogenotypes) auxquelles les souches collectées sont assignées, et d’établir leur répartition géographique.

La deuxième approche de ce travail est de développer des schémas de génotypage adaptés aux populations étudiées et capables de détecter le polymorphisme génétique entre souches. Nous avons retenu les approches MLVA et MLSA/MLST qui sont très utilisées pour caractériser la diversité des génotypes chez de nombreuses bactéries pathogènes. Elles ont l’avantage d’être rapides, sensibles, spécifiques et discriminantes.

2- Déploiement des outils d’analyse moléculaires pour décrire les épidémies

L’approche populationnelle a consisté à mesurer et caractériser la diversité génétique, à déterminer la structure génétique des populations ceRs malgaches, et décrire les relations de parenté entre les souches et le niveau des affiliations phylogénétiques, en référence à un ensemble de souches du ceRs représentatives de la diversité génétique reconnue à ce jour dans ce complexe d’espèces.

L’intégration des différentes données recueillies a permis d’obtenir une perspective d’épidémiologie moléculaire, c’est à dire établir les relations épidémiologiques au sein de la collection ceRs malgache à différentes échelles spatiales (localités, zones agroécologiques, régions), identifier le (les) type(s) de souche(s) émergentes responsable(s) de l’épidémie et leurs origines géographiques, et mettre en exergue les facteurs qui influencent la dynamique de l’épidémie, i.e. identifier les sources potentielles ou foyers de contamination, les modes et voies de dispersion, l’échelle de répartition des souches épidémiques de façon à orienter les stratégies de lutte à des échelles spatiales.

Enfin, dans ce travail de thèse nous avons évalué la résistance d’un corpus de fonds génétiques de pomme de terre (Core-PdtM) vis-à-vis des types de souches du ceRs représentatives de la diversité génotypique (Core-RSM). Ces variétés de pomme de terre sont des variétés cultivées dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches et sont estimées résistantes/tolérantes au flétrissement bactérien – mais à quel(s) type(s) de souche(s) ? Cette étude est fondatrice pour confirmer les niveaux de sensibilité de ces variétés déployées et préparer de futurs programmes d’amélioration de la résistance. Enfin, les relations entre diversité génétique, phylogénie et pathogénicité des souches sont discutées dans cette partie.

A notre connaissance, c’est la première étude à grande échelle de la diversité génétique, de phylogénie et d’épidémiologie des souches du ceRs qui sévissent dans les Hauts Plateaux de Madagascar.

Comme indiqué, le flétrissement bactérien inquiète actuellement par son caractère atypique car épidémique et surtout de par son ampleur dans les bassins de production. Fort des constats précédemment exposés, les questions importantes posées au début de cette recherche étaient de :

- ❖ déterminer l'origine des épidémies et plus particulièrement les souches du ceRs responsables : • variant du pouvoir pathogène chez le phylotype III qui se rencontrent habituellement sur les collines en altitude (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988) et aurait migré dans les bas-fonds et plaines d'altitude en contournant la résistance des variétés résistantes/tolérantes de pomme de terre ; ou • variant du pouvoir pathogène chez le phylotype I dont les souches sont plutôt distribuées en basse et moyenne altitudes, mais certaines ont acquis l'aptitude à s'adapter en altitude (allant de 1600 à 1800 m) ; ou • des souches exotiques récemment introduites à Madagascar ; ou • des souches cryptiques qui seraient déjà présentes dans le milieu naturel, mais n'ont encore été caractérisées génétiquement ou d'autres souches qui auraient fait un saut d'hôte vers la pomme de terre. Notons que les quatre phylotypes hébergent des souches qui sont capables d'infecter la pomme de terre (Cellier & Prior 2010).
- ❖ décrire les différentes populations bactériennes, leur dynamique et les facteurs aggravant la propagation rapide du flétrissement bactérien dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches.

Dans ces travaux, un intérêt particulier a été accordé à **l'étude de la diversité génétique des souches du ceRs assignées au phylotype III** qui sont reparties en Afrique et dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) où elles semblent endémiques (Fegan & Prior 2005). En effet, malgré l'importance économique du ceRs en Afrique et dans les SOOI, on ne dispose aujourd'hui que d'informations fragmentaires sur la biologie des souches de phylotype III. Par conséquent, nous ne disposons d'aucune donnée sur la biologie des populations de ces souches, d'où l'intérêt stratégique de cette étude. De manière assez symptomatique, il n'existe à ce jour qu'un seul génome complet séquencé pour le phylotype III (souche CMR15 ; assembly GCA_000427195.1). Les données de diversité des souches de phylotype III malgaches obtenues à partir de cette thèse viendront compléter les études de Poussier *et al.* (1999, 2000), Fegan et Prior (2005), Mahbou (2009), Remenant *et al.* (2010) qui ont anticipé par des études phylogénétiques, l'existence de trois sous-groupes distincts au sein de ce phylotype : • les souches des régions Afrique du Sud et Océan Indien incluant les souches du Zimbabwe, Madagascar et la Réunion ; • les souches d'Afrique Centrale représentées par les souches du Cameroun ; • et les souches marginales composées par les souches du Burkina Faso.

Rapport Gratuit.Com

CHAPITRE 1. DÉVELOPPEMENT DU SCHÉMA MLVA DU PHYLOTYPE III



INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien est connu depuis longtemps à Madagascar. Jusqu'ici notre connaissance sur la diversité génétique des souches du ceRs identifiées dans l'île se limitent à la classification en race et biovar pour les souches race 1 biovar 1 (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988 ; Rahetlah 2008 ; Rahetlah *et al.* 2008 ; Randriamampianina 1997 ; Randrianangaly 2003) qui pourraient tomber dans deux groupes du phylotype II (IIA et IIB), à la classification en phylotypes : phylotype I, localisé majoritairement dans les zones côtières de basse altitude et des régions de moyenne altitude ; et phylotype III, prévalant dans les régions d'altitude aux températures plus fraîches (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988). Des études ont cependant révélé l'existence d'une forte diversité génétique au sein de chacune de ces lignées phylogénétiques, notamment chez le phylotype III (Mahbou Somo Toukam *et al.* 2009 ; Wicker *et al.* 2012 ; Xu *et al.* 2009) et également une différence significative du niveau d'agressivité des souches (Katawczik *et al.* 2016 ; Lebeau *et al.* 2010 ; Lin *et al.* 2014). De telles informations demeurent néanmoins encore méconnues pour les souches prévalentes à Madagascar. Ainsi, afin d'apporter des réponses aux problèmes d'épidémie de flétrissement bactérien dans les bassins de production de pomme de terre à Madagascar, il est primordial de caractériser finement la diversité des souches du ceRs présentes dans ces bassins. Pour cela, nous avons besoin d'un outil de génotypage suffisamment sensible nous permettant de discriminer les souches du ceRs entre elles et d'expliquer l'épidémie. Comme exposé précédemment la méthode MLVA utilisant des marqueurs VNTR est un puissant outil d'investigation dans les pathologies infectieuses. Rappelons qu'elle se démarque des autres méthodes de génotypage par son pouvoir discriminant important. Outre, elle a donné des résultats qui ont permis d'établir des liens entre différents isolats ou populations de pathogènes et d'apporter des éclairages sur des questions d'ordre épidémiologique autant à l'échelle de la parcelle, de la localité, de la région, qu'à l'échelle du pays.

Comme indiqué, quatre schémas MLVA (RS1-MLVA13, RS2-MLVA12, RS3-MLVA11, RS4-MLVA6) ont été proposés par N'Guessan *et al.* en 2013, permettant de différencier respectivement les souches du ceRs assignées aux quatre phylotypes (I à IV). Ces schémas résultent de la combinaison de marqueurs issus de 22 loci VNTR polymorphes identifiés chez des souches de référence appartenant à des phylotypes différents : RS2AL01 à RS2AL04 identifiés chez la souche CFBP2957 (phylotype IIA) ; RS1L05 à RS1L07, RS1L9, RS1L10, RS1L12 à RS1L14 identifiés chez la souche GMI1000 (phylotype I) ; RS3L17 à RS3L20 chez la souche CMR15 (phylotype III) ; RS2BL21-RS2BL22 identifiés chez IPO1609 (phylotype IIB-1) ; RS2BL23 à RS2BL25 chez Molk2 (phylotype IIB-3) ; et RS4L26 identifié chez la souche PSI07 (phylotype IV). En outre, 5 marqueurs VNTR ont été publiés par Parkinson *et al.* (2013) pour génotyper les souches du ceRs du phylotype IIB-1.

Compte tenu de la présence des phylotypes I et III à Madagascar, et sous réserve de la présence ou l'émergence d'autres lignées phylogénétiques (II ou IV), les deux schémas MLVA : RS1-MLVA13 et RS3-MLVA11 (respectivement spécifiques pour les phylotypes I et III) développés par N'Guessan *et al.* (2013) étaient ainsi disponibles pour génotyper les souches du ceRs malgaches. D'une part, le schéma RS1-MLVA13 est composé de 13 marqueurs : RS2AL03, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, RS1L13, RS1L14, RS3L17, RS3L18, RS3L19, RS3L20, RS2BL23, et RS4L26 ; mis au point à partir de 201 souches du ceRs du phylotype I. D'autre part, le schéma RS3-MLVA11 est composé de 11

marqueurs : RS2AL01, RS2AL02, RS2AL03, RS2AL04, RS1L05, RS3L17, RS3L19, RS2BL21, RS2BL22, RS2BL23, RS2BL24, et RS2BL26 ; mis au point à partir de 36 souches du ceRs du phylotype III.

Toutefois, la typabilité des souches (i.e. qui reflète la capacité des loci à être amplifiés pour chaque souche) nous a interpellé, notamment pour le schéma RS3-MLVA11 où certains loci montrent une valeur de typabilité des souches inférieure à 80 % : RS1L09 (78 %), RS1L12 (75 %), RS4L26 (22 %) (**Tableau 4**). En effet, N'Guessan *et al.* a mentionné que dans l'ensemble, les différents marqueurs montrent une spécificité pour le phylotype. La typabilité des loci qui ont été identifiés chez un phylotype donné est donc en majorité élevée (> 90 %) chez les souches appartenant au même phylotype, tandis que certains loci montrent une faible typabilité (< 20 %), voire les loci ne sont pas amplifiés chez les souches appartenant à un phylotype différent de celui où les marqueurs étaient identifiés. Pour illustrer, le locus RS1L09 identifié chez une souche appartenant au phylotype I a été amplifié chez 99 % de souches du phylotype I contre 77 % de souches du phylotype III ; ou encore RS4L16 a été amplifié chez plus de souches du phylotype IV (67 %) que chez le phylotype III (22 %). Un tel résultat pourrait être expliqué par l'absence du locus homologue dans le génome de la souche génotypée, ou les amores ne sont pas adaptées, ou par des biais de PCR conduisant à un mauvais appariement des amores (Kanagawa 2003). Toutefois, bien que les loci aient été amplifiés pour certaines souches, compte tenu des différences génétiques entre les quatre phylotypes en plus de l'hypervariabilité des VNTR, cette problématique nous a laissé perplexe quant à la nature des amplicons obtenus, à l'homologie des loci amplifiés pour un locus donné, à la composition et à la structure des séquences répétées en tandem (TR) dans chaque locus. C'est pourquoi nous avons jugé indispensable de vérifier la pertinence des marqueurs qui posaient problèmes dans le schéma RS3-MLVA11.

Cette opération, totalement imprévue dans l'agenda de notre projet de recherche, a abouti au développement d'un nouveau schéma MLVA spécifique au phylotype III : RS3-MLVA16. Le travail a fait l'objet d'une publication scientifique dans le journal Peer J, intitulée : **A novel multilocus variable number tandem repeat analysis typing scheme for African phylotype III strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex**, Mai 2016 (<https://doi.org/10.7717/peerj.1949>).

Tableau 4 – Amplifiabilité des marqueurs VNTR testés par N’Guessan *et al.* (2013).

Number of strains of each phylotype amplified per individual locus. Percentages (in brackets) are calculated based on the total number of strains of the corresponding group (last row).

Code	Locus name	Phylotype I	Phylotype IIA	Phylotype IIB	Phylotype III	Phylotype IV	All phylotypes
RS2AL01	CFBPch0847	2 (0.99)	44 (93.61)	43 (97.73)	6 (16.66)	7 (77.77)	102 (30.26)
RS2AL02	CFBPch1968B	3 (1.49)	46 (97.87)	43 (97.73)	36 (100)	8 (88.88)	136 (40.35)
RS2AL03	CFBPch2508	200 (99.50)	45 (95.74)	42 (95.45)	33 (91.66)	9 (100)	329 (97.62)
RS2AL04	CFBPch2866	2 (0.99)	39 (82.97)	1 (2.27)	0 (0)	0 (0)	42 (12.46)
RS1L05	ch0127	196 (97.51)	41 (87.23)	38 (86.36)	34 (94.44)	8 (88.88)	317 (94.06)
RS1L06	ch0214	190 (94.52)	0 (0)	0 (0)	7 (19.44)	4 (44.44)	201 (59.64)
RS1L07	ch0587	198 (98.50)	29 (61.70)	13 (29.54)	1 (2.77)	7 (77.77)	248 (73.59)
RS1L08	ch0692	199 (99.00)	36 (76.59)	0 (0)	36 (100)	6 (66.66)	277 (82.19)
RS1L09	ch0754c	199 (99.00)	2 (4.25)	0 (0)	28 (77.77)*	1 (11.11)	230 (68.24)
RS1L10	ch0827	200 (99.50)	1 (2.13)	0 (0)	36 (100)	8 (88.88)	245 (72.70)
RS1L11	ch1128	198 (98.50)	0 (0)	0 (0)	34 (94.44)	2 (22.22)	234 (69.43)
RS1L12	ch1459	186 (92.53)	1 (2.13)	0 (0)	27 (75)*	1 (11.11)	215 (63.79)
RS1L13	ch1549	198 (98.50)	1 (2.13)	1 (2.27)	18 (50)	1 (11.11)	219 (64.98)
RS1L14	ch1844	193 (96.01)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (11.11)	194 (57.56)
RS1L15	ch2453	199 (99.00)	45 (95.74)	35 (79.54)	36 (100)	8 (88.88)	323 (95.84)
RS1L16	ch3178	199 (99.00)	46 (97.87)	41 (93.2)	36 (100)	9 (100)	331 (98.21)
RS3L17	CMR026	199 (99.00)	45 (95.74)	42 (95.45)	36 (100)	9 (100)	331 (98.21)
RS3L18	CMR1071	200 (99.50)	3 (6.38)	0 (0)	36 (100)	1 (11.11)	240 (71.21)
RS3L19	CMR2699	200 (99.50)	45 (95.74)	42 (95.45)	36 (100)	9 (100)	332 (98.51)
RS3L20	CMRmp0985	201 (100)	2 (4.25)	0 (0)	36 (100)	2 (22.22)	241 (71.51)
RS2BL21	IP0100	2 (0.99)	46 (97.87)	43 (97.72)	0 (0)	1 (11.11)	92 (27.29)
RS2BL22	IP4134	43 (21.39)	45 (95.74)	41 (93.2)	2 (5.55)	2 (22.22)	133 (39.46)
RS2BL23	M0786	200 (99.50)	45 (95.74)	42 (95.45)	36 (100)	9 (100)	332 (98.51)
RS2BL24	M1936	3 (1.49)	44 (93.62)	41 (93.2)	0 (0)	4 (44.44)	92 (27.29)
RS2BL25	M5321	2 (0.99)	43 (91.5)	41 (93.2)	0 (0)	0 (0)	86 (25.51)
RS4L26	PSImp1685	62 (30.84)	2 (4.25)	0 (0)	8 (22.22)*	6 (66.66)	78 (23.14)
Total strains		201	47	44	36	9	337

Ce tableau est repris de N’Guessan *et al.* (2013). Il montre les différents loci TR testés par N’Guessan *et al.* pour identifier les quatre schémas MLVA phylotype-spécifique, le nombre de souches testées par phylotype, le nombre de souches amplifiées et le pourcentage de souches typées. Les loci TR montrant une faible valeur d’amplification pour le schéma MLVA phylotype III proposée sont marquées par un astérisque (*).

METHODOLOGIE

Les grandes lignes de cet important travail de développement de schéma MLVA consistaient en :

1. L'évaluation *in-silico* de la présence et la structure des TR au sein des sept loci (RS2AL03, RS2BL23, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, et RS4L26), identifiés à partir de souches hors phylotype III, dans le génome de la souche de référence CMR15 du phylotype III.
2. L'identification des répétitions en tandem à partir du génome de la souche CMR15 et la sélection de celles qui répondent au mieux aux critères que nous avons définis.
3. La recherche d'amorces et la mise au point des conditions PCR favorisant une bonne amplification des loci. Pour cela, pour chaque couple d'amorces sens et antisens, une gamme de température d'hybridation a été testée. La concentration des réactifs a été ajustée.
4. L'évaluation du polymorphisme des loci par génotypage de souches du ceRs éloignées géographiquement et épidémiologiquement liées issues de la collection mondiale phylotype III (n = 65) pour apprécier leur pouvoir de discrimination.
5. L'évaluation de la performance des marqueurs et du nouveau schéma MLVA par comparaison avec la méthode MLST. Le schéma MLST est composé de 7 loci (*gdhA*, *gyrB*, *rplB*, *leuS*, *adk*, *mutS*, *egl*). Il était ici question d'évaluer la concordance des informations fournies par les données générées par les deux méthodes de génotypage.

A novel multilocus variable number tandem repeat analysis typing scheme for African phylotype III strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex

Santatra Ravelomanantsoa^{1,2,3}, Isabelle Robène¹, Frédéric Chiroleu⁴, Fabien Guérin², Stéphane Poussier⁵, Olivier Pruvost¹ and Philippe Prior^{1,6}

¹ BIOS UMR PVBMT, CIRAD, Saint-Pierre, La Réunion, France

² UMR PVBMT, Université de la Réunion, Saint-Denis, La Réunion, France

³ Faculty of Sciences, University of Antananarivo, Antananarivo, Madagascar

⁴ UMR PVBMT, CIRAD, Saint-Pierre La Réunion, France

⁵ UMR PVBMT, Université de la Réunion, Saint-Pierre La Réunion, France

⁶ Department of Plant Health and Environment, INRA, Paris, France

ABSTRACT

Background. Reliable genotyping that provides an accurate description of diversity in the context of pathogen emergence is required for the establishment of strategies to improve disease management. MultiLocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) is a valuable genotyping method. It can be performed at small evolutionary scales where high discriminatory power is needed. Strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) are highly genetically diverse. These destructive pathogens are the causative agent of bacterial wilt on an unusually broad range of host plants worldwide. In this study, we developed an MLVA scheme for genotyping the African RSSC phylotype III.

Methods. We selected different publicly available tandem repeat (TR) loci and additional TR loci from the genome of strain CMR15 as markers. Based on these loci, a new phylotype III-MLVA scheme is presented. MLVA and multiLocus sequence typing (MLST) were compared at the global, regional, and local scales. Different populations of epidemiologically related and unrelated RSSC phylotype III strains were used.

Results and Discussion. Sixteen polymorphic TR loci, which included seven microsatellites and nine minisatellites, were selected. These TR loci were distributed throughout the genome (chromosome and megaplasmid) and located in both coding and intergenic regions. The newly developed RS3-MLVA16 scheme was more discriminative than MLST. RS3-MLVA16 showed good ability in differentiating strains at global, regional, and local scales, and it especially highlighted epidemiological links between closely related strains at the local scale. RS3-MLVA16 also underlines genetic variability within the same MLST-type and clonal complex, and gives a first overview of population structure. Overall, RS3-MLVA16 is a promising genotyping method for outbreak investigation at a fine scale, and it could be used for outbreak investigation as a first-line, low-cost assay for the routine screening of RSSC phylotype III.

Submitted 8 January 2016

Accepted 29 March 2016

Published 5 May 2016

Corresponding author

Philippe Prior, philippe.prior@cirad.fr

Academic editor

Irene Newton

Additional Information and
Declarations can be found on
page 17

DOI 10.7717/peerj.1949

©Copyright

2016 Ravelomanantsoa et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Evolutionary Studies, Genomics, Microbiology, Parasitology, Plant Science

Keywords *Ralstonia solanacearum* species complex, African phylotype III, MLVA, MLST

How to cite this article Ravelomanantsoa et al. (2016), A novel multilocus variable number tandem repeat analysis typing scheme for African phylotype III strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex. **PeerJ** 4:e1949; DOI 10.7717/peerj.1949

INTRODUCTION

Genotyping with appropriate genetic markers (i.e., markers adapted for the evolutionary scale being investigated) is a valuable tool that has been effectively used to study infectious diseases, resolve the epidemiology of pathogens, and improve disease management strategies (Maiden et al., 1998; Michael, 2001; Coloma & Harris, 2009; Harrington et al., 2014). Disease outbreaks pose a serious and continuing threat to sustainable agriculture throughout the world. Genotyping is a rapidly developing molecular approach that can be used to address the increasing threats from crop disease (Fox & Narra, 2006; Vinatzer & Bull, 2009). Portable and highly resolved deoxyribonucleic acid (DNA) sequence-based typing methods have been extensively investigated and successfully applied to characterize the causative agents of plant diseases, their transmission pathways, and their spatiotemporal expansion. These studies ideally use whole-genome sequence data to provide precise and robust genomic information regarding genetic variation within individuals. However, a simple and cost-effective genotyping method is needed for routine use in disease outbreak investigations.

Multilocus sequence typing (MLST) and multilocus sequence analysis (MLSA) typically determine sequence polymorphisms in 7 – 8 housekeeping genes. These genotyping methods are consistently used to infer genetic relationships and evolutionary history on a global scale. Therefore, these methods are recognized as the gold standard for the global epidemiology of bacterial pathogens (Maiden, 2006). However, genotyping techniques with higher discriminatory power are useful for investigations at small evolutionary scales and the study of monomorphic pathogens (Achtman, 2008).

Multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) is an alternative genotyping method that targets tandem repeats (TRs), which are some of the most polymorphic loci found in genomes (Van Belkum et al., 1998). Variation in TRs may be generated because of DNA polymerase slippage during replication and/or unequal recombination at TR loci (Jeffreys, 1987). TRs are subdivided according to the sizes of the repeat units: microsatellites contain 1 – 6 bp repeat units and minisatellites contain 7 – 60 bp repeat units (Vergnaud & Pourcel, 2009). TRs can be perfect (an uninterrupted array of motif copies) (Weber, 1990; Kashi & King, 2006), imperfect (an array with some variation in the sequence of one or more of the repeating motifs) (Kashi & King, 2006), or compound (an array containing various repeating motifs) (Weber, 1990). MLVA is used to assess the variation in the TR copy number at multiple loci to differentiate isolates. MLVA is increasingly used to resolve the genetic relatedness among closely related strains at micro-evolutionary levels (Lindstedt, 2005; Lindstedt et al., 2013).

Bacterial wilt caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC) is one of the most destructive plant diseases worldwide. RSSC affects a wide range of host species—primarily vegetable, woody, and ornamental species. This soil-borne and xylem-limited bacterium is an unusually heterogeneous and highly disparate organism (Hayward, 1964; Gillings & Fahy, 1993; Prior, Allen & Elphinstone, 1998; Fegan & Prior, 2005); most likely it is naturally competent for transformation (Coupot et al., 2008) and recombination (Wicker et al., 2012). The RSSC is genetically differentiated into four major phylogenetic lineages,

which are known as phylotypes. The phylotype designation is related to the geographical origin of strains: phylotype I contains strains from Asia, phylotype II contains strains from the Americas, phylotype III contains strains from Africa and the Indian Ocean, and phylotype IV contains strains from Indonesia, Japan, and Australia (Prior & Fegan, 2005). The characterization of RSSC isolates at both broad and small spatial scales is crucial for understanding the biology and epidemiology of bacterial wilt disease. This characterization is necessary for the development of effective control strategies.

Few population and evolutionary genetics studies have used RSSC populations to investigate bacterial wilt outbreaks in fine-scale geographical areas. For this purpose, MLSA (Wicker *et al.*, 2012) and phylotype-specific MLVA schemes have been developed (N'Guessan *et al.*, 2013; Parkinson *et al.*, 2013).

Poussier, Vandewalle & Luisetti (1999) first described the RSSC strains in phylotype III. To date, these strains have only been isolated in a few countries in Sub-Saharan Africa (Angola, Burkina Faso, Cameroon, Guinea, Ivory Coast, Kenya, and Zimbabwe) and the Southwest Indian Ocean (Madagascar and Reunion). Phylotype III strains cause bacterial wilt epidemics, which impact food security by compromising crops and livelihoods at the household and national levels. However, the population biology of phylotype III strains remains poorly investigated and poorly understood. Knowledge of their population biology is necessary to resolve important aspects of bacterial wilt control, especially the management of resistant cultivars. Among all of the publicly available RSSC genomes (~40), the genome of only one phylotype III strain (CMR15) (Remenant *et al.*, 2010) is currently available. Only a few phylotype III strains are maintained in international collections.

In this work, we first evaluated the RS3-MLVA11 scheme developed by N'Guessan *et al.* (2013), which was designed to type RSSC phylotype III. This scheme was based on 11 TR loci selected from strains belonging to different RSSC phylotypes (I, IIA, IIB, III, and IV) and was tested on a limited collection of isolates (N'Guessan *et al.*, 2013). We demonstrated that the RS3-MLVA11 scheme was not completely appropriate for the study of the genetic structure of RSSC phylotype III populations. We developed an improved MLVA scheme specific for RSSC phylotype III. Compared to MLST, this MLVA achieved better resolution by subtyping MLST clones when performing investigations at a small spatiotemporal scale.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and populations

Three populations of RSSC phylotype III isolates were used (Table S1). All 65 isolates used in this study were pooled in collection C65. This is a diverse collection that includes epidemiologically unrelated strains and closely related strains from the same country and the same outbreak. Population P35 is a worldwide population composed of 35 unrelated isolates originating from Africa (Angola, Burkina Faso, Cameroon, Guinea, Ivory Coast, Kenya, and Zimbabwe) and the Southwest Indian Ocean (Reunion and Madagascar); these strains were isolated from various host species. This population includes isolates used in previous MLVA ($n = 21$) and MLSA ($n = 14$) studies (N'Guessan *et al.*, 2013; Wicker *et al.*, 2012). Population P20 contains 20 isolates collected in 2005 from 3 different

agro-ecological zones (AEZ3, AEZ4, and AEZ5) in Cameroon; these strains were isolated from garden huckleberry (*Solanum scabrum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), potato (*Solanum tuberosum*), and pepper (*Capsicum annuum*) (Mahbou Somo Toukam *et al.*, 2009). Population P17 contains 17 epidemiologically related isolates recovered in 2005 from tomatoes grown in a single field in Cameroon (Mfou, AEZ3) (Table S1).

Isolates were routinely grown at 28 °C on Nutrient Broth, Kelman's triphenyl tetrazolium chloride agar medium (Kelman, 1954), and modified semi-selective agar medium from South Africa (Elphinstone *et al.*, 1996). A 1-μl loop was used to collect fresh overnight colonies from agar plates. Cells were suspended in 200 μl of sterile HPLC-grade water and used as templates for PCR amplification.

Design of the optimized MLVA scheme

The design of the optimized MLVA scheme involved the following three major steps: the TR loci to be characterized were selected, the primers for gene amplification were designed, and the multiplex PCR reactions were optimized.

Examination of previous TR loci (RS3-MLVA11 scheme)

The RS3-MLVA11 scheme (N'Guessan *et al.*, 2013) consisted of the following 11 TR loci: RS2AL03, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, RS3L17, RS3L18, RS3L19, RS3L20, RS2BL23, and RS4L26. These markers were designed using publicly available genomes of strains belonging to different RSSC phylotypes.

RS2AL03 was identified from the phylotype IIA strain CFBP2957. RS2BL23 was identified from the IIB strain MOLK2. RS1L05, RS1L09, RS1L10, and RS1L12 were identified from the phylotype I strain GMI1000. RS4L26 was identified from the phylotype IV strain PSI07. RS3L17, RS3L18, RS3L19, and RS3L20 were identified from the phylotype III strain CMR15. The average nucleotide identity (ANI) values are as follows: 91.2% between CMR15 and CFBP2957 (IIA-36), where RS2AL03 is identified; 90.9% between CMR15 and Molk2 (IIB-3), where RS2BL23 is identified; 96.3% between CMR15 and GMI1000 (I-18), where RS1L05, RS1L09, RS1L10, and RS1L12 are identified; and 92.4% between CMR15 and PSI07 (IV-10), where RS4L26 is identified (Remenant *et al.*, 2010). We examined the presence and structure of TR loci identified from strains outside phylotype III (RS2AL03, RS2BL23, RS1L05, RS1L09, RS1L10, RS1L12, and RS4L26) in the genome of the reference phylotype III strain CMR15. In silico analyses were performed using the Geneious v7.1.7 software package (Biomatters, Auckland, New Zealand). Sequence alignments were performed for each locus to verify the presence of the TRs in the chromosome or megaplasmid replicons of CMR15. Sequence alignments were also used to confirm that the configuration of each locus and its repeat units met the following protocol requirements: the lengths of the PCR products were between 100 and 500 bp for matching the ladder used during multiplex capillary electrophoresis, the TR sequence was not duplicated in the genome, typeability reached 100% for phylotype III strains, and the sequence identity within the TR array was greater than 80%, as recommended (Vergnaud & POURCEL, 2009). This recommendation is because variation at TR loci with short repeat units is highly dependent upon the homogeneity of the repeat stretches (POURCEL & VERGNAUD, 2011).

Identification of new TR loci

We used the complete genome of the phylotype III strain CMR15 to identify new TR loci (accession numbers [FP885895](#) for the chromosome and [FP885896](#) for the megaplasmid). The CMR15 genome was screened for repetitive DNA sequences using the Tandem Repeats Finder software package (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) ([Benson, 1999](#)). Candidate TRs were selected according the following criteria. (i) No *indel* occurred between adjacent copies. (ii) The sequence identity within the TR array was greater than 85%. (iii) The size of the consensus pattern was ≤ 20 bp. (iv) The copy number was greater than 3. In the event of multiple TR assignations reported for a same locus, the shorter repeat was retained. (v) Regions containing overlapping or successive TR arrays were not considered. (vi) The TR was found only once within the genome. (vii) The PCR products ranged in length from 100 to 500 bp for matching the ladder used during multiplex capillary electrophoresis.

Primer design and assay optimization

Primer pairs flanking the TR candidates were designed using the Primer3 v4.0.0 software package (<http://primer3.ut.ee/>) ([Untergasser et al., 2012](#)). The conditions for selecting the primers were the primer size (18 – 23 bp), melting temperature (T_m ; 57 – 65 °C), and guanine-cytosine (GC) content (40 – 70%). Primers with a low probability of dimer or hairpin loop formation and product sizes ranging between 100 and 500 bp were selected. The potential for secondary structure formation and dimerization was assessed using the OligoAnalyzer v3.1 software package (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) (OligoAnalyzer[®] Tool; IDT, Coralville, IA, USA). Oligonucleotides were synthesized by Macrogen, Inc. (Seoul, Korea). The primers were tested via simplex PCR using RSSC isolates from population P35. PCR amplification was performed in 15- μ l reaction volumes containing 7.5 μ l 2 \times QIAGEN Type-it Multiplex PCR Master Mix, 3 μ l 5 \times Q-solution (Qiagen, Hilden, Germany), 1.5 μ l of a forward and reverse primer mix (2 μ M each), 2 μ l sterile HPLC-grade water, and 1 μ l of a bacterial suspension as a template. The PCRs were performed in a GeneAmp[®] PCR System 9,700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the following conditions: an initial denaturation step at 95 °C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at a temperature gradient (57, 60, 62, and 64 °C) for 90 s, and extension at 72 °C for 30 s; and a final extension step at 60 °C for 30 min. Six microliters of the PCR product were mixed with 1 μ l of loading dye solution and loaded into a 1.5% (w/v) SeaKem[®] LE Agarose (Lonza, Basel, Switzerland) gel for electrophoresis. The gels were stained with ethidium bromide. The bands were visualized/photographed under ultraviolet (UV) light using the G:BOX gel imaging system (Syngene, Cambridge, UK). The molecular weights were estimated by comparison with a 100-bp DNA ladder (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Loci with poor amplification and/or that lacked diversity were discarded. Sequences of the primers used to amplify previous TR loci were obtained from a previous report ([N'Guessan et al., 2013](#)); one exception was RS1L12, which was redesigned to improve amplification. The primer nomenclature has been adapted to the nomenclature for oligonucleotide probes described previously ([Alm et al., 1996](#)). Descriptions of the TR loci and the corresponding 5'-labelled and unlabelled primer sets used in this study are presented in [Table S2](#).

According to the amplicon size, four sets of primer mixes, which consisted of four specific primer pairs each, were created for the simultaneous amplification of multiple TR loci (multiplex PCR) (Table S2). The suitability of the primer combinations was evaluated via PCR, and the band profiles generated were assessed via gel electrophoresis. The multiplex PCR protocol was performed as described for simplex PCR, with some modifications. The reactions included 1.5 μ l of a primer mix containing four primer pairs (2 μ M each), and the optimal annealing temperature for each set of primer mixes was 62 °C.

MLVA genotyping

Prior to the size analyses, 1 μ l of fluorescent PCR products was diluted in sterile HPLC-grade water; the dilutions were between 1:10 and 1:50, as determined from the test runs. The diluted aliquots (1 μ l) were mixed with 10.7 μ l Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.3 μ l GeneScanTM-500 LIZ[©]Size Standard (Applied Biosystems). The samples were denatured at 95 °C for 5 min and cooled immediately on ice for 5 min before being loaded onto a 3130xl Genetic Analyzer. Capillary electrophoresis was performed using 36-cm capillaries filled with POP7-polymer (Applied Biosystems). The assays were run at 60 °C for 30 min, with a running voltage of 15 kV. Injection was performed at 15 kV for 23 s. Each TR locus was identified as a peak according to its colour and size (Table S2). Peaks were assigned a size with the GeneMapper[©] v4.0 software package (Applied Biosystems) using the settings for microsatellite analysis.

The amplicon sizes were converted into repeat numbers. The repeat numbers for two to four alleles (depending on the range of repeat numbers) from each locus were confirmed by sequencing. The sequence analysis results were also used to check for patterns in the flanking sequences and internal repeat variations (i.e., copy homology). The calculated number of repeats, referred to as alleles, were combined into a string and ordered according to the position of the loci in the CMR15 genome. The allele strings were reported as MLVA profiles. Each unique MLVA profile was given a haplotype designation, called an MLVA type (MT), using the GenAIEx v6.5 software package (Peakall & Smouse, 2012). Each isolate tested was assigned an MT. Isolates that differed by one or more alleles were considered distinct types. The MLVA profiles were used for comparison and clustering.

MLST genotyping

Seven gene loci (*gdhA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, *gyrB*, and *egl*) were chosen from a previous MLSA scheme (Wicker et al., 2012). These genes were the most discriminative markers, and less recombination was observed within the phylotype III lineage. MLST was performed for isolates in collection C65. These genes were partially amplified using sets of primers described previously (Wicker et al., 2012); the *gyrB* primers were redesigned to address amplification failures with some isolates. Descriptions of the loci and the corresponding oligonucleotide primer sets are presented in Table S3. Amplification was performed in 50- μ l reaction volumes consisting of 10 μ l 5 \times Colorless GoTaq Flexi Buffer (Promega), 3 μ l MgCl₂ solution (25 mM), 1 μ l dNTP mix (10 mM each), 1.25 μ l of a primer pair mix (10 μ M each), 0.25 μ l of GoTaq[©] G2 Flexi DNA Polymerase (5 μ . μ l⁻¹), 31.25 μ l sterile HPLC-grade water, and 2 μ l of fresh bacterial suspensions used as a template.

The optimized amplification protocol was as follows: an initial denaturation at 96 °C for 9 min; 30 cycles of denaturation at 95 °C for 1 min, an appropriate annealing temperature (Table S3) for 90 s, and elongation at 72 °C for 90 s; and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified PCR products were separated on 1.5% agarose gel to visualize the amplification quality. Samples of sufficient quality were sent to Beckman Coulter Genomics for DNA double-strand sequencing (forward and reverse). The primers used for PCR were also used for sequencing. The raw sequence data were edited using the Geneious v7.1.7 software package. The consensus sequences for each sequenced gene were determined by assembling forward and reverse chromatograms. The sequences corresponding to primer pairs and ambiguous 5' and 3' sequences were discarded from the analysis; this was performed to avoid sequence bias and to ensure correct sequence analysis. The consensus sequences were then aligned using Muscle in Geneious v7.1.7. At each locus, each unique sequence was considered an allele. Each strain was assigned an MLST profile containing seven allele numbers. Each unique MLST profile was given an MLST type (ST) designation. The MLST profiles were used for comparison and clustering.

A total of 98 MLST loci sequences used in this study were retrieved from GenBank; 357 newly generated sequences were deposited in GenBank under the accession numbers [KU255860](#) through [KU256216](#). The accessions numbers of sequences are listed in Table S4.

Data analysis

All analyses were performed with R v 3.0.2 software package ([R Core Team, 2013](#)), except where other software is indicated. The typeability (T) of each marker locus was defined as the amplification success rate. The level of polymorphism was evaluated for each locus per population (P17, P20, and P35) and for the collection C65 combination using the GenAlEx v6.5 software package by computing the number of alleles per locus (Na), the percentage of polymorphic markers, the allelic range (AR), and *Nei*'s marker of diversity index (*HE*). The allelic richness (A) estimates the genetic diversity in a population; it was calculated per locus and population using the *allelic.richness* function in the ‘hierfstat’ package ([Goudet, 2014](#)). This calculation uses rarefaction to measure the number of alleles per locus in a random subsample of uniform size ($n = 17$) drawn from the population.

The resolution of the set of TR loci was evaluated by computing the number of unique haplotypes observed for all possible combinations of k loci ($k = 1 - 16$). A haplotype accumulation curve (HAC) for increasing numbers of loci was generated for each population tested. Reaching a plateau indicated that the locus set tested was sufficient to identify all unique haplotypes ([Arnaud-Haond et al., 2005](#)).

MLVA typing performance was compared to MLST. The discriminatory power of typing systems was evaluated by calculating the Hunter Gaston Discrimination Index (HGDI) ([Hunter & Gaston, 1988](#)) using the Discriminatory Power Calculator tool available at http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/ ([Hunter & Gaston, 1988; Hunter, 1990](#)). This index measures the probability that two randomly sampled strains from a population will have different haplotypes. Congruence between MLVA and MLST methods was calculated using the adjusted Rand coefficient (aR) and the adjusted Wallace coefficient (aW) and jackknife pseudo-values 95% confidence interval (CI) with the Comparing



Partitions tool at <http://darwin.phyloviz.net/ComparingPartitionsv2/index.php?link=Tool>. aR indicates the agreement between the two typing methods. aW indicates the agreement between partitions and gives the probability that for a given data set, a pair of strains grouped in the same type under a method is also grouped as identical under another method (Severiano *et al.*, 2011). The strength of correlation between distance matrices was confirmed using the Mantel test (Mantel, 1967); similarities were determined using the *cdm.post* function (Legendre & Lapointe, 2004) provided by the ‘‘ape’’ package. Statistical significance was assessed using 10,000 permutations of a single matrix.

Finally, the ability of MLST and MLVA genotyping to link or differentiate strains was assessed. MLVA and MLST minimum spanning trees (MSTs) for collection C65 were analysed. MSTs were built using the goeBURST full MST algorithm, which is based on the Euclidean and goeBURST distances between two profiles; this was implemented in the PHYLOViZ v1.0 software package (Francisco *et al.*, 2012). Clonal complexes (CCs) were defined as groups of genetically related haplotypes and linked by a single locus variant (i.e., that vary at a single locus - SLV).

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the TR markers from the RS3-MLVA11 scheme

Among the 11 TR loci previously described for phylotype III strains (N'Guessan *et al.*, 2013), seven TR loci originally described from non-phylotype III strains were examined for their presence and structure in the genome of the reference phylotype III strain CMR15. TandemRepeatsFinder did not identify any TRs in the CMR15 regions matching RS2AL03 (Fig. S1A) and RS2BL23 (Fig. S1B). The repeat and flanking regions from RS1L09 and RS3L18 were highly homologous, suggesting that N'Guessan *et al.* (2013) used two loci designed from a phylotype I and phylotype III strain, respectively, but corresponding to the same single locus. In addition, they consisted of two consecutive and distinct TR arrays with respective tandem repeat units of 9 and 18 bp, respectively (Fig. S1C). The inclusion in an MLVA scheme of tandem-repeat arrays composed of two or more completely different tandem repeat motifs should be avoided for a purpose where the evolution mode of the markers should be deciphered. Moreover, such a dual source of polymorphism would strongly increase the risk of homoplasy. For example, a difference of two 9-bp repeats is evolutionarily dissimilar from a single-repeat variation of an 18-bp motif, which will likely have a different evolution rate. RS4L26 was not selected, as we confirmed in previous data from N'Guessan *et al.* (2013) suggesting that no amplicon could be produced from a majority of strains in C65. Despite multiple attempts, we failed to design optimized primers for RS4L26 to meet our selection requirements. The RS3L20 locus was partitioned into complex sub-sequences of TR motifs with only 51% mean identity (Fig. S2). Finally, new primer sets were developed for RS1L12 to address the amplification failure reported in the original study (N'Guessan *et al.*, 2013) (Table S2). We observed that homologous TR loci originating from different phylotypes did not always have the same internal structure.

In this study, we retained the following five TR loci from RS3-MLVA11: RS3L17, RS3L19, RS1L05, RS1L10, and RS1L12. These five TR loci fulfilled our selection criteria and were successfully amplified from collection C65 (100% typeability) (Table 1).

Table 1 Measures of genetic variability using TR and MLST loci. Typeability (T), allelic range (AR), observed allele number (Na), allelic richness (A), Nei's unbiased diversity index (H_E). Typeability = 100%. All strains were typed at all loci. Hunter-Gaston Diversity Index (HGDI): power of discrimination for the molecular typing methods.

VNTR loci	AR	Collection												MLST loci	AR	Collection													
		P35			P20			P17			P65					P35			P20			P17			P65				
		Na	A	H_E	Na	A	H_E	Na	A	H_E	Na	A	H_E			Na	A	H_E	Na	A	H_E	Na	A	H_E	Na	A	H_E		
RS3L27 ^a	2 – 11,13,37	10	8.23	0.89	5	4.97	0.77	1	1	0.00	12	7.03	0.84	gdhA	1 – 17	17	10.87	0.93	4	3.58	0.36	1	1	0.00	17	7.93	0.84		
RS3L28 ^a	2 – 5	4	3.30	0.39	2	2.00	0.34	2	2	0.12	4	2.97	0.54	gyrB	1 – 16	14	9.02	0.89	7	6.25	0.73	1	1	0.00	16	7.89	0.85		
RS3L29 ^b	2 – 3	2	2.00	0.44	2	1.98	0.19	1	1	0.00	2	2.00	0.51	rplB	1 – 18	18	11.59	0.94	4	3.68	0.36	1	1	0.00	18	8.15	0.84		
RS3L17 ^a	3, 7 – 15, 18 – 20	12	9.26	0.91	6	6.67	0.84	1	1	0.00	13	8.17	0.81	leuS	1 – 16	15	10.18	0.92	4	3.68	0.36	1	1	0.00	16	7.76	0.83		
RS3L19 ^b	3 – 10,15	8	6.38	0.78	5	4.55	0.60	1	1	0.00	9	5.82	0.64	adk	1 – 15	14	10.15	0.93	5	4.69	0.69	1	1	0.00	15	8.30	0.85		
RS3L30 ^b	3 – 4, 8 – 9, 12 – 13, 19, 25 – 27, 30, 34, 40	12	8.21	0.86	3	3.00	0.64	3	3	0.32	13	7.08	0.79	mutS	1 – 22	20	12.22	0.95	6	5.53	0.74	1	1	0.00	22	9.48	0.88		
RS3L31 ^a	2, 6	2	1.74	0.11	2	1.98	0.19	1	1	0.00	2	2.00	0.42	egl	1 – 20	19	11.55	0.94	5	4.53	0.44	1	1	0.00	20	8.32	0.85		
RS3L32 ^a	2 – 3	2	2.00	0.39	2	2.00	0.34	1	1	0.00	2	2.00	0.50																
RS3L33 ^a	6, 8 – 9, 12 – 13, 15 – 16, 18 – 20, 22, 26 – 27, 35	14	9.33	0.89	7	6.38	0.73	1	1	0.00	14	6.65	0.69																
RS3L34 ^b	4, 6 – 10	6	5.05	0.62	3	3.00	0.67	1	1	0.00	6	4.37	0.68																
RS1L05 ^b	2 – 3	2	1.94	0.21	1	1.00	0.00	1	1	0.00	2	1.71	0.12																
RS3L35 ^b	2,4 – 7,9	4	2.85	0.26	3	2.70	0.19	1	1	0.00	6	2.65	0.02																
RS3L36 ^b	2 – 8, 10 – 11	9	7.86	0.90	4	3.85	0.65	1	1	0.00	9	6.36	0.78																
RS1L10 ^b	3 – 5,8 – 9	5	4.41	0.72	1	1.00	0.00	1	1	0.00	5	3.75	0.48																
RS3L37 ^a	4 – 8,10,12 – 14, 16 – 17, 32, 36, 38	12	8.89	0.90	8	7.38	0.85	1	1	0.00	14	8.09	0.87																
RS1L12 ^a	2,9 – 18,22	9	7.64	0.88	8	7.37	0.81	1	1	0.00	11	7.46	0.81																
Number of isolates		35			20			17			65			Number of isolates		35			20			17			65				
Polymorphic loci (%)		100			87.50			12.50			100			Polymorphic loci (%)		100			100			0			100				
Mean A		5.57			3.73			1.19			4.88			Mean A		10.80			4.58			1.00			8.26				
Mean H_E		0.63			0.47			0.03			0.61			Mean H_E		0.93			0.53			0.00			0.85				
HGDI		0.99			1.00			0.42			0.95			HGDI		0.98			0.91			0.00			0.91				
Haplotypes		32			20			4			48			Haplotypes		26			11			1			32				
Singletons		29			18			0			39			Singletons		22			3			0			22				

Notes.

^a Loci located within intergenic regions.

^b Loci located within coding regions.

Identification of new TR markers

Additional TR loci were required to improve the resolution of MLVA typing. Because size homoplasy (i.e., alleles with distinct origins and the same state or length) is inherent to the TR loci, the use of a large number of TR loci could decrease the effect on genetic structure and population genetics indices ([Estoup, Jarne & Cornuet, 2002](#); [Reyes, Chan & Tanaka, 2012](#)). Eighteen new TR loci were selected by screening the genome sequence of the phylotype III strain CMR15. Among these, 11 loci were successfully amplified from all isolates in collection C65 and exhibited size polymorphism ([Table S2](#)).

Sixteen candidate markers for the new MLVA scheme

In total, 16 loci (five from RS3-MLVA11 and 11 newly identified) were selected as candidate markers for the new MLVA scheme ([Table S2](#)). A total of 41 DNA sequences for the alleles from the 16 TR loci were examined. It was confirmed that the differences in length of the different alleles were associated with differences in repeat unit copy numbers and not with indels in the flanking regions, either within or between the TR patterns. Local sequence alignment of the upstream and downstream flanking sequences of the 16 loci contained a few single-nucleotide polymorphisms. Furthermore, the majority of TR patterns among loci (80%) consisted of imperfect repeats. An example of a locus sequence analysis is provided in [Fig. S3](#) for illustration. Nucleotide polymorphisms within the TR array could be used to complement a length polymorphism analysis (i.e., molecularly accessible size homoplasy) ([Estoup, Jarne & Cornuet, 2002](#)) to confirm the molecular evolution of the strains under study ([Amosin et al., 2004](#); [Ablordegé et al., 2005](#); [Pradhan et al., 2011](#)).

The newly developed MLVA scheme for phylotype III strains is hereafter referred to as RS3-MLVA16. This scheme consists of 16 TR loci regularly scattered throughout the chromosome (RS3L27-RS3L28-RS3L29-RS3L17-RS3L19-RS3L30-RS3L31-RS3L32) and on the megaplasmid (RS3L33-RS3L34-RS1L05-RS3L35-RS3L36-RS1L10-RS3L37-RS1L12) of the phylotype III strain CMR15 ([Table S2](#)). Seven loci were microsatellites (ranging from 5 to 6 bp), and nine loci were minisatellites (ranging from 7 to 18 bp). All of the retained TRs were mapped either inside coding sequences or in intergenic regions. Full descriptions of the TR loci and the corresponding oligonucleotide primers used in this study are provided in [Table S2](#).

The same MLVA scheme can be used for addressing different questions. The required precision level of a genotyping technique is typically objective dependent. The analysis of a few isolates during an outbreak investigation would require a much lower refinement in the markers' characteristics than a more complex population genetics analysis for which the evolution mode of the markers would need to be accurately determined. The original design of an MLVA scheme should allow the accomplishment of various objectives and consequently a thorough selection of markers should be implemented. Ideally, a single typing technique answering every investigator's needs is desirable because it could bring together communities that have different, non-overlapping objectives. In this study, we provide an MLVA scheme optimized for practicality and containing a sufficiently high number of markers for maintaining homoplasy at a reasonable level, while eliminating

markers for which future users could not appropriately evaluate their evolution mode and mutation rate.

Discriminatory power of the newly developed RS3-MLVA16 scheme

At a global scale (P35; Africa and islands of the Southwest Indian Ocean), all loci were polymorphic with high indexes of diversity (H_E ranging from 0.11 to 0.91; mean H_E : 0.63 and mean A: 5.57). RS3-MLVA16 showed high discrimination between isolates from different countries (HGDI: 0.99). The set of 16 loci discriminated 32 haplotypes with 29 singletons by Minimum Spanning Tree (Table 1), indicating that P35 was a diverse population and that the majority of haplotypes are epidemiologically unrelated between countries; however some haplotypes from Reunion were SLV in MLVA-CC1 (MT7, MT9, MT48) (Fig. 1A). The singletons were haplotypes for which no SLV could be identified in the population. Seven loci (RS3L17, RS3L37, RS3L36, RS3L27, RS3L33, RS3L12, and RS3L30) were identified as the most polymorphic; these loci had H_E values greater than 0.80 (Table 1). The large proportions of singletons and multiple alleles per locus highlighted the broad diversity among unrelated RSSC phylotype III isolates originating from different countries in Africa and the Southwest Indian Ocean (P35).

At a regional scale (P20; 3 AEZs in Cameroon), geographically related isolates were discriminated well using the 16 loci (H_E ranging from 0.00 to 0.85; mean H_E : 0.47 and mean A: 3.73). Every isolate had a unique haplotype; of these, 18 were singletons (HGDI: 1) (Table 1). Within the country, six loci (RS3L37, RS3L30, RS3L12, RS3L27, RS3L17, and RS3L36) exhibited high polymorphism (H_E values ranging from 0.67 to 0.85), as was found at the global scale. Two loci (RS1L10 and RS1L05) were monomorphic (Table 1). These loci might be common between RSSC phylotype III strains from Cameroon; variations were observed among the broader population of African RSSC phylotype III strains (P35) and in the study performed by *N'Guessan et al. (2013)*. Two haplotypes (MT26 and MT27) were epidemiologically related (MLVA-CC2) in AEZ4, whereas the other haplotypes were greater than SLVs between and within AEZs (Fig. 1A).

At a local scale (P17, one field in Cameroon), most RS3-MLVA16 loci were monomorphic ($n = 14$) among isolates (Table 1). The 16 loci suggested that genetic diversity was very narrow (H_E ranging from 0.00 to 0.32; mean H_E = 0.03 and mean A: 1.19). However, these loci clearly resolved 4 haplotypes (MT4, MT5, MT6, and MT47) without any singleton (HGDI: 0.42), suggesting the existence of outbreak-evolved strains that formed a complex clonal (MLVA-CC3) within P17 (Table 1 and Fig. 1A). MT5, MT6, and MT47 were variants of MT4.

The level of polymorphism of each locus and the discriminatory ability of RS3-MLVA16 differed at the three scales considered. The numbers of alleles, in descending order, were higher in populations P35, P20, and P17. This finding is consistent with the geographic origin of the strain members of each population. No differences in the levels of polymorphism were observed between loci from coding regions and those from intergenic regions; the variability could be associated with the evolutionary rate at each locus.

Altogether, the 65 isolates (C65) were resolved in 48 haplotypes by RS3-MLVA16, and these haplotypes contained 39 singletons and 3 clonal complexes (MLVA-CC1, MLVA-CC2

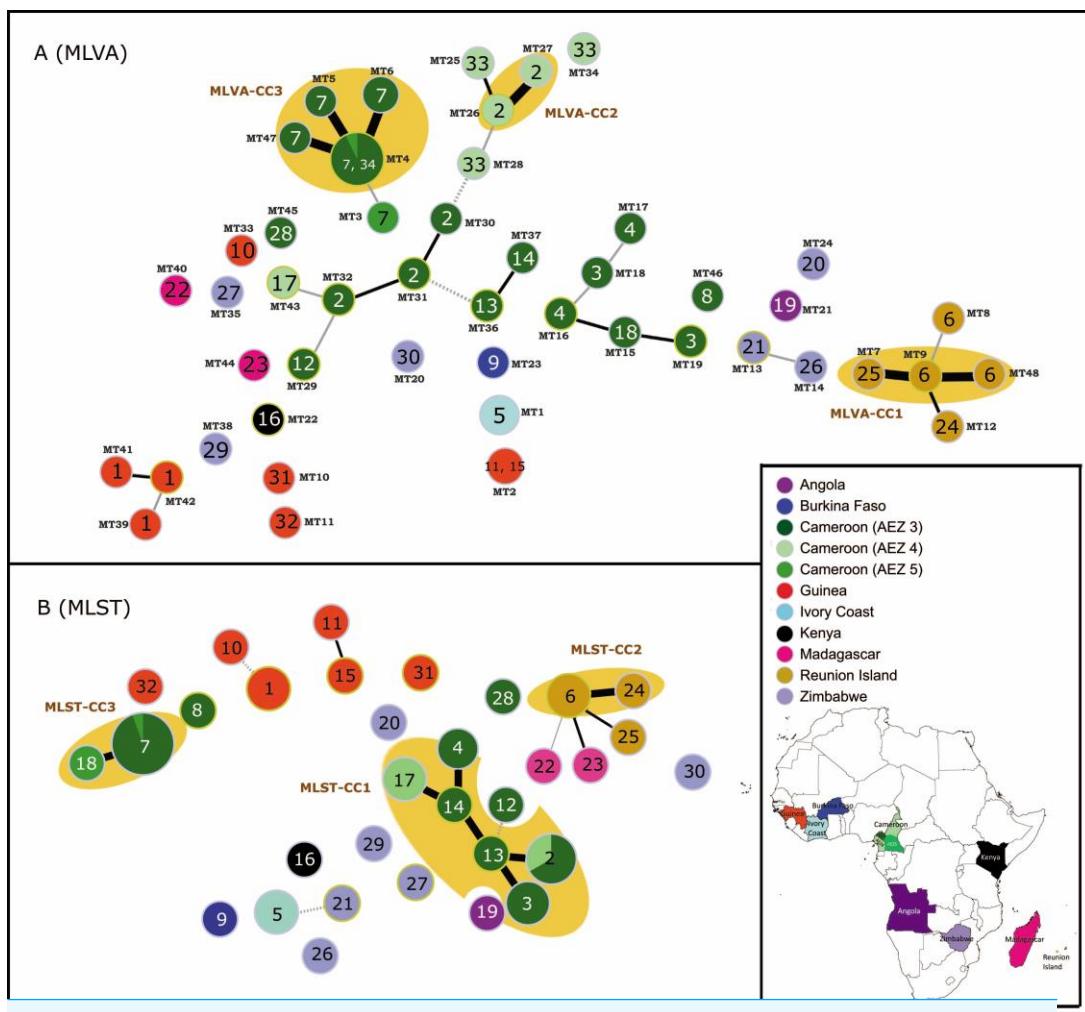


Figure 1 MSTs of *Ralstonia solanacearum* species complex strains of phylotype III (65 strains). (A)

Data from the RS3-MLVA16 data. The dot diameter represents the number of strains per haplotype. (B) Data from the MLST analysis based on seven gene regions (*gdhA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, *gyrB*, and *egl*). The dot colours indicate the country of isolation. The labels in the dots indicate the MLST sequence type numbers. The labels outside the dots indicate the MLVA type (MT) numbers. Black thick lines, black regular lines, grey thin lines, and grey dashed lines joining haplotypes indicate single-, double-, triple-, and quadruple-locus variations, respectively. No link is indicative of variations at >4 loci. Orange halos denote a clonal complex (CC).

and MLVA-CC3) that each consisted of epidemiologically related strains (Fig. 1A). The discriminatory index (HDI) of RS3-MLVA16 was 0.95. Strains from AEZ5 and the single field (Mfou) from Cameroon shared the same haplotype MT4, suggesting the introduction of MT4 from AEZ5 into the Mfou field. Haplotypes differed by 5 to 10 loci between countries and were SLV to 4 locus variants (LVs) within a country.

The resulting HACs of the locus combinations reached a plateau in all of the populations tested (Fig. S4). This result suggested that the 16 TR loci provided a good estimate of unique haplotypes and were sufficiently powerful to discriminate among RSSC phylotype III strains at both regional and local scales. A simplified MLVA typing scheme could be identified for routine epidemiological investigations and surveillance when RSSC phylotype III diversity

is well known. The HAC indicates the minimum number of loci necessary to accurately resolve genetic differentiation in a given population. Based on the HACs, 4 loci generated 32 haplotypes for global population P35, 4 loci resolved 20 haplotypes for regional population P20, and 2 loci resolved 4 haplotypes for population P17. When all of the strains used in this study were considered (C65), 48 haplotypes were resolved using only 7 TRs (Table S5 and Fig. S4). We observed that the number of loci and the composition of the locus set depend on the population studied. This approach may be used by under-resourced laboratories. However, reducing the number of TR loci used for genotyping results in limitations due to the constraints of size homoplasy. As such, extreme caution should be taken when reducing the locus number; reductions can result in the loss of information concerning the true genetic relatedness of haplotypes. To overcome this problem, we recommend the use of 16 loci for genotyping strains from RSSC phylotype III.

MLST data

All MLST gene fragments were successfully amplified for the 65 isolates used in this study.

At a global scale (P35), high polymorphism was revealed for each of the 7 loci (H_E ranging from 0.89 to 0.95; mean H_E : 0.93; and mean A: 10.80; Table 1). The MLST analysis identified 26 haplotypes, including 22 singletons (HDGI: 0.98) (Table 1 and Fig. 1B). ST6 and ST24 from Reunion and ST17 and ST2 from Cameroon were grouped, respectively, into CC, suggesting genetically close haplotypes for each CC.

At a regional scale (P20), all loci were polymorphic (H_E ranging from 0.36 to 0.74; mean H_E : 0.53; and mean A: 4.58). The 20 isolates were resolved into 11 haplotypes with 3 singletons and 2 CCs containing ST18 and ST7 from AEZ4 and AEZ5; ST2, ST3, ST4, ST13, ST14 and ST17 from AEZ3 and AEZ4; (HDGI: 0.91) (Table 1), respectively.

At a local scale (P17), all seven loci were monomorphic.

Altogether, the 65 isolates (C65) were resolved in 32 haplotypes with MLST, including 22 singletons. The discriminatory index HDGI was 0.91. Based on the MLST data (Fig. 1B), the genetic relatedness of the RSSC phylotype III strains generally reflected their geographical origin or structure; some haplotypes from Cameroon (ST28, ST7, ST18 and ST8) and Zimbabwe (ST20 and ST30) were exceptions. Three clonal complexes (MLST-CC1, MLST-CC2, and MLST-CC3) were identified; each complex was composed of strains with a single geographic origin (Cameroon and Reunion, respectively) (Fig. 1B). Grouped haplotypes in MLST-CC1 (ST2, ST3, ST4, ST13, ST14, and ST17) from geographically close Cameroon localities (AEZ3 and AEZ4) were closely related, sharing alleles at 6 of the 7 loci (or SLV); the data are shown in Fig. 1B. ST2 was a common haplotype for strains originating from AEZ3 and AEZ4 in Cameroon; the five remaining haplotypes may originate from this haplotype. MLST-CC2 was an SLV between the Reunion haplotypes ST6 and ST24. MLST-CC3 was composed of ST7 and ST18, which varied at a single locus. Single-field strains from Mfou (AEZ3) and strains from AEZ5 shared the haplotype ST7 (Fig. 1B). This result suggests that the Mfou (AEZ3) and AEZ5 strains were similar and had a common origin. Mfou (AEZ3) strains might have been recently introduced to the surveyed field by clonal expansion or polyclonal introduction. MLST-CC3 was distantly related to ST8 and ST28 from Cameroon and MLST-CC1. The MLST markers are relatively neutral

housekeeping genes that evolved slowly instead of under diversifying selective pressures (the locus *egl* is an exception). This may explain the phylogenetic relationships among related Cameroon strains and among Reunion strains. Each MLST-CC is most likely derived from a common ancestor. This complex most likely spread with clonal expansion, and a new variant arose from the source ST and propagated new clonal STs. Typically, haplotypes from Guinea and Zimbabwe were distantly related and differed by four to six loci within their respective countries (ST11 and S15 from Guinea were exceptions that differed at two loci (DLV) (Fig. 1B); however, ST30 from Zimbabwe was 6 LVs from Reunion. Connections by 6 LVs were observed between strains originating from Cameroon (ST13) and Zimbabwe (ST27)/Angola (ST19)/Madagascar (ST22). Haplotypes from Zimbabwe (ST21) and Kenya (ST16) differed by 6 loci, and haplotypes from Ivory Coast (ST5) and Burkina Faso (ST9) also differed by 6 loci. ST5 from the Ivory Coast was 4 LVs from Zimbabwe (ST21) (Fig. 1B). Higher LV numbers suggest that strains are very diverse, distant from each other, and epidemiologically unrelated within a country and between countries. Haplotypes from Madagascar and Reunion Island were closely related genetically, with distances of 2 to 3 LVs. This close genetic relationship was already observed in previous studies involving the partial sequencing of *egl* genes (Poussier *et al.*, 2000a), AFLP analysis (Poussier *et al.*, 2000b), and MLSA analysis (Castillo & Greenberg, 2007; Wicker *et al.*, 2012).

Complementary input of MLST and RS3-MLVA16 schemes to assess the phylogeny and molecular epidemiology of RSSC phylotype III strains from Africa

The MLVA profiles for the 48 haplotypes generated by RS3-MLVA16 and the MLST profiles of the 32 haplotypes resolved by MLST are listed in Table S1 in the supplemental information. The two typing methods reported a high level of haplotype diversity at the global scale (P35) and the regional scale (P20). However, no diversity was found with MLST at the local scale (P17), whereas RS3-MLVA16 resolved the clonal strains in P17 into 4 haplotypes (Table 1). Although allelic richness and the diversity index generated by MLST were greater, except for P17, compared to those obtained by RS3-MLVA16, resulting in highly polymorphic MLST loci, RS3-MLVA16 had better resolving capacity than MLST according to the high discriminatory ability indices HGDI, number of haplotypes, and singletons observed in all populations surveyed (Table 1). Considering all isolates used in this study (C65), MST analyses (Fig. 1) showed that RS3-MLVA16 could subtype 7 haplotypes unresolved by MLST (ST1, ST2, ST3, ST4, ST6, ST7, and ST17) into MLVA haplotypes (MTs) (Fig. 1A). ST1 was subtyped into MT39, MT41, and MT42 (Guinea); ST2 was subtyped into MT16, MT27, MT31, MT32 and MT43 (Cameroon); ST3 was subtyped into MT15, MT18 and MT19 (Cameroon); ST4 was subtyped into MT16 and MT17 (Cameroon); ST6 was subtyped into MT8, MT9, and MT48 (Reunion); ST7 was subtyped into MT3, MT4, MT5, MT6, and MT47 (Cameroon); and ST17 was subtyped into MT25, MT28, and MT34 (Cameroon). Because TR loci are considered to be rapidly evolving markers, the pattern of locus variation between MTs for each ST clone (which was greater than DLV except for MT4, MT5, MT6, and MT47 on the one hand and MT26 and MT17 on the other hand) reflected their rapid short-term evolution. The SLVs between MT

haplotypes in ST7 suggest recent clonal expansion in the Mfou field (AEZ3, Cameroon) and epidemiologically related strains; the source could be MT4. MT3 (ST7) represented in AEZ4 (Cameroon) was 3 LVs from MT4. ST2, which was shared between AEZ3 and AEZ4, and ST6 from Reunion also exhibited recent clonal expansion. MLST-CC1, found in Cameroon, was also differentiated into MTs by RS3-MLVA16 (Fig. 1A); the variation in the MTs was greater than in the DLVs (except MT26 and MT27, which were SLV). Although the Cameroon haplotypes had a close genetic relationship, the strains were clearly unrelated epidemiologically (except for MT16 and MT27). The structure revealed by the MST generated from RS3-MLVA data emphasized high loci variation, which resulted in genetic diversity within the AEZs in Cameroon.

The congruence between the two techniques was different depending on the population analysed. At the global scale (P35), RS3-MLVA16 and MLST were slightly congruent. The aR coefficient was estimated at 0.35 (95% CI, 0.00 – 1.00), and the genetic distance matrices between the two methods were 0.15 (Mantel's correlation coefficient, p -value = 0.05). Coherence occurs primarily at the level of clonal clusters found in Reunion, Cameroon (AEZ4), and Ivory Coast. However, RS3-MLVA16 showed higher differentiation of the worldwide strains than MLST; RS3-MLVA16 predicted the STs in 74.4% (95% CI, 0.49 – 1.00), whereas MLST had a lower prediction of partition by RS3-MLVA16 (aW: 22.6%; 95% CI, 0.00 – 0.46). At the regional scale (P20), the genetic distances between the two methods were highly correlated (Mantel's correlation coefficient: 0.77, p -value < 0.001), but they showed different partitions (aR was 0.00). RS3-MLVA16 was more discriminative and had high prediction of STs (aW: 1.00; 95% CI, 1.00 – 1.00). At the local scale (P17), RS3-MLVA16 and MLST were not similar, resulting in higher resolution of closely related strains by RS3-MLVA16 (ST7 subtyped into MT4, MT5, MT6 and MT47). Combining the 65 isolates (C65), the congruence between RS3-MLVA16 and MLST was high (Mantel's correlation coefficient: 0.56, p -value < 0.001; aR was 0.56; 95% CI, 0.32 – 0.84). The MT to predict ST was 0.84 (95% CI, 0.60 – 1.00), and the ST to predict MTs was 0.50 (95% CI, 0.18 – 0.66). Although the correlation between RS3-MLVA16 and MLST was high, differences in the distributions of various haplotypes were observed. MLST structure was not fully maintained in the MST of RS3-MLVA16. Haplotypes from Zimbabwe and Guinea were scattered somewhat by the presence of haplotypes from Cameroon. RS3-MLVA16 confirmed that these haplotypes were epidemiologically unrelated. The Cameroon haplotypes were 5 – 6 LVs from the Zimbabwean haplotypes. The Guinean haplotypes were 8 – 10 LVs from strains from other countries (Zimbabwe/Kenya/Cameroon/Ivory Coast; Fig. 1A). The haplotype from Burkina Faso (MT23) was 8 LVs from the Cameroon (MT36) and Ivory Coast (MT1) haplotypes, as determined by RS3-MLVA16. The close genetic relationship between Reunion and Malagasy haplotypes observed by MLST data were not consistent with RS3-MLVA16 (Fig. 1B) and the findings of previous studies (Poussier *et al.*, 2000a; Poussier *et al.*, 2000b; Castillo & Greenberg, 2007; Wicker *et al.*, 2012). This incoherence can result from the difference of evolutionary histories between TR markers and MLST markers. Furthermore, MLST resolved MTs; identical MTs showed different STs: MT2 showed 2 STs (ST11 and ST15), and MT4 combined ST7 and ST18. In such a situation, we cannot exclude the homoplasy effect on some TR loci. A previous study highlighted

the inconsistency of trees built from DNA sequences and TR loci due to homoplasy that can arise through convergent/reverse evolution or horizontal gene transfer (Comas *et al.*, 2009). The results underline the high capacity of RS3-MLVA16 for strain identification at global, regional, and local scales. RS3-MLVA16 also underlines genetic variability within the same ST and CC and gives a first overview of population structure.

The ability of a genotyping method to differentiate one RSSC phylotype III strain from another and to delineate their relatedness enables us to unravel the evolutionary pattern and biology of RSSC phylotype III strains from Africa. Assaying genetic variation is critical for understanding the emergence and spread of the RSSC phylotype III across Africa and the Indian Ocean. However, MLST/MLSA has long been considered the gold standard in genotyping for many bacterial pathogens to delineate long-term historical genetic relatedness and to resolve long-standing epidemiological questions, resulting in unambiguous results with nucleotide sequence data (Maiden *et al.*, 1998; Maiden, 2006). However, MLVA typing was successfully applied to investigate the population structure, mostly in short-term and fine-scale epidemiological outbreak investigations and notably in various economically significant monomorphic plant bacterial pathogens. The species analysed include *Xanthomonas citri*, the causative agent of Asiatic citrus canker (Provost *et al.*, 2014); *Clavibacter michiganensis*, the causative agent of bacterial wilt and canker in tomato (Zaluga *et al.*, 2013); *Candidatus liberibacter*, the causative agent of the most destructive citrus disease worldwide (Katoh *et al.*, 2011); and *Erwinia amylovora*, the causative agent of a major disease of pome fruit trees (Bühlmann *et al.*, 2014).

In this study, RS3-MLVA16 clearly discerned closely and epidemiologically related strains in field-scale and small-scale analyses, whereas MLST was unable to discriminate sufficiently. RS3-MLVA16, which was based on TR loci, was more capable of recognizing the rapid evolution of strains and was able to describe greater genetic diversity. RS3-MLVA16 provided insight into the regional and local epidemiology of RSSC strains from phylotype III. In this way, RS3-MLVA16 can be used for short-term epidemiology investigations involving local disease outbreaks and routine surveillance. It was observed that the data generated by RS3-MLVA16 complemented the information obtained from MLST. For molecular epidemiology studies, RS3-MLVA16 could be used for the identification of the origin(s) of an inoculum; analysis can also provide insight into the manner in which strains are established in weed reservoirs, the pattern of spread for successful clonal lines, the scale of distribution, and other epidemiological traits associated with the fitness of strains and the extent of disease.

Highly portable, RS3-MLVA16 can be a first-line assay for routine screening at low cost. We are currently using RS3-MLVA16 to investigate these molecular epidemiology traits in bacterial wilt disease caused by RSSC phylotype III strains in Madagascar.

Genotyping data are useful for surveillance networks and outbreak investigations of infectious diseases. Currently, there is not a database for RSSC. The MLST and MLVA databases for RSSC phylotype III recovered from the global, regional, and local populations should be used as a starting point for generating such a database.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jean-Jacques Cheron, Karine Boyer, and Stephanie Javegny for their professional advice and expert technical assistance. We thank Christian Vernière and Virginie Ravigné for their valuable help and discussions.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

The European Union (ERDF), Conseil Régional de La Réunion secured the doctoral fellowship awarded to SR (contract number DIRED 20121416), the French Agence Nationale de la Recherche and CIRAD provided financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:
European Union (ERDF), Conseil Régional de La Réunion: DIRED 20121416.
French Agence Nationale de la Recherche.
CIRAD.

Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

Author Contributions

- Santatra Ravelomanantsoa conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, prepared figures and/or tables, performed the computation work.
- Isabelle Robène analyzed the data, reviewed drafts of the paper.
- Frédéric Chiroleu reviewed drafts of the paper, performed the computation work.
- Fabien Guérin and Stéphane Poussier reviewed drafts of the paper.
- Olivier Pruvost analyzed the data, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.
- Philippe Prior conceived and designed the experiments, analyzed the data, wrote the paper, reviewed drafts of the paper.

DNA Deposition

The following information was supplied regarding the deposition of DNA sequences:
GenBank: [KU255860](#) - [KU256216](#).

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:
Raw data can be found in the [Supplemental Information](#).



Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.1949#supplemental-information>.

REFERENCES

- Ablorodey A, Swings J, Hubans C, Chemlal K, Locht C, Portaels F, Supply P. 2005.** Multilocus variable-number tandem repeat typing of mycobacterium ulcerans. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:1546 – 1551
DOI [10.1128/JCM.43.4.1546-1551.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1546-1551.2005).
- Achtman M. 2008.** Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology* **62**:53 – 70
DOI [10.1146/annurev.micro.62.081307.162832](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162832).
- Alm EW, Oerther DB, Larsen N, Stahl DA, Raskin L. 1996.** The oligonucleotide probe database. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:3557 – 3559.
- Amonsin A, Li LL, Zhang Q, Bannantine JP, Motiwala AS, Sreevatsan S, Kapur V. 2004.** Multilocus short sequence repeat sequencing approach for differentiating among mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:1694 – 1702 DOI [10.1128/JCM.42.4.1694-1702.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1694-1702.2004).
- Arnaud-Haond S, Alberto F, Teixeira S, Procaccini G, Serrao EA, Duarte CM. 2005.** Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *Journal of Heredity* **96**:434 – 440 DOI [10.1093/jhered/esi043](https://doi.org/10.1093/jhered/esi043).
- Benson G. 1999.** Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **27**:573 – 580 DOI [10.1093/nar/27.2.573](https://doi.org/10.1093/nar/27.2.573).
- Bühlmann A, Dreö T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits THM, Ravnikar M, Frey JE, Duffy B. 2014.** Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology* **16**:2112 – 2125 DOI [10.1111/1462-2920.12289](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12289).
- Castillo JA, Greenberg JT. 2007.** Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:1225 – 1238 DOI [10.1128/AEM.01253-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01253-06).
- Coloma J, Harris E. 2009.** Molecular genomic approaches to infectious diseases in resource-limited settings. *PLoS Medicine* **6**:e1000142
DOI [10.1371/journal.pmed.1000142](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000142).
- Comas I, Homolka S, Niemann S, Gagneux S. 2009.** Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in mycobacterium tuberculosis highlights the limitations of current methodologies. *PLoS One* **4**:e7815
DOI [10.1371/journal.pone.0007815](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007815).
- Coupat B, Chaumeille-Dole F, Fall S, Prior P, Simonet P, Nesme X, Bertolla F. 2008.** Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology* **66**:14 – 24
DOI [10.1111/j.1574-6941.2008.00552.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00552.x).

- Elphinstone JG, Hennessy J, Wilson JK, Stead DE. 1996.** Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* **26**:663 – 678 DOI [10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x).
- Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M. 2002.** Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**:1591 – 1604 DOI [10.1046/j.1365-294X.2002.01576.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01576.x).
- Fegan M, Prior P. 2005.** How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Allen C, Prior P, Hayward AC, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St. Paul: American Phytopathological Society, 449 – 461.
- Fox RTV, Narra HP. 2006.** Plant disease diagnosis. In: Cooke BM, Jones DG, Kaye B, eds. *The epidemiology of plant diseases*. Dordrecht: Springer, 1 – 42.
- Francisco A, Vaz C, Monteiro P, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carrico J. 2012.** PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* **13**:87 DOI [10.1186/1471-2105-13-87](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-87).
- Gillings M, Fahy P. 1993.** Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. *Plant Pathology* **42**:744 – 753 DOI [10.1111/j.1365-3059.1993.tb01561.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1993.tb01561.x).
- Goudet J. 2014.** hierfstat: estimation and tests of hierarchical F-statistics. Available at <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html> (accessed 20 September 2015).
- Harrington SM, Francis JS, Bishai WR, Carroll KC. 2014.** Molecular epidemiology and infectious diseases. In: Nelson KE, M WC, eds. *Infectious disease epidemiology theory and practice*. Third. Sudbury: Jones & Bartlett Learning, 219 – 245.
- Hayward AC. 1964.** Characteristics of *pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* **27**:265 – 277 DOI [10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x).
- Hunter PR. 1990.** Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1903 – 1905.
- Hunter PR, Gaston MA. 1988.** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson’s index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:2465 – 2466.
- Jeffreys AJ. 1987.** Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochemical Society Transactions* **15**:309 – 317 DOI [10.1042/bst0150309](https://doi.org/10.1042/bst0150309).
- Kashi Y, King DG. 2006.** Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics* **22**:253 – 259 DOI [10.1016/j.tig.2006.03.005](https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.005).
- Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, Okuda M, Su H-J, Iwanami T. 2011.** Differentiation of ‘‘Candidatus Liberibacter asiaticus’’ isolates by variable-number tandem-repeat analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **77**:1910 – 1917 DOI [10.1128/aem.01571-10](https://doi.org/10.1128/aem.01571-10).
- Kelman A. 1954.** The relationship of pathogenicity in *pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* **44**:693 – 695.

- Le Fleche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck JL, Vergnaud G. 2002.** High resolution, on-line identification of strains from the mycobacterium tuberculosis complex based on tandem repeat typing. *BMC Microbiology* **2**:37 DOI [10.1186/1471-2180-2-37](https://doi.org/10.1186/1471-2180-2-37).
- Legendre P, Lapointe F-J. 2004.** Assessing congruence among distance matrices: single-malt scotch whiskies revisited. *Australian & New Zealand Journal of Statistics* **46**:615 – 629 DOI [10.1111/j.1467-842X.2004.00357.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-842X.2004.00357.x).
- Lindstedt B-A. 2005.** Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* **26**:2567 – 2582 DOI [10.1002/elps.200500096](https://doi.org/10.1002/elps.200500096).
- Lindstedt BA, Torpdahl M, Vergnaud G, Le Hello S, Weill FX, Tietze E, Malorny B, Prendergast DM, Ni Ghallchoir E, Lista RF, Schouls LM, Soderlund R, Borjesson S, Akerstrom S. 2013.** Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Eurosurveillance* **18**:20385.
- Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, Prior P. 2009.** Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Disease* **93**:1123 – 1130 DOI [10.1094/PDIS-93-11-1123](https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1123).
- Maiden MC. 2006.** Multilocus sequence typing of bacteria. *Annual Review of Microbiology* **60**:561 – 588 DOI [10.1146/annurev.micro.59.030804.121325](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121325).
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. 1998.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3140 – 3145 DOI [10.1073/pnas.95.6.3140](https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140).
- Mantel N. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* **27**:209 – 220.
- Michael AP. 2001.** Molecular approaches to diagnosing and managing infectious diseases: practicality and costs. *Emerging Infectious Disease journal* **7**:312 DOI [10.3201/eid0702.700312](https://doi.org/10.3201/eid0702.700312).
- N'Guessan CA, Brisse S, Le Roux-Nio A-C, Poussier S, Koné D, Wicker E. 2013.** Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods* **92**:366 – 374 DOI [10.1016/j.mimet.2013.01.012](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.01.012).
- Parkinson N, Bryant R, Bew J, Conyers C, Stones R, Alcock M, Elphinstone J. 2013.** Application of variable-number tandem-repeat typing to discriminate *Ralstonia solanacearum* strains associated with English watercourses and disease outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:6016 – 6022 DOI [10.1128/AEM.01219-13](https://doi.org/10.1128/AEM.01219-13).
- Peakall R, Smouse PE. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**:2537 – 2539 DOI [10.1093/bioinformatics/bts460](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460).
- Pourcel C, Vergnaud G. 2011.** *Strain typing using Multiple “Variable Number of Tandem Repeat” Analysis and genetic element CRISPR*. Washington, D.C.: Molecular Microbiology ASM Press, 179 – 197.

- Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward C, Fegan M. 2000a.** Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Systematic and Applied Microbiology* **23**:479 – 486 DOI [10.1016/S0723-2020\(00\)80021-1](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(00)80021-1).
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A. 2000b.** Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* **146**:1679 – 1692 DOI [10.1099/00221287-146-7-1679](https://doi.org/10.1099/00221287-146-7-1679).
- Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J. 1999.** Genetic diversity of african and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:2184 – 2194.
- Pradhan AK, Mitchell RM, Kramer AJ, Zurakowski MJ, Fyock TL, Whitlock RH, Smith JM, Hovingh E, Van Kessel JAS, Karns JS, Schukken YH. 2011.** Molecular epidemiology of mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in a longitudinal study of three dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:893 – 901 DOI [10.1128/JCM.01107-10](https://doi.org/10.1128/JCM.01107-10).
- Prior P, Allen C, Elphinstone JG. 1998.** *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Berlin: Springer.
- Prior P, Fegan M. 2005.** Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. In: Momol MT, Ji P, Jones JB, eds. *1st international symposium on tomato diseases*. Leuven: International Society for Horticultural Science (ISHS), 127 – 136.
- Pruvost O, Magne M, Boyer K, Leduc A, Tourterel C, Drevet C, Ravigné V, Gagnevin L, Guérin F, Chiroleu F, Koebnik R, Verdier V, Vernière C. 2014.** A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. *PLoS ONE* **9**:e98129 DOI [10.1371/journal.pone.0098129](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098129).
- R Core Team. 2013.** *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: the R Foundation for Statistical Computing. Available at <http://www.R-project.org/> (accessed 15 July 2015).
- Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A, Salvignol G, Mornico D, Mangenot S, Barbe V, Medigue C, Prior P. 2010.** Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**:379 DOI [10.1186/1471-2164-11-379](https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-379).
- Reyes JF, Chan CHS, Tanaka MM. 2012.** Impact of homoplasy on variable numbers of tandem repeats and spoligotypes in mycobacterium tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution* **12**:811 – 818 DOI [10.1016/j.meegid.2011.05.018](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.018).
- Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carrico JA. 2011.** Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *Journal of Clinical Microbiology* **49**:3997 – 4000 DOI [10.1128/JCM.00624-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00624-11).

- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012.** Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**:e115 DOI [10.1093/nar/gks596](https://doi.org/10.1093/nar/gks596).
- VanBelkum A, Scherer S, VanAlphen L, Verbrugh H. 1998.** Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:275 – 293.
- Vergnaud G, Pourcel C. 2009.** Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. In: Caugant AD, ed. *Molecular epidemiology of microorganisms: methods and protocols*. Totowa: Humana Press, 141 – 158.
- Vinatzer BA, Bull CT. 2009.** The impact of genomic approaches on our understanding of diversity and taxonomy of plant pathogenic bacteria. In: Jackson RW, ed. *Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 37.
- Weber JL. 1990.** Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**:524 – 530 DOI [10.1016/0888-7543\(90\)90195-Z](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90195-Z).
- Wicker E, Lefevre P, De Cambiaire J-C, Lemaire C, Poussier S, Prior P. 2012.** Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *The ISME Journal* **6**:961 – 974 DOI [10.1038/ismej.2011.160](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.160).
- Zaluga J, Stragier P, Van Vaerenbergh J, Maes M, De Vos P. 2013.** Multilocus variable-number-tandem-repeats analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiology* **13**:1 – 15 DOI [10.1186/1471-2180-13-126](https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-126).

RESULTATS ET DISCUSSION

Cinq loci TR du schéma RS3-MLVA11 (N'Guessan *et al.* 2013) : RS3L17, RS3L19, RS1L05, RS1L10 et RS1L12 ont été retenu, satisfaisant nos critères de sélection. Ces cinq loci ont été amplifiés chez les 65 souches testées (typabilité = 100 %).

Pour compléter le schéma, nous avons sélectionné 11 nouveau loci TR identifiés sur le génome de la souche de référence CMR15. Ces loci ont satisfait nos critères de sélection et ont bien été amplifiés chez les 65 souches testées (typabilité = 100 %).

Un schéma nommé 'RS3-MLVA16' composé de 16 loci TR (RS3L27, RS3L28, RS3L29, RS3L17, RS3L19, RS3L30, RS3L31, RS3L32, RS3L33, RS3L34, RS1L05, RS3L35, RS3L36, RS1L10, RS3L37, RS1L12) a été ainsi mis au point et testé pour génotyper une collection mondiale de souches du ceRs (P65, n = 65) subdivisée en :

- une collection de souches distantes géographiquement (P35, n = 35) distribuées dans divers pays d'Afrique et des zones de l'Océan Indien : Angola, Burkina Faso, Cameroun, Guinée, Kenya, Zimbabwe, la Réunion et Madagascar (échelle globale) ;
- une collection de souches épidémiologiquement liées (P20, n = 20) isolées de 3 zones agroécologiques du Cameroun (AEZ 3, AZE 4, AEZ 5 ; échelle régionale) ;
- une collection de souches isolées d'une même localité (P17, n = 17 ; échelle locale).

Les loci sont polymorphes pour les quatre collections (P35, P20, P17 et P65). Le schéma RS3-MLVA16 a généré 32 haplotypes chez la collection P35, 18 haplotypes chez la collection P20, et 4 haplotypes chez la collection P17. Chez la collection P65, le schéma RS3-MLVA16 a identifié 48 haplotypes avec un pouvoir de discrimination de 0.95. Le schéma RS3-MLVA16 a été comparé avec un schéma MLST qui est composé de 7 loci. Le schéma MLST a identifié 26 haplotypes chez la collection P35, 11 haplotypes chez la collection P20 et un haplotype unique chez la collection P17. Chez la collection P65, le schéma MLST a identifié en tout 32 haplotypes avec un pouvoir de discrimination de 0.91. Nous pouvons constater que le schéma RS3-MLVA16 est plus discriminant que le schéma MLST.

La congruence entre les données RS3-MLVA16 et MLST est de 0.35 ($p = 0.05$) à l'échelle globale (P35), le coefficient de corrélation de Mantel est de 0.77 ($p < 0.001$) à l'échelle régionale (P20), et les deux données sont différents à l'échelle locale car le schéma MLST n'a identifié qu'un seul haplotype tandis que le schéma RS3-MLVA16 a discriminé en 4 haplotypes. Pour l'ensemble de la collection, les données sont congruentes à 56 % ($p < 0.001$). On constate que la congruence entre les données RS3-MLVA16 et MLST varient suivant la collection voire l'échelle d'étude. L'incohérence entre les données pourrait être liée par le fait que les loci MLST et les loci TR ont une histoire évolutive différente. Cependant, on ne peut pas exclure l'effet de l'homoplasie sur les loci TR dans le cas où un MLVA-type est différencié par les loci MLST.

L'analyse du réseau des réseaux d'haplotypes construits à partir des données RS3-MLVA16 et MLST montre qu'au niveau de chaque pays les souches du phylotype III sont génétiquement éloignées et ne présentent pas de liens épidémiologiques. Ce qui suggèrera que les souches du phylotype III sont endémiques à chaque pays d'origine. Le schéma RS3-MLVA16 a discriminé les souches du ceRs qui étaient comprises dans un complexe clonal à l'échelle régionale (P20) par l'approche MLST et a différencié les souches du ceRs à l'échelle locale (P17). A l'échelle régionale (P20), le schéma RS3-MLVA16 montre que les souches dans la collection P20 ne sont pas liées épidémiologiquement bien qu'elles sont issues d'un ancêtre commun comme révélé par le schéma MLST. A l'échelle locale, le schéma RS3-MLVA16 montre un haplotype central (MT4) qui pourrait être considéré comme l'haplotype fondateur d'où divergent 3 haplotypes variants (MT47, MT5, MT6) qui diffèrent de l'haplotype commun (MT4) d'un locus. Cette capacité de discrimination fine trouve son avantage dans le cadre d'une étude épidémiologique pour tracer les sources d'inoculum.

Ainsi à la lumière de ces résultats, nous avons pu démontrer que le schéma RS3-MLVA16 est approprié pour des études épidémiologiques à l'échelle régionale et locale tandis que le schéma MLST est plutôt dédié pour des études d'épidémiologie long terme. Toutefois, les données RS3-MLVA16 et MLST sont complémentaires.

CONCLUSION PARTIELLE

Outre le développement d'un outil adapté à notre problématique de recherche sur la caractérisation des souches Malgaches de phylotype III, notre objectif global était aussi de fournir à la communauté scientifique mondiale un schéma de génotypage MLVA optimisé pour les souches du ceRs phylotype III. Cela doit permettre de traiter différentes questions relatives à la diversité génétique des souches mondiales de phylotype III pour mieux connaître la biologie et la nature des épidémies provoquées.

Ce travail a démontré que le schéma RS3-MLVA16 que nous proposons était suffisamment robuste pour différencier clairement les souches du ceRs phylotype III géographiquement distantes et montrer les liens épidémiologiques entre les souches. Les différences observées en nombre de locus variant (> 3 LVs pour le génotypage RS3-MLVA16) entre les souches qui sont groupées en MLST dans un complexe clonal (cas des souches du complexe MLST-CC1) démontrent une évolution rapide des loci VNTR. Le degré de résolution que possède le schéma RS3-MLVA16 est très intéressant quant à son application pour des investigations épidémiologiques à court terme, tant à l'échelle locale qu'à une échelle plus fine. En outre, la structuration géographique observée par la méthode MLST (considérée comme méthode de génotypage générant des résultats non ambigus basés sur l'analyse de séquences nucléotidiques obtenues par séquençage) est également observée par la méthode RS3-MLVA16. Ce nouveau schéma RS3-MLVA16 va maintenant être utilisé pour génotyper les souches du ceRs malgaches de phylotype III afin de répondre aux questions de recherche liées à la diversité génétique des souches et l'épidémiologie du flétrissement bactérien dans les bassins de productions des Hauts Plateaux malgaches. Egalement, RS3-MLVA16 est proposé pour le génotypage des souches du ceRs de l'écotype Africain qui est présent en Afrique et dans les îles de la zone SOOI.

CHAPITRE 2. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DU ceRs ET ÉPIDÉMIOLOGIE



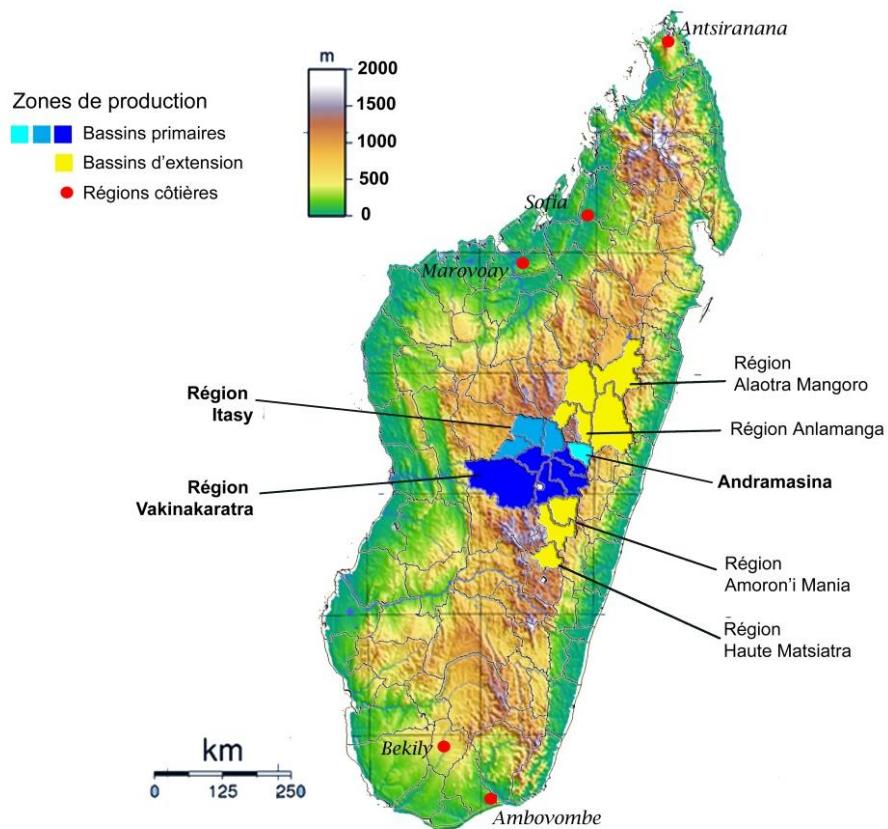


Figure 14 – Localisation des bassins et zones de production de pomme de terre à Madagascar.



Figure 15 – Zones agroécologiques destinées à la culture de pomme de terre à Madagascar. (A) Culture d'altitude sur ‘tanety’ . (B) Culture sur ‘baiboho’ . (C) Culture sur rizière. Crédits photos : G. Cellier.

INTRODUCTION

La pomme de terre est à la fois une culture vivrière offrant une diversification alimentaire intéressante à la population malgache, mais aussi un facteur économique important à Madagascar, garantissant notamment un revenu important pour les petits producteurs des zones rurales. Bien que la culture de la pomme de terre soit pratiquée dans les régions côtières (Antsiranana, Sofia, Marovoay, Bekily et Ambovombe), la production est concentrée dans la partie centrale des Hauts Plateaux, où on distingue trois principaux bassins de production primaires situés dans les régions Vakinankaratra, Analamanga (Andramasina) et Itasy, qui assurent environ 90 % de la production nationale ; et quelques bassins secondaires situés dans les régions d'Amoron'i Mania, Haute Matsiatra, Analamanga (Mahitsy, Manjakandriana) et Alaotra-Mangoro (**Figure 14**).

La pomme de terre est généralement cultivée en altitude, entre 1200 et 2000 m où la température est fraîche, l'humidité est suffisante et les types de sols sont favorables pour son développement. Le cycle moyen de culture est de 120 jours et la production peut être pratiquée en trois saisons au cours d'une année. Les cultures de la saison pluviale (Septembre à Janvier) et de la saison intermédiaire (Janvier à Mai) sont installées sur les 'tanety' (plateaux et collines où les sols sont principalement de type ferralitique) et les cultures d'irrigation de contre saison (Mai à Août pour les cultures précoces ; Juillet à Septembre pour les cultures tardives) sur les 'baiboho' (sols de décrue ou alluvionnaires), en rizières et plaines (**Figure 15**). La pomme de terre s'adapte à une large gamme de sols, à texture allant de sablo-limoneux, limono-argileux à sol argileux, souvent à des pH acides (6 à 6,5).

Le flétrissement bactérien figure parmi les principaux facteurs de pertes chez la pomme de terre avec le mildiou (*Phytophthora infestans*). Le flétrissement bactérien est historiquement observé sur les 'tanety', caractérisé par des infections persistantes de faible incidence dans les zones d'endémie. Les symptômes de flétrissement se manifestent généralement tardivement, de la tubérisation à la floraison (**Figure 16**). Récemment, une épidémie de flétrissement bactérien a provoqué des dégâts tels que la production nationale a été touchée dans l'ensemble des terroirs destinés à la production englobant les 'tanety', plaines et rizières. L'apparition des symptômes de flétrissement est atypique avec un développement très précoce lors de l'émergence complète des feuilles à la phase de développement végétatif (**Figure 17**). Cette épidémie dans les bassins de production est la plus forte menace à laquelle doit faire face la culture de pomme de terre depuis des décennies.

A ce jour la diversité génétique des souches du ceRs présentes à Madagascar est identifiée à partir d'une collection de souches réduite ($n = 29$) : phylotype III sequevar 19 (III-19) isolée sur pomme de terre ($n = 3$) et collectée en altitude (1672m) en 1997 et 2006, et phylotypes I-18 et I-46 isolées sur tomate, piment, aubergine et brède morelle collectées en plaine (12 à 1320 m) en 2006 (Prior *et al.* 2007, comm. pers.) ; et à la classification en race et biovar pour les souches de race 1 biovar 1 (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehevitra 1988 ; Rahetlah 2008 ; Randriamampianina 1997 ; Randrianangaly 2003) qui pourraient être du phylotype II mais non caractérisées à ce jour.

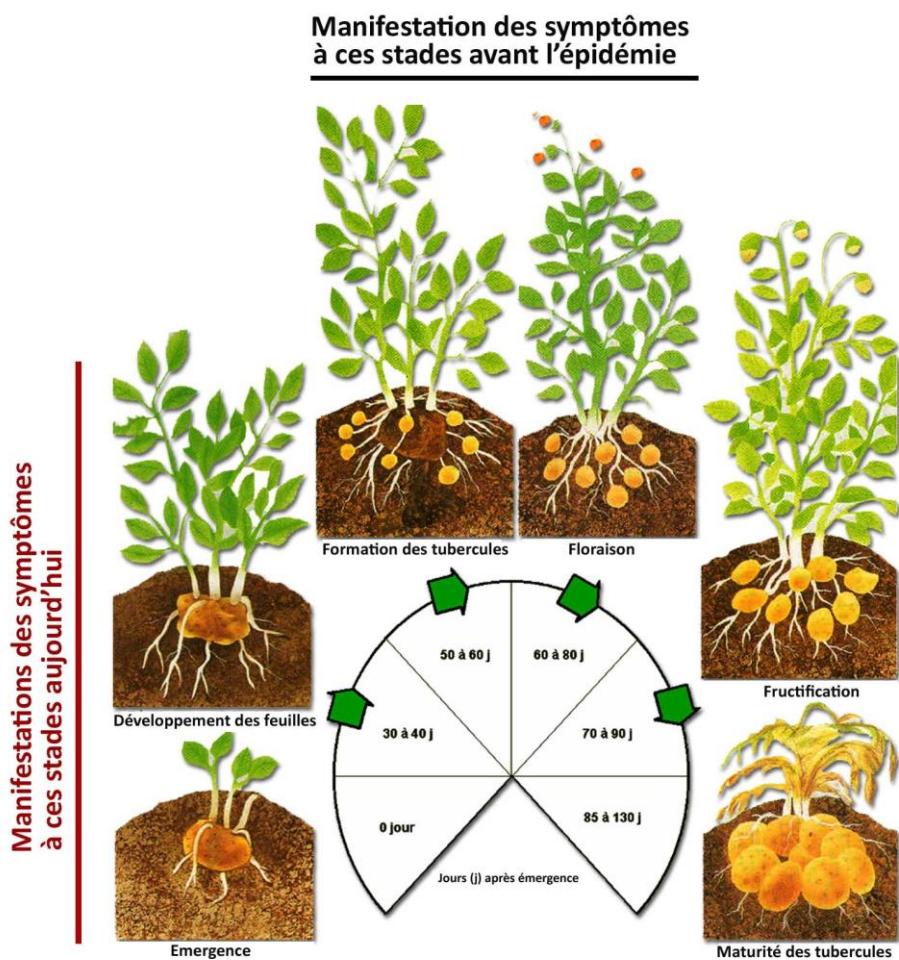


Figure 16 – Stades de développement de la pomme de terre et des symptômes de flétrissement bactérien. Crédit illustration : S. Kotchi.



Figure 17 – Symptômes de flétrissement apparaissant précocement, au début de développement des feuilles. Crédit photo : S. Arribat.

Les populations prévalentes dans les bassins de production et celles capables d'infecter les cultures de pomme de terre sont donc méconnues et se situent au cœur de la problématique de l'épidémie du flétrissement bactérien dans les Hauts Plateaux malgaches. Comme la pomme de terre est sensible au flétrissement bactérien causé par des souches tombant dans pas moins de huit groupes génétiques phylogénétiquement distants localisés dans chacun des quatre phylotypes (Cellier & Prior 2010), il est important de connaître la biologie des populations pathogènes liée à l'évolution de(s) l'épidémie(s). Des réponses doivent être apportées sur la composition des populations du ceRs dans les bassins de production de pomme de terre. Les caractéristiques de l'épidémie laissent à penser à une évolution des populations de souches du ceRs présentes dans les Hauts Plateaux et à l'émergence de souches hautement agressives sur pomme de terre. Leur aptitude à coloniser des milieux agroécologiques différents et l'existence de souches infectant la même espèce d'hôte avec des caractères phénotypiques différents pourraient rendre compte d'une importante diversité génétique des souches du ceRs ; ce qui a probablement rendu difficile le contrôle de la maladie par l'utilisation des variétés résistantes.

La réponse à ces questions doit être recherchée en explorant et en caractérisant les différences génétiques au sein des souches du ceRs (intraspécifique, intra et inter-populations) à partir d'un large échantillonnage prospecté dans les principales zones de production des Hauts Plateaux malgaches au travers d'approches multi-marqueurs par génotypage MLST/MLSA et MLVA.

MATERIELS ET METHODES

CONSTITUTION DE LA COLLECTION DE SOUCHES DU CERS

La première étape clé de ce travail était l'acquisition des souches du ceRs rendant compte de la situation phytosanitaire prévalant dans les bassins de production de pomme de terre. Les prospections ont été réalisées avec la contribution des équipes scientifiques et techniques du Cirad-3P (Saint-Pierre, La Réunion), de l'Anses²⁵ (Saint-Pierre, La Réunion), du FIFAMANOR (Antsirabe, Madagascar), des Centres de Services Agricoles des régions cibles (CSA du Ministère de l'Agriculture, Madagascar) et de l'association Fert²⁶-CEFFEL (Antsirabe, Madagascar).

Choix des sites de prospection

Pour atteindre nos objectifs, nous avons procédé à un échantillonnage par quotas pour les choix des sites de prospection. Un échantillonnage par quotas est de type non probabiliste, où les échantillons sont déterminés selon des critères. Les prospections de souches sont effectuées dans les bassins de production situés dans les régions : Vakinankaratra, Analamanga, Itasy, Amoron'i Mania et Haute Matsiatra. Dans ces régions les prospections sont orientées majoritairement vers les principales zones agroécologiques (ZAE) productrices de pomme de terre et dans des localités représentatives de chaque ZAE :

- Sur des parcelles historiquement reconnues pour présenter une infection régulière et persistante au flétrissement bactérien. Dans ce contexte, nous espérons isoler les souches responsables impliquées dans la situation endémique.
- Sur des parcelles en situation d'épidémie récente dans le but d'isoler les souches associées à l'émergence du flétrissement bactérien dans chaque ZAE.

La représentativité des échantillons s'est rapportée notamment à la diversité agroécologique pour une large couverture de l'agrosystème et des bassins de production (**Figure 14**) : régions géographiques (zones agricoles), milieux agroécologiques (plaines, bas-fond et collines ; **Figure 15**), nature du sol (acide à calcaire, texture argileuse à limoneuse) ; et à la diversité de l'hôte (espèce et cultivar de pomme de terre). Les coordonnées géographiques de chaque site sont prélevées à l'aide d'un GPS.

Prélèvement de matériels infectés/contaminés

Au plan de la parcelle, l'échantillonnage a été conduit par stratification où 20 échantillons de portions de tige (environ 10 cm de longueur prélevé à partir du collet, **Figure 18B**) provenant d'une plante symptomatique, sont prélevés au hasard et se voulant représentatifs de la population de plantes infectées. Une plante symptomatique est identifiée soit par la présence d'une épinastie foliaire ou flétrissement du plant (**Figure 18A**). Les prélèvements ont été faits de manière la plus exhaustive dans le but d'explorer la diversité des souches dans les localités d'échantillonnage. A cet effet, nous avons prélevé éventuellement des tubercules infectés (**Figure 18C**), des vitroplants et tubercules semences de pré-base produits par le centre FIFAMANOR, et des échantillons prélevés sur d'autres espèces symptomatiques ou hôte potentiel

²⁵ Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation

²⁶ Fert : Association française de coopération internationale pour le développement agricole des pays en développement et émergents.



Figure 18 – Matériels prélevés. (A) Plante flétrie (B) Portion de tige prélevée sur un plant flétrti. (C) Tubercule infectée. Crédits photos : (A) S. Ravelomanantsoa, (B, C) G. Cellier

asymptomatique, des eaux d'irrigation et de la rhizosphère. Chaque échantillon est géoréférencé (relevé de position GPS) et les informations suivantes assignées : date du prélèvement, nom de la localité, numéro de la parcelle, coordonnées géographiques (latitude, longitude, altitude), information sur l'hôte (espèce, variété, stade phénologique de l'ensemble de la population), lieu de culture (rizière, '*tanety*', '*baiboho*', bas-fond), et nature de l'échantillon prélevé (tige, tubercules, etc.).

Périodes d'échantillonnage

Les prospections ont été réalisées en trois périodes, réparties dans 12 ZAEs sur trois saisons de culture différentes et ont coïncidé avec la période de densité maximale d'apparition des symptômes de flétrissement bactérien sur les cultures :

- Prospection 1 (23 et 24 Octobre 2012) : une prospection préliminaire sur des cultures de contre saison installées sur rizière et terrains irriguées dans la ZAE d'Antsirabe (Manandona) et Manjakandriana ;
- Prospection 2 (04 au 13 Avril 2013) : une large prospection sur des cultures de saison intermédiaire installées sur '*tanety*', '*baiboho*' et terrain irrigué en terrasse dans 4 ZAEs de la Région Vakinankaratra : Antsirabe, Betafo, Faratsiho, Ambatolampy ;
- Prospection 3 (03 au 13 Décembre 2013) : une large prospection sur des cultures pluviales installées sur '*tanety*' dans 5 ZAEs : Arivonimamo, Miarinarivo, Soavinandriana, Haute Matsiatra (Ambohimahaso), Amoron'i Mania (Ambositra), Analamanga (Atsimondrano, Mahitsy).

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Au champ

Les échantillons ont été prélevés avec un sécateur décontaminés avec de l'alcool 90° avant chaque coupe, groupés par parcelle de culture, mis en sachet codé et conservés dans une glacière pour son acheminement au laboratoire (**Figures 19A, 19B**).

Isolement des souches

Nous avons mis en place un petit laboratoire mobile dans les locaux du FIFAMANOR (Antsirabe) pour les prospections 1 et 2 ; dans les locaux du Cirad (Antananarivo) pour la prospection 3 (**Figure 19**). Les manipulations se sont faites sur une paillasse dans des conditions aseptiques. Chaque échantillon (portion de tige ou tubercules) est lavé à l'eau du robinet, séché, décontaminé en surface avec de l'alcool 90° et ensuite flambé. L'exsudat bactérien est récupéré à partir des échantillons de tige, chacune immergée dans l'eau pure stérile. Pour les tubercules, une portion du tissu de l'anneau vasculaire est dilacérée dans l'eau pure stérilisé et laissée diffuser pendant quelques minutes. Les premiers isolements sont réalisés par la méthode d'ensemencement par épuisement de 5 µl de suspension en 3 secteurs sur milieu gélosé Kelman (Kelman 1954). Les boîtes sont ensuite incubées à température ambiante pendant au moins 48 h. L'identification visuelle des souches se fait par observation de la morphologie des colonies qui sont caractéristiques. Les colonies virulentes sont muqueuses, larges et de forme irrégulière, de couleur opaque (**Figure 20**). On procède à une purification des cultures dans le cas où des contaminants sont repérés sur la boîte. Quelques colonies issues d'une culture pure sont ensuite mises en suspension dans l'eau pure stérile contenue dans des tubes Eppendorf. Les tubes sont ensuite stockés dans une boîte à température ambiante et ramenées au laboratoire de microbiologie du Cirad-3P (Saint-Pierre, Réunion) pour une ultime vérification de la pureté de la souche.



Figure 19 – Traitement des échantillons et travaux de microbiologie de campagne. (A) Sachet codé contenant les échantillons de tiges prélevées sur une parcelle. (B) Conservation dans une glacière. (C) Laboratoire mobile installé au Fifamanor (Antsirabe). (D) Laboratoire mobile installé dans un hôtel (Ambatolampy). (E) Laboratoire mobile installé au siège du Cirad (Antananarivo). Crédits photos : (A, D, E) G. Cellier (E) S. Arribat (C) S. Ravelomanantsoa.



Figure 20 – Colonies virulentes typiques d'une souche du ceRs sur milieu Kelman. Crédits photos : S. Ravelomanantsoa.

Purification des isolats

Les suspensions préparées à Madagascar ont été remises en culture dans un bouillon nutritif pendant 2 jours à 28°C. La culture est ensuite ensemencée en 3 secteurs sur milieux SMSA (Elphinstone *et al.* 1996) et Kelman (Kelman 1954), incubée à 28°C et purifiée de nouveau pour s'assurer de leur pureté. Les colonies pures de chaque isolat sont suspendues dans un tube de cryobilles. Le surnageant est aspiré et le tube contenant les cryobilles (25 répliques de culture) est ensuite conservé pour une longue conservation à -80°C (cryoconservation).

COLLECTION DE SOUCHES

L'ensemble des souches collectées, leurs caractéristiques ainsi que leur utilisation dans cette étude sont présentés en **Annexe 1**. Compte tenu de l'effectif élevé, une collection de référence est assemblée. Elle est composée d'échantillons représentatifs de souches provenant de différentes localités et zones de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches et de souches de références représentatives de la diversité de souches du ceRs dans le monde (sélection selon la position phylogénétique, l'origine géographique, l'année d'isolement, et l'hôte). Les données génétiques des souches du ceRs malgaches sont comparées à celles des souches de référence qui proviennent de la collection RUN du Cirad-3P (Saint Pierre, La Réunion).

CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES EN COLLECTION

L'ADN matrice (non purifié) est utilisé en mettant en suspension 1 µl de culture pure et fraîche (prélevée avec une anse d'inoculation de 1 µl) dans 200 µl d'eau HPLC²⁷ stérile.

Diagnostique du complexe d'espèces *R. solanacearum* et phylotypage

Il s'agit de confirmer que les souches collectionnées appartiennent bien au ceRs tout en assignant à chaque souche un phylotype. Des amplifications de fragments d'ADN spécifiques au ceRs et aux quatre phylotypes (I, II, III, IV) sont réalisées par PCR multiplexe (Fegan & Prior 2005), avec les amores oligonucléotidiques 759/760 (marqueur interne au ceRs), N:mult21:1F (phylotype I), N:mult21:2F (phylotype II), N:mult23:AF (phylotype III), N:mult22:InF (phylotype IV), N:mult22:RR (**Tableau 5**). La réaction PCR est réalisée dans un volume de 15 µl contenant 3 µl de tampon de réaction colorée GoTaq Flexi 5X (Promega) ; 0,9 µl de solution MgCl₂ (25 mM) ; 0,3 µl de solution mélange dNTPs (10 mM chacun) ; 1,5 µl mix d'amores sens et antisens (10X) ; 0,125 µl de solution ADN polymérase Gotaq® G2 Flexi (5U/µl, Promega) ; 8,18 µl d'eau HPLC stérile ; et 1 µl de suspension bactérienne fraîche. Le mix d'amores sens et antisens 10X est composé de 759R, 760F à 4 pmol chacune ; N:mult21:1F, N:mult21:2F, N:mult22:InF, N:mult22:RR à 6 pmol chacune, et N:mult23:AF à 18 pmol. La réaction est placée dans un thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) soumise au programme suivant : une activation de la polymérase et dénaturation initiale et à 96°C pendant 5 min ; 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 s – hybridation à 59°C pendant 30 s – elongation à 72°C pendant 30 s ; et une elongation finale à 72°C pendant 10 min.

²⁷ Eau HPLC : eau ultrapure pour procédure analytique

Tableau 5 – Amorces spécifiques et produits PCR attendus pour l'identification de l'espèce, le phylotype et le sequevar I.

Sens	Couple d'amorces		3' Phylotype	Espèce /		Référence
	5'	3' Antisens		5'	3'	
760F	GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG	759R	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	ceRs	281	Opina <i>et al.</i> 1997
Nmult:21:1F	CGTTGATGAGGCAGCGCAATT			I	144	
Nmult:21:2F	AAGTTATGGACGGTGGAAAGTC		Nmult:22:RR	II	372	
Nmult:23:AF	ATTACCSAGAGCAATCGAAAGATT		TCGCTTGACCCCTATAACGAGTA	III	91	Fegan et Prior 2005
Nmult:22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAGAAGTA			IV	213	
630	ATACAGAATTGACCGGCACG	631	AATCACATGCAATTGCGCTACG	IIB-1	307	Fegan <i>et al.</i> 1998

Six microlitres du produit PCR sont ensuite chargés sur un gel d'agarose SeaKem LE Agarose (Lonza, Bâle, Suisse) de 1,5 % dans un tampon TAE 1X (Tris-acide acétique-EDTA) pour électrophorèse à 110V pendant 1 h. Après migration, le gel est révélé dans un bain de bromure d'éthidium et photographié sous UV avec l'appareil de système d'imagerie G:BOX (Syngene, Cambridge, Royaume-Uni). La taille des bandes est estimée par comparaison avec les bandes du marqueur de poids moléculaire (Ladder) de 100 pb (Promega, Madison, Wisconsin, USA). La bande à 281 pb indique l'appartenance au ceRs ; et les bandes à 144 pb, 372 pb, 91 pb, 213 pb indiquent leur appartenance respectivement aux phylotypes I, II, III, et IV (**Figure 21**).

Détection des souches 'Brown rot' (IIB-1)

Les souches IIB-1 sont des organismes nuisibles réglementés (EPPO 2015). La détection est réalisée par l'amplification d'ADN spécifique au groupe IIB-1 avec les couples d'amorces 630/631 (Fegan *et al.* 1998a). La réaction de PCR est réalisée dans un volume de 15 µl contenant 3 µl de tampon de réaction colorée GoTaq Flexi 5X (Promega) ; 0,9 µl de solution MgCl₂ (25 mM) ; 0,3 µl de solution mélange dNTPs (10 mM chacun) ; 0,36 µl de chaque amorce 630 et 631 (10µM chacun) ; 0,125 µl de solution ADN polymérase Gotaq® G2 Flexi (5U/µl, Promega) ; 8,96 µl d'eau HPLC stérile ; et 1 µl de suspension bactérienne fraîche. Le programme PCR est : 96°C – 6 min ; 30 cycles de 94°C – 15 s, 60°C – 30 s, 72°C – 30 s ; et 72°C – 10 min. Une bande à 307 pb indique la présence du groupe IIB-1.

Identification des sequevars

Chaque phylotype peut être subdivisé en sequevars fondés sur le polymorphisme de séquence partielle du gène endoglucanase ou *egl* (Fegan & Prior 2005). Le seuil de divergence nucléotidique pour définir un sequevar est défini à 1 % sur une totalité de taille de l'amplicon (de l'ordre de 700 pb). Pour chaque souche, le gène *egl* est amplifié par PCR en utilisant le couple d'amorces endoF/endoR (Fegan & Prior 2005) puis les produits PCR sont séquencés. Le protocole d'amplification PCR du gène *egl* est décrit dans la partie 'MLST genotyping' de l'article publié inséré dans le chapitre précédent (Ravelomanantsoa *et al.* 2016). Les séquences sont éditées dans le logiciel MEGA version 7.0.18 (Molecular Evolutionary Genome Analysis) (Kumar *et al.* 2016), corrigées manuellement ; alignées suivant l'algorithme MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar 2004) ; ensuite analysées phylogénétiquement et comparées aux séquences références connues afin de déterminer les sequevars auxquels les souches malgaches sont assignés.

Génotypage MLVA

Le génotypage par MLVA exploite la variation de nombre de séquences répétées en tandem qui survient au niveau des différents loci choisis comme marqueurs. Chaque souche typée est définie par son profil allélique, qui définit un MLVA-type ou MT numéroté de façon arbitraire. Le profil allélique est représenté par un code numérique de *k*-chiffres (*k* = nombre de locus), et dont chaque chiffre correspond au nombre de séquences répétées à chaque locus.

Pour une caractérisation fine des relations entre les souches du ceRs isolées dans chaque localité (site) des bassins de production de pomme de terre, nous avons utilisé le schéma récemment publié RS3-MLVA16 (RS3L27, RS3L28, RS3L29, RS3L17, RS3L19, RS3L30, RS3L31, RS3L32, RS3L33, RS3L34, RS1L05, RS3L35, RS3L36, RS1L10, RS3L37, RS1L12) (**Figure 22**) pour génotyper les souches de phylotype III (Ravelomanantsoa *et al.* 2016).

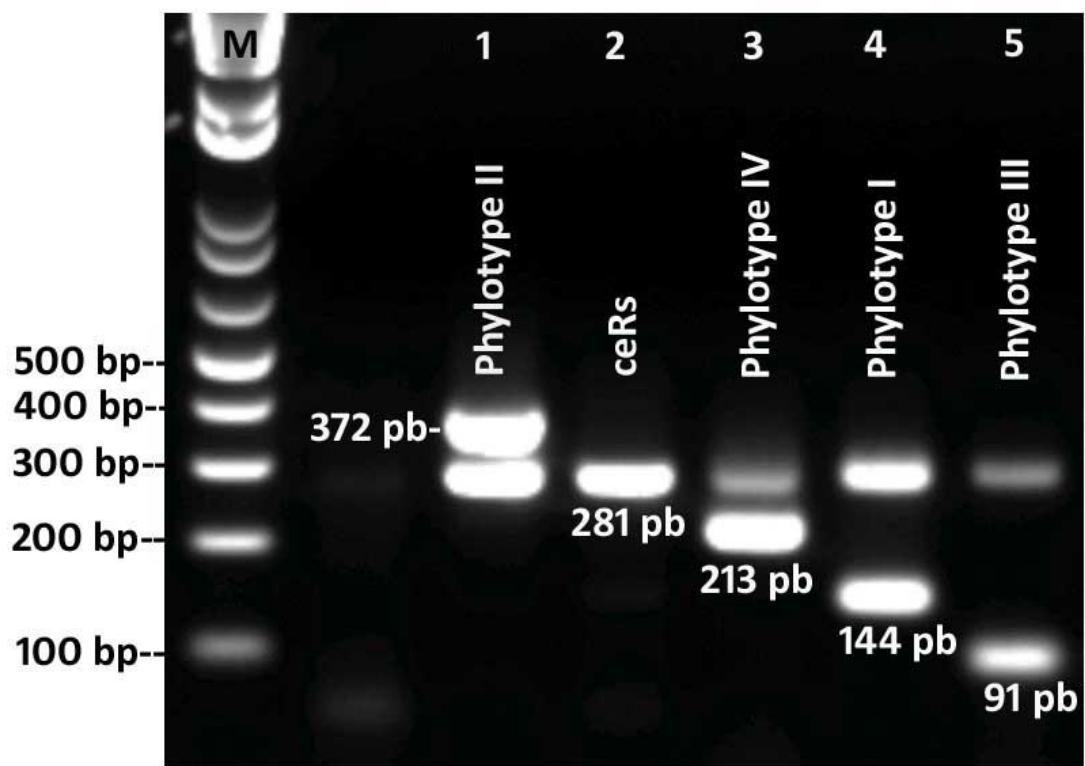


Figure 21 – Gel d'électrophorèse montrant les produits PCR : la bande à 281 pb indique l'appartenance au ceRs (piste 2), la bande à 91 pb au phylotype III (piste 5), 144 pb au phylotype I (piste 4), 213 pb au phylotype IV (piste 3), 372 pb au phylotype II (piste 1). La piste M est le marqueur de taille à 100 pb.

Pour caractériser les souches appartenant au groupe IIB-1, nous avons sélectionné 12 marqueurs VNTR hautement polymorphes (RS2AL01, RS2AL02, RS2AL03, RS2AL04, RS1L05, RS3L17, RS3L19, RS2BL21, RS2BL22, RS2BL23, RS2BL24, et RS2BL26) proposés par N'Guessan *et al.* (2013) et 5 marqueurs VNTR (L504, L539, L540, L563, L578) publiés par Parkinson *et al.* (2013).

Les souches malgaches de phylotype I ne feront pas l'objet de génotypage par MLVA.

Le procédé de génotypage par MLVA des souches de notre collection est décrit dans la partie 'MLVA genotyping' de l'article publié inséré dans le chapitre précédent. La liste des couples d'amorces utilisées pour amplifier chaque locus est présentée en **Annexe 2**.

Génotypage et séquençage multilocus (MLST/MLSA)

Le polymorphisme génétique des souches du ceRs isolées dans les bassins de production est ensuite abordé par génotypage et analyse multilocus (MLST/MLSA). Pour cela, 7 loci polymorphes bien repartis sur le génome et peu recombinants au sein des 4 phylotypes sont sélectionnés : *gdhA* (603 pb), *gyrB* (393 pb), *rplB* (654 pb), *leuS* (723 pb), *adk* (468pb), *mutS* (681 pb) et *egl* (708 pb) (*nota egl* présente des traces de recombinaison chez le phylotype I qui pourrait perturber le signal phylogénétique) (Wicker *et al.* 2012). Ces deux techniques sont fondées sur l'amplification par PCR suivie du séquençage des amplicons.

Le génotypage MLST repose sur l'analyse du polymorphisme allélique au sein de chaque locus. Chaque isolat est identifié par un profil allélique qui correspond à une série de sept numéros alléliques établit dans l'ordre suivant : *gdhA* – *gyrB* – *rplB* – *leuS* – *adk* – *mutS* – *egl* (selon la position par ordre croissant des loci sur le génome) (**Figure 22**). Un profil allélique définit un type particulier, appelé séquence type (ST). Pour chaque locus, chaque séquence obtenue des différentes souches malgaches est comparée à une base de données de profils alléliques générées dans mon précédent travail pour se voir attribuer un numéro allélique, et d'en déduire le profil allélique. Un nouveau numéro allélique est attribué pour chaque nouvel allèle identifié et pour chaque nouveau profil est attribué, de façon arbitraire, un nouveau numéro ST.

L'analyse MLSA se base sur l'analyse de séquences concaténées des sept loci (i.e. les séquences sont assemblées tête-bêche) Le procédé pour l'amplification PCR et séquençage des gènes est décrit dans la partie 'MLST genotyping' de l'article publié inséré dans le chapitre précédent (Ravelomanantsoa *et al.* 2016). Les loci et les couples d'amorces utilisés pour amplifier chaque locus sont décrits en **Annexe 3**. Pour les souches de référence, les séquences des marqueurs sont récupérées de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Les numéros d'accession sont listés en **Annexe 4**. Les séquences sont éditées dans le logiciel MEGA v.7.0.18 corrigées manuellement ; alignées suivant l'algorithme MUSCLE ; ensuite analysées phylogénétiquement.

ENQUETE EPIDEMIOLOGIQUE

Des enquêtes ponctuelles, par site d'échantillonnage, sont réalisées conjointement avec les prélèvements, auprès des paysans agriculteurs propriétaires des parcelles d'échantillonnage, des CSA, des techniciens du FERT, et de FIFAMANOR par le biais de ses agents de terrain localisés dans chaque ZAE de la région Vakinankaratra (**Figure 23**). A cet effet un questionnaire (**Annexe 5**) a été établi. L'enquête est

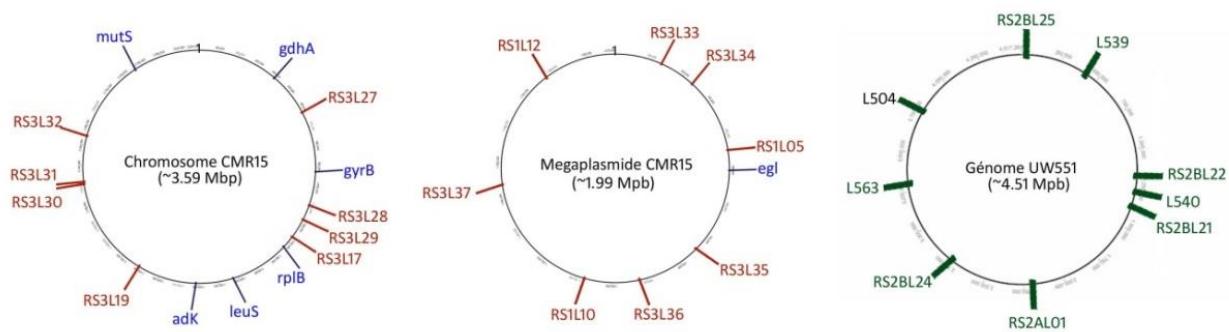


Figure 22 – Localisation des marqueurs MLSA (en bleu), RS3-MLVA16 (en rouge) et RS2-MLVA9 (en vert) sur le génome des souches de phylotype III (CMR15) et IIB-1 (UW551).



Figure 23 – Conduite d'enquête épidémiologique.

réalisée en discutant avec les paysans et en posant des questions ouvertes axées principalement sur l'historique du flétrissement bactérien au niveau de la parcelle et de la localité, l'origine et les échanges de tubercules semences, les itinéraires et pratiques culturelles. Elle est complétée par des renseignements sur le site/parcelle d'échantillonnage, l'hôte, par des observations sur l'état sanitaire de la parcelle. La liste de questions posées est exhaustive selon la situation phytosanitaire au niveau des sites. Les données sont confrontées avec les résultats d'analyse génétique pour mieux comprendre la maladie et les épidémies.

ANALYSE DES DONNEES

La répartition des sites de prospection ainsi que la distribution des lignées phylogénétiques (phylogenotypes) identifiées dans les différents ZAEs sont représentées sur une carte géoréférencée en utilisant le logiciel de système d'information géographique QGIS v2.0.1-Dufour (QGIS Development Team 2013).

Analyse phylogénétique

La reconstruction phylogénétique est réalisée avec des séquences nucléotidiques individuelles et des séquences concaténées de 7 loci, pour représenter les relations génétiques et évolutives entre les séquence-types de souches du ceRs étudiées. Les arbres phylogénétiques sont construits, parallèlement, par la méthode Neighbor-Joining (BioNJ) et la méthode de maximum de vraisemblance (ML).

L'estimation du modèle d'évolution le mieux adapté à chaque jeu de données de séquences nucléotidiques est calculée avec le logiciel jModelTest version 2.1.9 (Posada 2008) et la fonction 'Models | Find Best DNA/Protein Models (ML)' intégrée dans MEGA v.7.0.18. Le modèle qui présente une valeur de BIC²⁸ (Bayesian information criterion) la plus faible (Brewer *et al.* 2016) est sélectionné.

La robustesse des branches internes à soutenir un nœud qui regroupe les séquences présentant des caractères génétiques similaires est testée par une analyse de bootstrap (Efron *et al.* 1996), effectuée en 1000 réplicats avec MEGA v.7.0.18. Un arbre consensus est ensuite généré et présente les regroupements qui sont majoritairement apparus. La valeur de bootstrap, exprimée en %, indique le nombre de fois où la branche (ou le regroupement) est observée dans tous les arbres relativement au nombre de tirage effectués. La longueur des branches est proportionnelle au nombre de substitutions par site. Pour l'arbre construit par la méthode ML, les premiers arbres de recherche heuristique sont obtenus en appliquant les algorithmes BioNJ à une matrice de distances par paires estimées en utilisant l'approche de vraisemblance composite maximale (MCL).

La congruence entre les arbres phylogénétiques (topologie et phylogénie) issus de portions de gènes individuels et de séquences concaténées est testée avec la méthode CADM (Congruence Among Distance Matrices) (Campbell *et al.* 2009 ; Campbell *et al.* 2011 ; Legendre & Lapointe 2005). Pour ce faire, la congruence entre les matrices de distances est analysée sous le logiciel R version 3.0.2 (R Core Team 2013), avec les fonctions 'CADM.post' et 'CADM.global' intégrées dans la librairie "Ape" (Paradis *et al.* 2004). Ces fonctions calculent le coefficient de concordance de Kendall (W), la statistique χ^2 Friedman, les corrélations de Mantel (r) et les p-value. Les coefficients W et $r = 1$ indique une parfaite congruence entre les matrices ($0 \leq W, r \leq 1, \alpha = 0.05$). Une incongruence entre les topologies des arbres supposerait une divergence entre l'histoire évolutive des gènes.

²⁸ Le critère d'information bayésien (BIC) est une mesure de la qualité de vraisemblance d'un modèle statistique en ajoutant k -paramètres afin de satisfaire le critère de parcimonie (k = nombre de paramètres à estimer du modèle)

Pour détecter d'éventuels signaux de recombinaison génétique qui perturbent le schéma évolutif au sein des alignements de séquences, représenté par les arbres phylogénétiques, des réseaux phylogénétiques ont été générés en utilisant l'algorithme Neighbor-Net (Bryant & Moulton 2004) implémenté dans SplitsTree version 4.14.4 (Huson 1998). La recombinaison entre les souches est ensuite évaluée par le test PHI (Pairwise Homoplasy Index) (Bruen *et al.* 2006) implémenté dans SplitsTree v.4.14.4. Les séquences nucléotidiques sont ensuite analysées avec le logiciel RDP version 4 Beta 4.72 utilisant sept algorithmes de détection de recombinaison : RDP (R), Geneconv (G), Bootscan (B), MaxChi (M), Chimaera (C), SiScan (S), 3Seq (T) (Martin *et al.* 2015) et 1000 permutations pour détecter des événements de recombinaison possibles.

Exploration du polymorphisme génétique des populations

MLSA : La diversité haplotypique (H_d), la diversité nucléotidique (π), le nombre d'haplotypes (H_p), le nombre sites polymorphes (S), la teneur en G+C sont déterminés et des tests de neutralité : *D de Tajima* (Tajima 1989) et *Fs de Fu* (Fu 1997) sont réalisés grâce au logiciel DnaSP version 5.10.1 (Librado & Rozas 2009). La diversité haplotypique prend en compte le nombre d'individus ainsi que la fréquence des haplotypes. Elle se définit comme la probabilité que deux haplotypes tirés au hasard dans un échantillon soient identiques. La diversité nucléotidique mesure la divergence nucléotidique moyenne entre tous les paires de séquences d'un même échantillon choisies aléatoirement (Nei & Li 1979). Les tests de neutralité sélective ont été calculés pour les populations présentant un polymorphisme nucléotidique. En outre, un test de recombinaison est effectué pour chaque population pour déterminer si les événements de recombinaison participent à la diversification génétique au sein des populations. Le test est réalisé avec le logiciel DnaSP v.5.10.1.

MLST et MLVA : La diversité génétique intra-population est mesurée en calculant la proportion de loci polymorphes (P), le nombre d'haplotypes et la diversité haplotypique (H_E) à l'aide du programme GenAlEx version 6.5 (Peakall & Smouse 2012). La richesse allélique (A) par raréfaction (El Mousadik & Petit 1996) est calculée en utilisant la fonction '*allelic.richness*' intégrée dans la librairie 'hierfstat' (Goudet 2014). Les relations entre haplotypes sont représentées par un arbre couvrant minimum ('minimum spanning tree' construit avec l'algorithme goeBurst (Francisco *et al.* 2009) implémenté dans le logiciel PHYLOVIZ (Francisco *et al.* 2012). L'indice de Hunter-Gaston (*HGDI*) (Hunter & Gaston 1988) est calculé pour évaluer le pouvoir de discrimination de chaque méthode de génotypage.

Structure des populations

Pour tester la structure génétique et le niveau de diversité (intra, inter-populationnel et -régional), une analyse de variance moléculaire (AMOVA) et un calcul du déséquilibre de liaison pour chaque paire de locus dans chaque population sont réalisés à l'aide du logiciel ARLEQUIN version 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Les populations testées correspondent aux différents ZAEs échantillonnées. Le degré de diversification génétique entre les populations est évalué en calculant les indices de différenciation F_{ST} (Nei 1977) et R_{ST} (Slatkin 1995) avec ARLEQUIN v3.5 pour les données de séquences répétées en tandem. Comme les loci TR (microsatellites et minisatellites) n'évoluent pas à la même vitesse et peuvent suivre des modèles de mutation différents (Estoup & Angers 1998 ; Shriver *et al.* 1993), les deux paramètres F_{ST} et R_{ST} sont calculés en même temps pour vérifier la cohérence des résultats.

Par ailleurs, une approche bayésienne est utilisée à partir des données VNTR et à l'aide du logiciel GENELAND (Guillot *et al.* 2005 ; Guillot *et al.* 2008) pour déterminer sans *a priori* le nombre le plus probable k de groupes génétiquement différenciés qui minimisent les écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg et maximisent l'équilibre de liaison au sein des populations. La probabilité qu'un individu appartienne à un groupe génétique, sous un modèle de fréquence allélique non corrélée d'une part, et corrélée d'autre part (2 simulations différentes) est estimée. Ensuite, l'analyse est complétée par deux autres simulations en utilisant la position spatiale de chaque échantillon relevée pendant l'échantillonnage, pour déterminer la structure génétique spatiale au sein des 11 ZAEs prospectés. Pour chaque échantillonnage, chaque simulation est réalisé de la façon suivante : 10 simulations indépendantes de 200 000 itérations de l'algorithme de Monte Carlo par chaîne de Markov (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) ; avec l'option de fréquences corrélées/ou non ; en utilisant/ou non la position spatiale de chaque individu ; en permettant à k de varier librement de 1 à 20 ; l'intensité maximale du processus de Poisson fixée à 100. La valeur de k est déterminée sur la base de la plus forte vraisemblance obtenue parmi l'ensemble des 10 simulations indépendantes effectuées. Ensuite avec les données spatiales, la probabilité d'appartenance de chaque individu à chaque cluster est calculée pour chaque pixel du domaine spatial étudié (500 x 500 pixels).

Les séquences partielles des gènes produites au cours cette présente étude ont été déposées dans GenBank (liste préliminaire des numéros d'accession KU255860 à KU256216, **Annexe 4**).

RESULTATS ET DISCUSSION

AMPLEUR DE L'ECHANTILLONNAGE ET COLLECTION DE SOUCHES DU ceRs

Un total de 1224 isolats ont été prospectés à partir : • de plants symptomatiques de pomme de terre (*Solanum tuberosum*, 82 % des souches), tomate (*Solanum lycopersicum*, 10 %), aubergine africaine (*Solanum gilo*, 4 %), géranium (*Pelargonium* sp. 1 %), bident hérisé (*Bidens pilosa*, 1 %), poivron (*Capsicum annuum*), haricot (*Phaseolus vulgaris*), brède morelle (*Solanum nigrum*) ; • de l'eau d'irrigation (1 %) ; • de la rhizosphère (2 %) ; et • de plante hôte potentielle asymptomatique : amour en cage (*Physalis* sp.) (**Figure 24**).

La conception de l'échantillonnage a assuré une large couverture des principaux bassins de production des Hauts Plateaux. Les 1224 isolats sont collectés sur un total de 74 sites au cours des 3 prospections, dont 4 sites prospectés en Octobre 2012 (3 % des souches isolées), 38 sites en Avril 2013 (59 %), et 32 sites en Décembre 2013 (38 %). Les sites sont reparties sur 12 ZAEs : ZAE 1 (Antsirabe, 28 % des souches), ZAE 2 (Betafo, 17 %), ZAE 3 (Faratsiho, 9 %), ZAE 4 (Ambatolampy, 8 %), ZAE 5 (Andramasina, 1 %), ZAE 6 (Ambohidratrimo, 4 %), ZAE 7 (Arivonimamo, 15 %), ZAE 8 (Miarinarivo, 3 %), ZAE 9 (Soavinandriana, 6 %), ZAE 10 (Ambositra, 7 %), ZAE 11 (Ambohimahasoa, 3 %) et ZAE 12 (Manjakandriana avec une souche en collection) (**Figure 25**).

Différentes strates agrosystémiques présentant différents types de sol sont représentées ('tanety' ferrallitique fertilisé, terrains irrigués et plaines argilo-humiques, 'baiboho' limono-argilo-sableux) (**Figure 26**) et situées à une altitude allant de 1100 à 2000 m. L'échantillonnage a également couvert les trois saisons de culture : contre saison (prospection Octobre 2012), pluviale (prospection Décembre 2013), intermédiaire (prospection Avril 2013), et différentes variétés de pomme de terre (n = 25). Il faut bien reconnaître dans ce contexte, l'hétérogénéité de l'écosystème voire la diversité des niches écologiques qu'occuperaient les souches du ceRs.

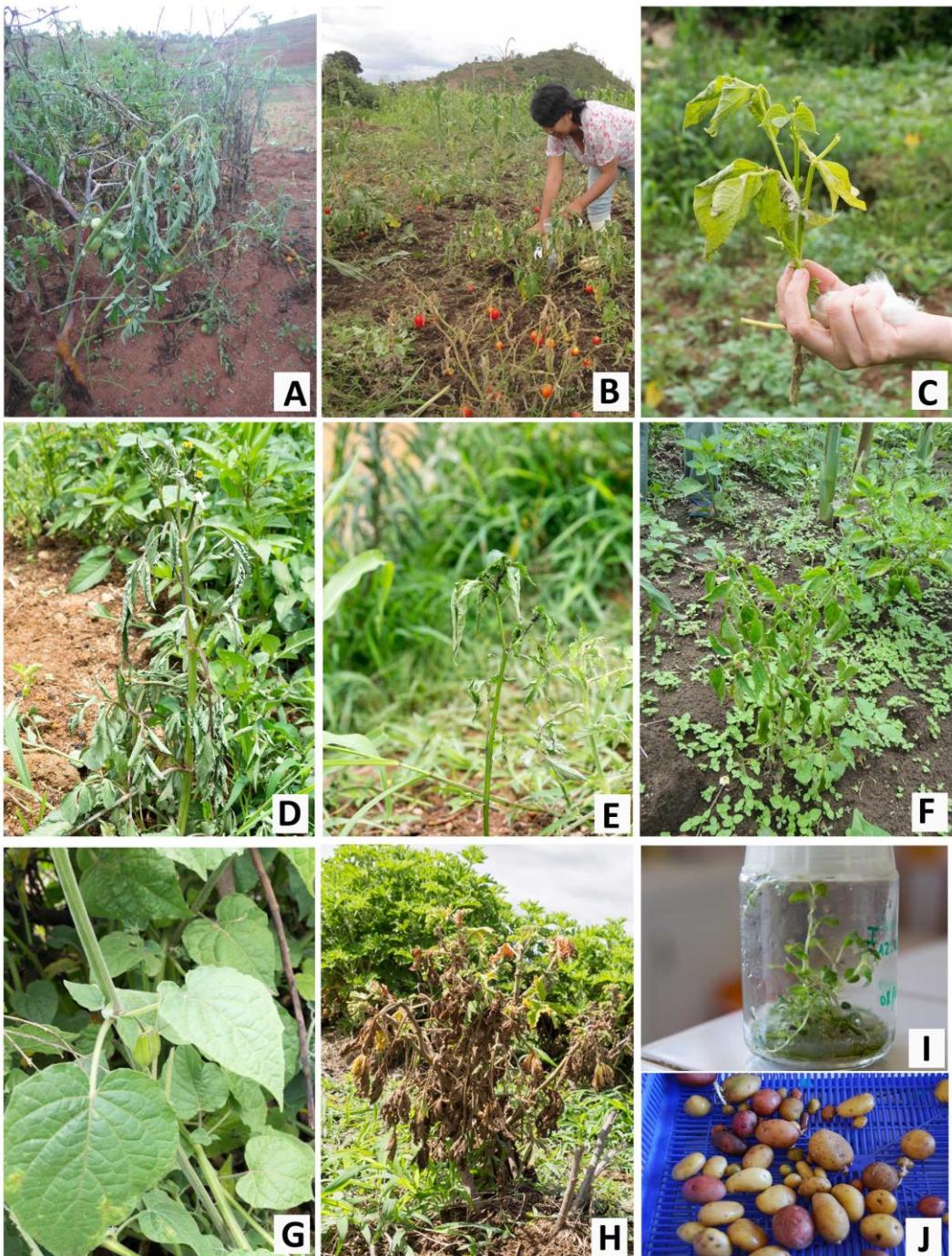


Figure 24 – Les différentes espèces de plantes hôtes et autres matériaux prélevés. (A) *Solanum lycopersicum* (tomate). (B) *S. gilo* (aubergine africaine). (C) *Phaseolus vulgaris* (haricot). (D) *Bidens pilosa* (bident). (E) *S. nigrum* (brède morelle sauvage). (F) *Capsicum annuum* (piment). (G) *Physalis sp.* (amour en cage). (H) *Pelargonium sp.* (I) vitroplants de pomme de terre. (J) tubercules semences de pré-base. Crédits photos : (A) L. Costet., (B-I) Cellier, (J) Ravelomanantsoa.

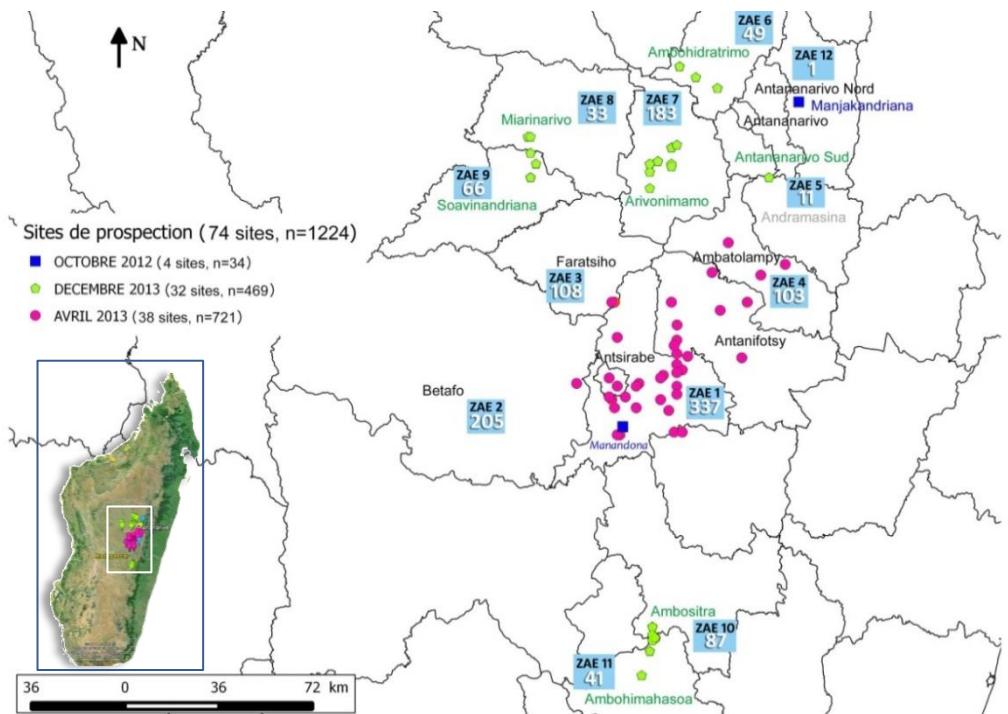


Figure 25 – Localisation des sites d'échantillonnage sur les Hauts Plateaux de Madagascar.

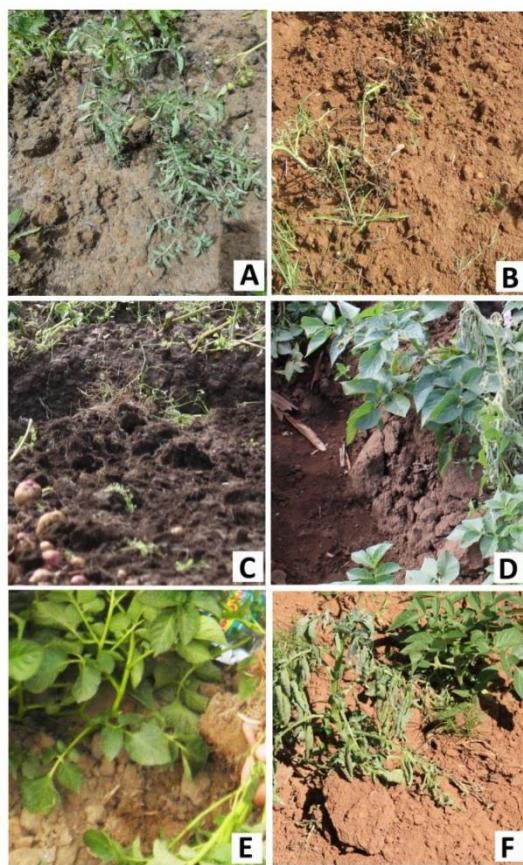


Figure 26 – Les différents types de sol sur lesquels se cultivent la pomme de terre. (A) sableux. (B) limoneux. (C) limono-argileux. (D) argilo-limoneux. (E) argilo-sableux. (F) argileux. Crédits photos : Ravelomanantsoa.

PHYLOTYPES, SPECTRE D'HOTES ET DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE

Les profils d'amplification PCR multiplexe spécifique au ceRs et aux quatre phylotypes (I à IV) ont montré que les 1224 isolats appartiennent bien au ceRs, à raison de 124 (10 %) isolats assignés au phylotype I, 221 (18 %) au phylotype III ; et la grande majorité des isolats tombent dans le phylotype II (879 isolats qui représentent 72 % des échantillons). Le phylotype I est isolé nettement sur la partie Nord-Ouest des Hauts Plateaux, à une altitude comprise entre 1000 et 1600 m. Les phylotypes II et III sont présents dans la presque totalité des zones prospectées de moyenne et haute altitude (1000 à 2000 m).

Les souches du phylotype I sont majoritairement isolées chez la tomate (48 %), l'aubergine africaine (35 %), la pomme de terre (16 %) et d'autres solanacées comme le piment et la brède morelle. Un total de 91 % des souches de phylotype II est isolé de la pomme de terre, mais quelques souches sont également isolées de la tomate (6 %), du haricot et d'une mauvaise herbe identifiée sur les parcelles de pomme de terre (bident). Quatre-vingt-trois pour cent des souches du phylotype III sont isolées de la pomme de terre, mais il est aussi isolé de la tomate, du piment, du haricot, du pélargonium, de *Physalis sp.* et des adventices comme le bident et la brède morelle sauvage. Les souches de phylotype III ont présenté un spectre d'hôte plus large que les souches de phylotype II, ce qui pourrait attester sa large colonisation spatiale. Les trois phylotypes affectent donc la pomme de terre mais aussi la tomate. En outre au moment où nous avons fait la prospection, la présence des souches de phylotype II et III dans les eaux d'irrigation laisse à supposer que les eaux d'irrigation seraient sources potentielles de contamination des parcelles irriguées situées en aval. La **Figure 27** montre la distribution spatiale des trois lignées phylogénétiques sur l'ensemble des ZAEs prospectées, leur spectre d'hôtes et leur distribution en altitude.

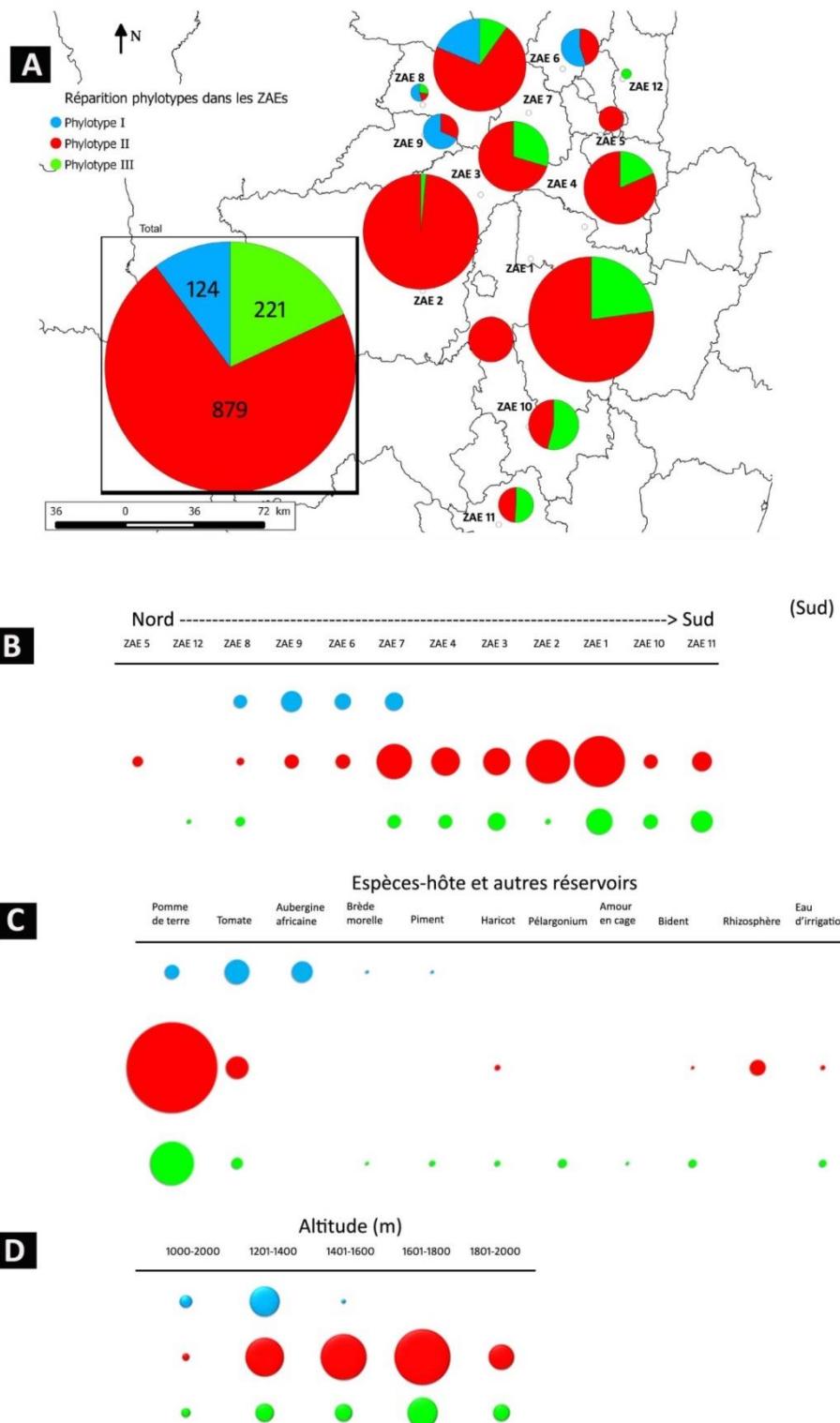


Figure 27 – Fréquence des phylotypes identifiés (A) sur les Hauts Plateaux centrales de Madagascar, (B) sur un transect Nord au Sud, (C) sur les espèces-hôtes échantillonnées, et (D) selon l'altitude.

IDENTIFICATION DE L'ECOTYPE 'BROWN ROT' IIB-1 ET DE SEPT SEQUEVARS

L'amplification du fragment spécifique aux souches 'Brown rot' (IIB-1) a été réalisée sur les 255 isolats du phylotype II retenus dans la collection de travail. Les isolats sont représentatifs de la diversité d'hôtes, des sites prospectés, des ZAEs et des périodes de prospection. Un amplicon spécifique de la taille attendu à 307 pb a été produit chez l'ensemble des isolats indiquant ainsi leur appartenance au groupe de souches de quarantaine. Il s'agit de la première description et caractérisation des souches 'Brown rot' (IIB-1) malgaches et donc le premier signalement de ces souches adaptées au froid à Madagascar.

Des séquences partielles du gène *egl* sont obtenues à partir d'un ensemble de 289 souches représentatives de chaque phylotype et de l'échantillonnage dans les 12 ZAEs, soit 70 souches du phylotype I, 77 souches du phylotype II, 142 souches du phylotype III. Les séquences *egl* des souches malgaches du phylotype II ne présentent aucun polymorphisme : *Hd*, π , *Hap* et *S* = 0. Ces séquences sont ensuite comparées avec celles des souches de référence internationales ($n = 158$) qui couvrent la diversité génétique connue en termes de phylotypes et sequevars. Les arbres phylogénétiques générés avec le modèle ML et NJ sont congruents ($r = 0.81$, $W = 0.90$, $p < 0.001$). L'arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles de l'*egl* présente distinctement les quatre groupes phylogénétiques : phylotypes I, II, III, IV. Un total de 7 séquences-type bien distincts avec une similarité de séquence inférieure à 99 % a été identifié après alignement des séquences. L'analyse phylogénétique montre 7 groupes phylogénétiques où sont assignées les souches du ceRs malgaches dont chaque nœud est soutenu par une valeur de bootstrap supérieure à 60 %. Chaque groupe est identifié par un séquence-type qui est défini comme un sequevar (**Figure 28**).

Les souches malgaches du phylotype II sont assignées au sequevar 1 (valeur de bootstrap : 62 %), confirmant ainsi leur appartenance au groupe IIB-1 (**Figure 29**). Ces souches unifient un groupe monophylétique avec les souches de l'écotype 'Brown rot' IIB-1 qui sont mondialement répandues. D'évidence, on peut anticiper que ce sont des souches introduites à Madagascar.

Le phylotype I est subdivisé en deux groupes dont l'un des groupes correspond à un sequevar connu I-18 (67 séquences identiques avec les séquences références, valeur de bootstrap : 64 %), et un groupe qui diverge de 1 % du sequevar 18 et différents des autres sequevars du phylotype I (valeur de bootstrap : 92 %) constituant ainsi un nouveau sequevar au sein du phylotype I : encodé 'sequevar 58' (**Figure 29**). Le sequevar 18 est identifié dans les ZAE 6, ZAE 7, ZAE 8, et ZAE 9. Le sequevar 58 est composé de séquences appartenant à 5 souches échantillonnées à deux endroits distants géographiquement. Ces souches proviennent d'une part de la ZAE 8 ($n = 2$) prélevées sur tomate cultivées sur une même parcelle et d'autre part de la ZAE 5 ($n = 3$) prélevées sur pomme de terre. Les variations génétiques de la séquence partielle *egl* au sein du phylotype I sont faibles (*Hd* = 0.13, π = 0.00, *Hap* = 2 et *S* = 5). Sur la base de ces séquences *egl*, aucun signal de recombinaison génétique n'a été détecté entre les deux sequevars.

L'analyse des séquences *egl* des souches de phylotype III montre que le phylotype III est génétiquement plus diverse (*Hd* = 0.53, π = 0.02, *Hap* = 4 et *S* = 23) que les deux autres phylotypes (I et II). Le phylotype III est subdivisé en 4 groupes génétiques dont l'un des groupes correspond au sequevar 19 ($n = 72$) et les 3 autres groupes divergent chacun du sequevar 19 et entre eux à 1 % et plus. Nous avons

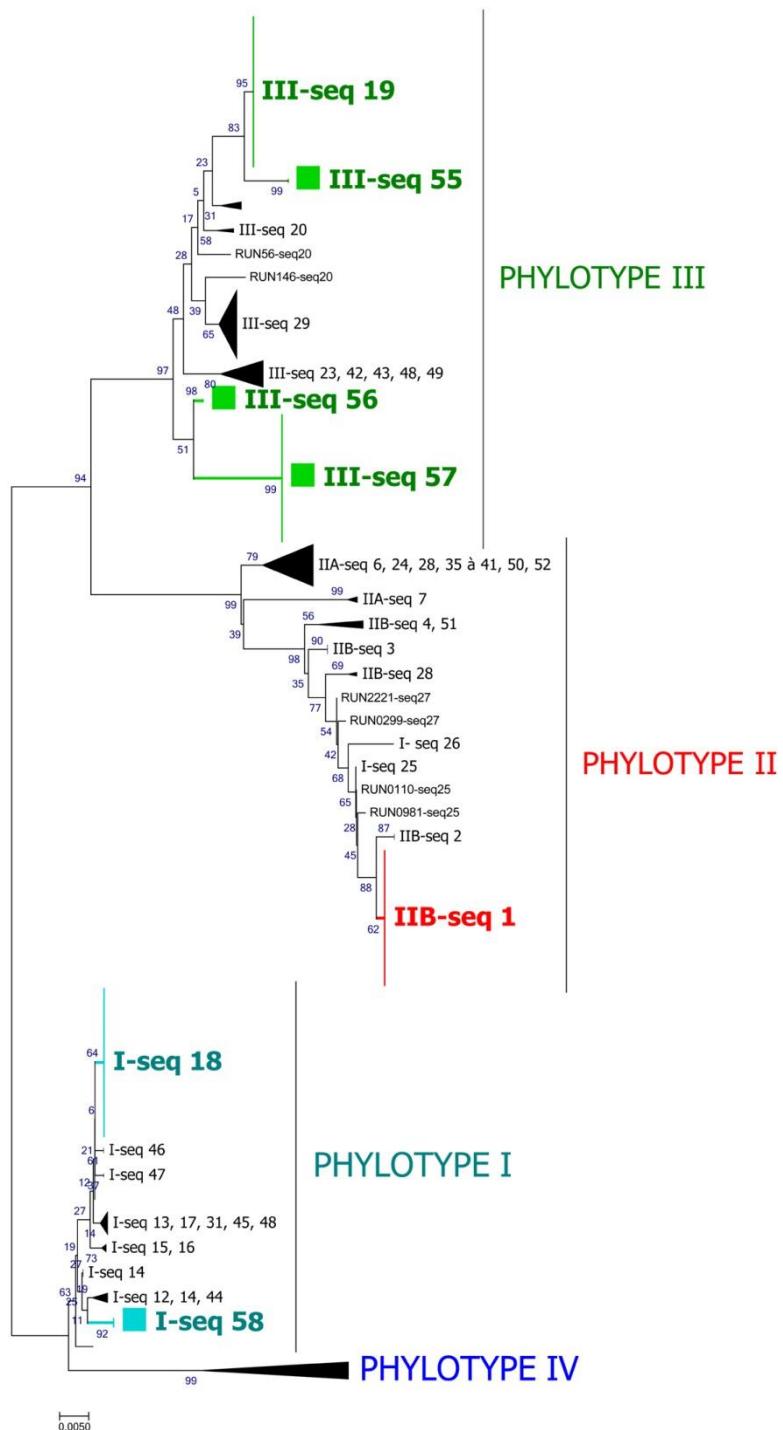


Figure 28 – Arbre phylogénétique construit à partir de 447 séquences partielles du gène *egl* par la méthode de Neighbor-Joining. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993). L'arbre avec la plus grande vraisemblance (0.46150929) est représenté. 1000 itérations sont effectuées lors des analyses de bootstrap. Les valeurs de bootstrap pour chaque noeud sont présentées à côté des branches. L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour inférer l'arbre phylogénétique. Les analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 (Kumar et al. 2016).

identifié ainsi trois autres nouveaux séquevars du phylotype III : ‘sequevar 55’ (valeur de bootstrap : 99 %), ‘sequevar 56’ (valeur de bootstrap : 98 %), et ‘sequevar 57’ (valeur de bootstrap : 99 %) (**Figure 29**). Le sequevar 55 regroupe 2 souches isolées de ZAE 1 sur pomme de terre cultivée dans une même parcelle, et coexistant avec des souches du sequevar 57 et aussi du phylotype II. Le sequevar 56 regroupe 2 souches isolées chacun sur pomme de terre, et isolé de ZAE 1 (souche coexistant avec une souche du phylotype II) et ZAE 10 (souche coexistant avec des souches assignées à différents séquevars : 19 et 56 dans une même parcelle). Le sequevar 57 est composé de 67 souches provenant de sept ZAEs différents : ZAE 1, ZAE 2, ZAE 3, ZAE 4, ZAE 8, ZAE 10, ZAE 11. Le test PHI a identifié des événements de recombinaison entre les séquences du phylotype III (p -value < 0.001). Deux événements de recombinaison ont été détectés avec RDP. L’événement 1 est détecté par 4 méthodes (G, B, M, T) où ils identifient le sequevar 56 comme recombinant, le sequevar 19 comme parent majeur et le sequevar 57 comme parent mineur. L’événement 2 est identifié par 3 méthodes (B, S, T) où ils identifient le sequevar 55 comme recombinant, le sequevar 19 comme parent majeur et le sequevar 57 comme parent mineur. L’hypothèse d’échanges de matériel génétique serait plausible si nous considérons le fait que les séquevars 56 ou 55 coexistent avec les séquevars 19 et 57 dans la même parcelle où ils ont été échantillonnés.

Enlevant les parties supposées recombinantes dans la construction de l’arbre phylogénétique, nous retrouvons la même répartition des séquevars sur l’arbre.

Le phylotype et le séquevar désignent chacun des groupes hiérarchiques de séquences partageant un degré de similitude d’un marqueur génétique stable et conservé au sein de l’espèce, respectivement 16S-23S ARNr et *egl* (Fegan & Prior 2005). Ils expriment des liens de distances génétiques (parenté) entre les souches.

Aucun échange de matériel génétique n’a été détecté entre les phylotypes I, II, III sur la séquence partielle du gène *egl* (sur la base de 290 souches malgaches analysées). Dans l’ensemble, les souches malgaches montrent une forte diversité génétique sur la base de la séquence *egl* : ($Hd = 0.78$, $\pi = 0.04$, $Hap = 7$ et $S = 87$). Six ZAEs (ZAE 2, ZAE 3, ZAE 4, ZAE 7, ZAE 0 et ZAE 11) sont infestées à la fois par les 3 phylotypes ; le séquevar IIB-1 se retrouve dans l’ensemble des ZAEs, sauf la ZAE 12 où nous n’avons pu échantillonner qu’une souche car les récoltes étaient entamées. Les séquevars 19, 55, 56 et 57 se retrouvent dans les ZAEs de la région Vakinankaratra et dans le Sud tandis que les séquevars 18 et 58 sont plutôt présents dans la partie Nord-Ouest des Hauts Plateaux.

La majorité des séquevars affectent la pomme de terre et la tomate, excepté le séquevar 56. Pour le phylotype III, le séquevar 19 est en plus isolé chez le haricot ; tandis que le séquevar 57 présente une large gamme d’hôtes affectant toutes les espèces échantillonnées (sauf l’aubergine) qui justifierait son ancestralité par rapport aux autres séquevars du phylotype III inférée par les arbres d’évolution. Les séquevars 18 et 58 ont été essentiellement isolés de Solanées.

Enfin du point de vue épidémiologique, l’émergence des souches de l’écotype ‘Brown rot’ à Madagascar, sa large dispersion et surreprésentation dans les échantillons de pommes de terre affectées par le flétrissement bactérien indique clairement que l’épidémie de flétrissement bactérien à Madagascar est associée à l’infection par des souches du phylotype IIB-1. Ces données seront confirmées ci-après avec la méthode de génotypage MLVA.

La **Figure 30** montre la distribution des séquevars dans les ZAEs prospectées et chez les espèces-hôte échantillonnées.

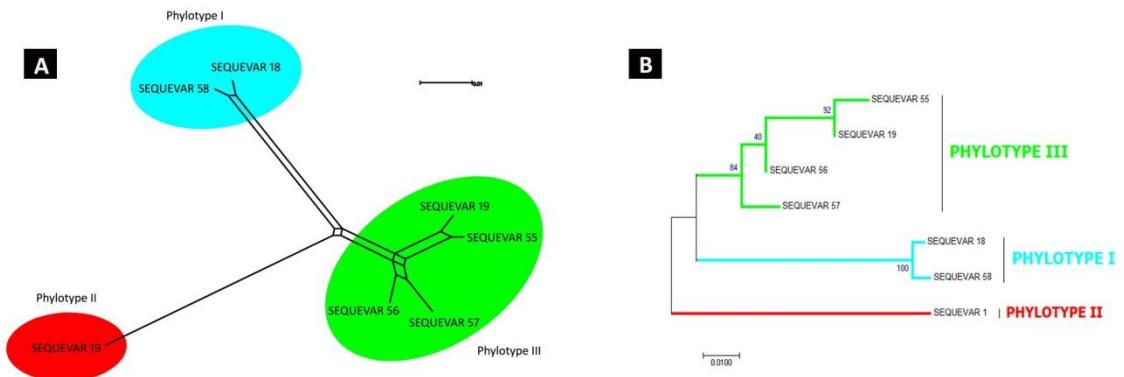


Figure 29 – (A) Réseau phylogénétique (B) Arbre phylogénétique basé sur 7 séquences-type du gène *egl* identifiés à partir de 447 séquences partielles.

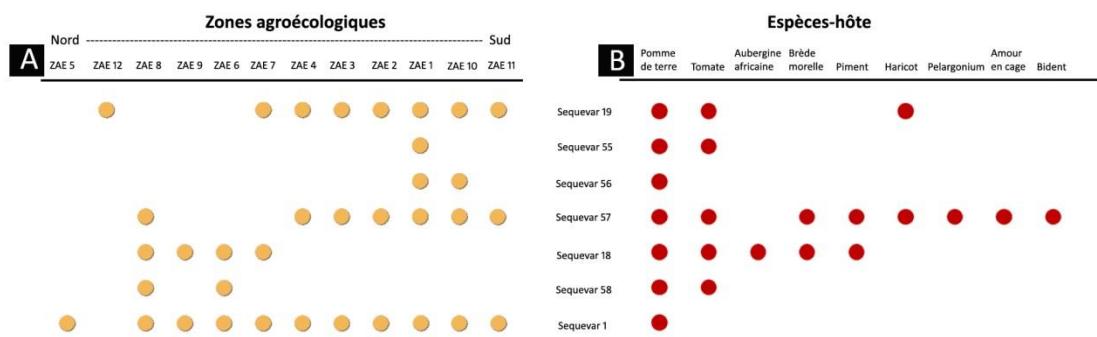


Figure 30 – Répartition (présence/absence) des différents séquençevars (A) dans les ZAEs prospectées et (B) chez les espèces-hôte échantillonnées.

EMERGENCE ET INVASION EPIDEMIQUE DE POPULATIONS CLONALES DE L'ECOTYPE 'BROWN ROT' IIB-1

Diversité génétique de l'écotype 'Brown rot' IIB-1

Les souches 'Brown rot' IIB-1 sont des souches hautement virulentes soumises à réglementation, leur présence dans les bassins de production de pomme de terre suscite beaucoup d'intérêt épidémiologique. La comparaison par alignement des séquences partielles des sept gènes : *gdhA*, *gyrB*, *rplB*, *leuS*, *adk*, *mutS* et *egl* d'un échantillon de 20 souches du ceRs phylotype IIB-1 représentatives des ZAEs et espèces-hôte a montré une **absence totale de polymorphisme**, définissant en conséquence une unique séquence-type. Comme les souches IIB-1 sont connues comme formant un **groupe monophylétique** de souches, cela implique que les souches IIB-1 reparties dans les ZAEs affectant la tomate et la pomme de terre sont issues d'un ancêtre commun. L'absence de variabilité au niveau des marqueurs indique qu'aucune mutation n'a été accumulée sur ces séquences, pouvant suggérer une histoire épidémiologique assez récente.

Pour pouvoir différencier les souches entre elles, nous avons sélectionné 9 loci TR polymorphes pour les souches IIB-1 malgaches : RS2BL25, L539, RS2BL22, L540, RS2BL21, RS2AL01, RS2BL24, L563, L504 qui composent le schéma RS2-MLVA9. Une collection de 285 souches (C285) composée d'une collection de 255 souches représentatives des souches malgaches (CMG-II) et une collection de 30 souches représentatives de la collection mondiale (CREF-II issue de 30 pays différents) ont été génotypées. La collection CMG-II est composée de 10 collections de souches échantillonnées sur 10 ZAEs : C2-ZAE1²⁹ (n = 75), C2-ZAE2 (n = 65), C2-ZAE3 (n = 23), C2-ZAE4 (n = 42), C2-ZAE5 (n = 1), C2-ZAE6 (n = 12), C2-ZAE7 (n = 23), C2-ZAE8 (n = 6), C2-ZAE10 (n = 2), C2-ZAE11 (n = 9), de sorte qu'on ait au moins une souche par parcelle échantillonnée dans chaque ZAE. La liste des souches et leurs caractéristiques sont présentées en **Annexe 1**.

Dans l'ensemble, les 9 loci TR présentent du polymorphisme. Les loci L539 et L504 sont les plus variables (respectivement $H_E = 0.61$ et 0.57 , $A = 3.16$ et 1.33). Le schéma RS2-MLVA9 indique un bon pouvoir de discrimination $HGDI = 0.80$. RS2-MLVA9 indiquent une **faible diversité génétique des souches IIB-1** mais distingue au total 47 haplotypes pour la collection C285 ($H_E = 0.20$, $A = 1.73$, $P = 94\%$) ; 19 haplotypes pour la collection CREF-II ($H_E = 0.24$, $A = 1.66$, $P = 88\%$, $HGDI = 0.89$) ; et 31 haplotypes pour la collection CMG-II ($H_E = 0.19$, $A = 2.12$, $P = 100\%$, $HGDI = 0.78$). Le polymorphisme génétique des loci est présenté dans le **Tableau 6**. Le profil allélique des souches du ceRs phylotype IIB-1 est présenté en **Annexe 1**.

Les relations génétiques entre les haplotypes des souches du ceRs phylotype IIB-1 malgaches provenant de différentes ZAE et les souches du ceRs provenant de différents pays sont représentées par un arbre couvrant minimum (ACM1) où chaque cercle représente un haplotype unique (ST), chaque segment reliant deux haplotypes est associé au nombre de locus qui les différencient et tient compte du nombre d'allèles à chaque locus (**Figure 31**). L'arbre ACM1 montre que les souches du groupe IIB-1 présentes dans les bassins de production de pomme de terre sont groupées en deux complexes clonaux : CC MTII-1 et CC MTII-2, dont un complexe clonal majeur CC MTII-1 et présente 3 haplotypes singuliers MTII-7, MTII-32, MT46 (i.e. haplotypes qui divergent des autres haplotypes par plus d'un locus). L'arbre ACM1

²⁹ C2-ZAE1 = collection de souches du phylotype IIB-1 échantillonnées dans la ZAE1 (C : collection, 2 : phylotype II, ZAE1 : zone agroécologique #1)

Tableau 6 – Indices de polymorphisme des 9 loci constitutifs du schéma RS2-MLVA9 mesurés dans la collection CMG-II.

Loci	Plage de taille allélique	Na	A	H_E
RS2BL25	1, 3-4	3	1.77	0.11
L539	3-7	5	3.63	0.60
RS2BL22	2,6-7	3	1.25	0.02
L540	2-3, 10-11, 13-14	6	1.87	0.10
RS2BL21	11-12	2	1.8	0.14
RS2AL01	1, 4	2	1.74	0.12
RS2BL24	9-10	2	1.15	0.02
L563	6-8	3	1.35	0.04
L504	8-10, 12	4	3.02	0.55

Nombre de souches	255
Pourcentage de loci polymorphes (%)	100
Moyenne de la richesse allélique	2.12
Moyenne de l'indice de diversité de Nei	0.19
Pouvoir de discrimination (HGDI)	0.78
Nombre d'haplotypes	31
Nombre de singlets	3

Na : nombre d'allèles, A : richesse allélique, H_E : indice de diversité de Nei.

nous révèle que les souches malgaches sont quasiment regroupées dans un même complexe clonal avec les souches IIB-1 largement répandues dans le monde. Les liaisons DLV pourraient être liées à des haplotypes manquants par un biais d'échantillonnage supposant ainsi la descendance des souches IIB-1 à partir d'un ancêtre commun unique. Trois haplotypes isolés à Madagascar sont identifiés chez des souches de différents pays étrangers. L'haplotype MTII-9 isolé dans les bassins de production est identifié dans certains pays d'Afrique (Nigeria, Guinée, Rwanda), d'Europe (Suède, Espagne et le Royaume Uni), de la Méditerranée (Maroc et Turquie), en Guadeloupe et à la Réunion, l'île la plus proche de Madagascar. L'haplotype MTII-8 est présent en Israël et en France ; et l'haplotype MTII-6 est présent en Norvège. Ces observations indiquent que les souches malgaches IIB-1 sont **génétiquement proches des souches mondiales et confirment l'hypothèse d'une introduction récente des souches IIB-1 à Madagascar.**

Chaque haplotype regroupe des souches ayant le même profil allélique (qui constitue donc un clone, excepté pour les ZAE 5 et ZAE 11 où il n'y a qu'un seul échantillon). Les ZAE 1 et ZAE 2 sont celles où on a isolé le plus d'haplotypes (ZAE 1 = 16 MTs, ZAE 2 = 11 MTs, ZAE 3 = 7 MTs, ZAE 4 = 6 MTs, ZAE 5 = 1, ZAE 6 = 4 MTs, ZAE 7 = 6 MTs, ZAE 8 = 2 MTs, ZAE 10 = 2 MTs, ZAE 11 = 1 MTs). Chaque ZAE est colonisé par plus d'un haplotype.

L'exploration de la diversité des haplotypes au sein d'une même parcelle a été réalisée à partir de 4 populations de souches : P2-Z1³⁰ (n = 22), P2-Z2 (n = 22), P2-Z3 (n = 25), P2-Z4 (n = 19) prélevées respectivement dans les ZAE 1, ZAE 2, ZAE 3, ZAE 4. Chaque population est donc composée de souches isolées d'une même parcelle. L'analyse des données RS2-MLVA9 montre qu'au niveau d'une parcelle de culture, qui présente en moyenne une superficie 2 à 4 ares, coexistent plusieurs haplotypes : P2-Z1 (5 MTs), P2-Z2 (7 MTs), P2-Z3 (7 MTs), P2-Z4 (4 MTs). Ces haplotypes sont groupés dans des complexes clonaux (SLV), en singletons (DLV) et les CC sont distants entre eux par 2 loci. Les différences alléliques chez les DLV sont entre ± 1 à ± 3 . La présence de plus d'un complexe clonal et de singletons pourrait supposer de multiples contaminations par différentes sources. Cependant un biais d'échantillonnage n'est pas à exclure où les SLV intermédiaires aux DLV n'aient pas été échantillonnes au niveau de la parcelle ou pour l'analyse MLVA, suggérant ainsi que les haplotypes au sein d'une même parcelle sont probablement issus d'une même source (**Figure 32**).

Les relations génétiques entre les haplotypes des souches du ceRs phylotype IIB-1 malgaches provenant des différentes ZAEs sont représentées sur l'arbre ACM2 (**Figure 33**). Les haplotypes MT3 et MT9 sont les haplotypes les plus dominants. L'haplotype MT9 est le plus répandue, dans 8 ZAEs (sauf dans les ZAE 2 et ZAE 5), et l'haplotype MT3 est présent dans 5 ZAEs (ZAE 1, ZAE 2, ZAE 3 ; ZAE 4 et ZAE 7). Vu que nous avons retenu que 29 % des souches IIB-1 isolées des bassins de production pour l'analyse MLVA, on ne peut prédire qui est l'haplotype fondateur. Toutefois, on pourrait supposer *de visu* que le complexe clonal CC MTII-1 semble être structurée génétiquement en 3 sous-complexes clonaux (SCC) dispersés dans les zones de production, dont chacun des SCCs présente un haplotype prédominant où la divergence radiale pourrait être initiée (SCC1 avec l'haplotype central MT9, SCC2 avec l'haplotype central MT3, et SCC3 avec l'haplotype central MT2), suspectant ainsi de multiples introductions des souches IIB-1 dans les bassins de production d'une part, ou d'une ou très peu d'introductions

³⁰ P2-Z1 = population de souches du phylotype IIB-1 collectée sur une même parcelle localisée dans la ZAE1 (P : population, 2 : phylotype II, Z1 : ZAE1)

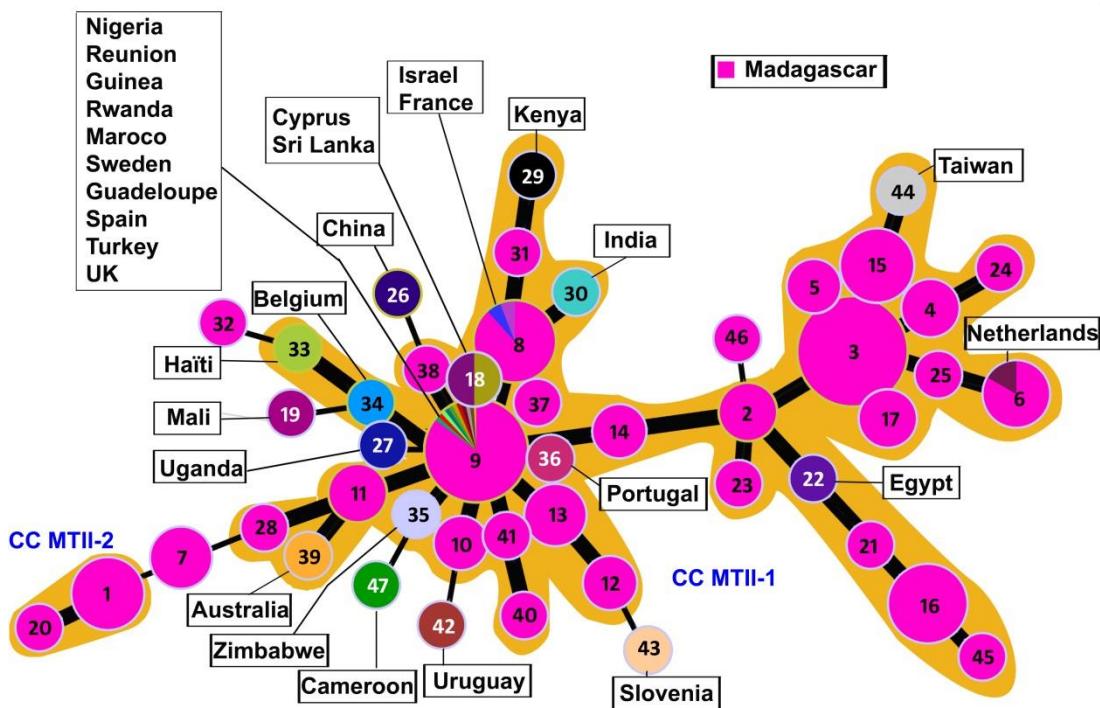


Figure 31 – Arbre couvrant minimum (ACM1) obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) de 285 souches ceRs phylotype IIB-1 (C285). Chaque cercle représente un haplotype (MTII) unique défini par un nombre à l'intérieur du cercle ; la taille est proportionnelle au nombre de souches ; les couleurs correspondent aux pays (étiquettes) où les souches ont été échantillonnées. Un trait épais reliant deux cercles correspond à un SLV et un trait plus fin correspond à un DLV. Un complexe clonal est entouré d'un halo de couleur jaune orangée (CC MTII-1), l'autre de couleur gris (CC MTII-2).

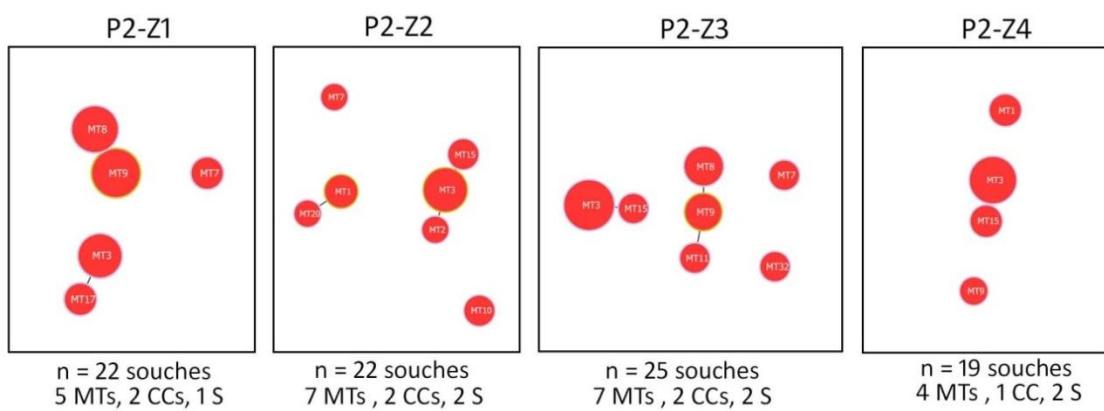


Figure 32 – Arbres couvrant minimum obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) des souches ceRs phylotype IIB-1 isolées de quatre parcelles de culture (P2-Z1, P2-Z2, P2-Z3, P2-Z4). Chaque cercle représente un haplotype (MT) unique défini par un nombre à l'intérieur du cercle ; la taille est proportionnelle au nombre de souches. Les traits reliant les cercles correspondent à un SLV. Un complexe clonal est formé d'haplotypes reliés par un SLV. Les singletons sont les haplotypes non reliés au complexe clonal à DLV.

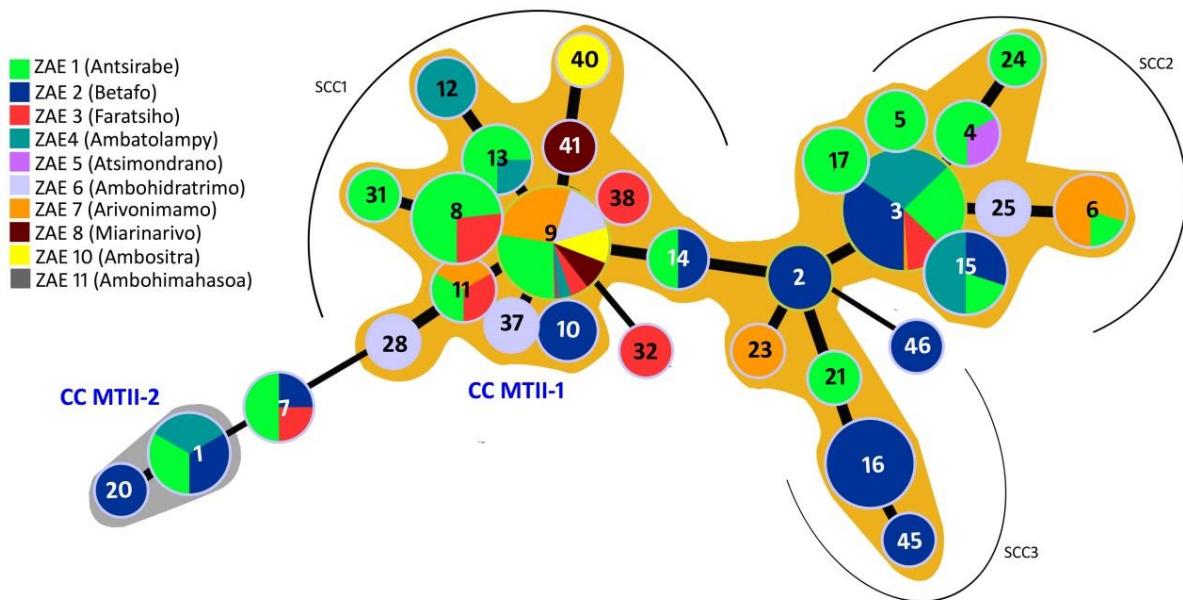


Figure 33 – Arbre couvrant minimum (ACM2) obtenu à partir des données de génotypage RS2-MLVA9 (9 loci) de 255 souches de phylotype IIB-1 (CMG-II). Chaque cercle représente un haplotype (MTII) unique défini par un nombre à l'intérieur du cercle ; la taille est proportionnelle au nombre de souches ; les couleurs correspondent aux ZAEs où les souches ont été échantillonnées. Un trait épais reliant deux cercles correspond à un SLV et un trait plus fin correspond à un DLV. Un complexe clonal (CC) est entouré d'un halo de couleur jaune orangée et l'autre de couleur grise. Les SCC désignent un sous complexe clonal.

polyclonales. Par ailleurs, la présence d'un haplotype à la fois dans plusieurs ZAEs géographiquement distantes indique clairement un mode de dispersion par échange de matériel végétal infecté ou contaminé.

Structure génétique et organisation spatiale des populations des souches de phylotype IIB-1

La structure génétique des populations des souches de phylotype IIB-1 dans les Hauts Plateaux malgaches a été estimée par une méthode d'assignation bayésienne avec le logiciel Geneland. Ce dernier permet de déterminer le nombre k de groupes génétiques homogènes (= unités de populations) le plus vraisemblable au sein de la collection CMG-II, qui représente les souches isolées dans les 10 ZAEs, sur la base des données RS2-MLVA9 ainsi que la probabilité d'appartenance de chacun des individus à ces k populations. Nous avons choisi d'utiliser le modèle spatiallement explicite avec l'option 'fréquence allélique non corrélée'. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence 3 populations bien distinctes dans la collection CMG-II, CLII-1 (87 souches, $H_E = 0.12$, 18 MTs, 8 loci polymorphes), CLII-2 (148 souches, $H_E = 0.13$, 19 MTs, 8 loci polymorphes), CLII-3 (20 souches, $H_E = 0.12$, 6 MTs, 5 loci polymorphes). Les probabilités d'appartenance de tous les individus aux différentes populations ont été élevées (supérieure à 0.93). Les 3 populations sont génétiquement différenciées les unes par rapport aux autres (valeur moyenne de $F_{ST} = 0.47$ ($p < 0.001$) et $R_{ST} = 0.40$ ($p < 0.001$), **Figure 34**). Un total de 48 % (F_{ST}) / 41 % (R_{ST}) de la variabilité génétique totale est expliqué par la variation intra population et 52 % (F_{ST}) / 59 % (R_{ST}) est attribué aux différences entre populations ($p < 0.001$). Les indices de différenciation génétique entre les populations sont : CLII-1 vs CLII-2 = 0.45 (F_{ST}) / 0.26 (R_{ST}), CLII-2 vs CLII-3 = 0.50 (F_{ST}) / 0.69 (R_{ST}), CLII-1 vs CLII-3 = 0.62 (F_{ST}) / 0.46 (R_{ST}).

Ainsi, la structuration des populations en 3 groupes génétiques soutiendrait l'hypothèse d'une structure en 3 SCCs du CC MTII-1. Le SCC1 semble correspondre à la population CLII-2, SCC2 correspondrait à la population CLII-1, et SCC3 correspondrait à la population CLII-3 (**Figure 35**). L'analyse de la structure génétique, représentée sur la **Figure 34**, montre plusieurs possibilités quant à l'origine des populations CLII-1 et CLII-2 ; et la population CLII-3 pourrait être issue de ZAE 2.

En général, chaque haplotype est assigné à une population mais il y a des haplotypes qui sont assignées dans plusieurs populations. Par exemple l'haplotype MT3 est assigné en même temps dans les 3 populations, ainsi que les 10 autres MTs (**Figure 35**). Comme la méthode prend en compte de façon explicite la dimension spatiale, cette assignation signifierait qu'il y ait une probabilité de mélange de souches d'une population à une autre i.e. migration de souches entre populations. En effet, un faible déséquilibre de liaison est mis en évidence sur l'ensemble des 9 loci pour chaque population.

La forte structure en CC présenté sur l'ACM2 suggère par ailleurs une structure de population épidémique. L'organisation spatiale des 3 populations est représentée sur la **Figure 36. De visu**, la population CLII-1 est plus localisée dans le Nord-Ouest et dans le Sud avec une petite portion représentée dans la ZAE 1 ; la population CLII-2 est concentrée dans la partie centrale de la région 'Vakinankaratra' ; et la population CLII-3 est restreinte dans la ZAE 2.

Dispersion des souches du ceRs de l'écotype 'Brown rot'.

L'organisation spatiale de la diversité génétique semble être associée aux circuits de circulation des tubercules semences dans les bassins de production. Le centre primaire de production nationale de tubercules semences de pomme de terre se situe dans la ZAE 1, où les flux de semences sont très importants. On pourrait supposer que les populations CLII-1 et CLII-2 proviennent à l'origine de la ZAE 1. La population CLII-1 est prévalente dans les ZAEs plus éloignées du centre de production ZAE 1

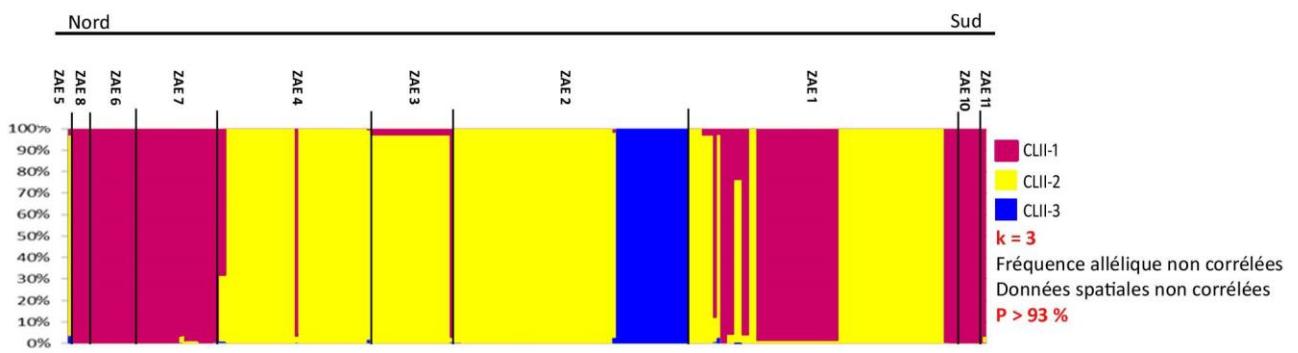


Figure 34 – Représentation de la structure génétique à k populations de la collection de souches IIB-1 (CMG-II) isolée dans les principaux bassins de production de pomme de terre (10 ZAEs). Le graphique est construit à partir des probabilités d'appartenance aux populations $Prob$ générées par le logiciel Geneland. Chaque couleur représente une population et la couleur des haplotypes individuels représente la probabilité d'appartenance $Prob$ à différentes populations. Les traits verticaux de couleur noire marquent la délimitation de chaque ZAE. La collection CMG-II est structurée en 3 populations bien distinctes avec $Prob > 0.99$, assignement obtenu sous un modèle de fréquence allélique et données spatiales non corrélées.

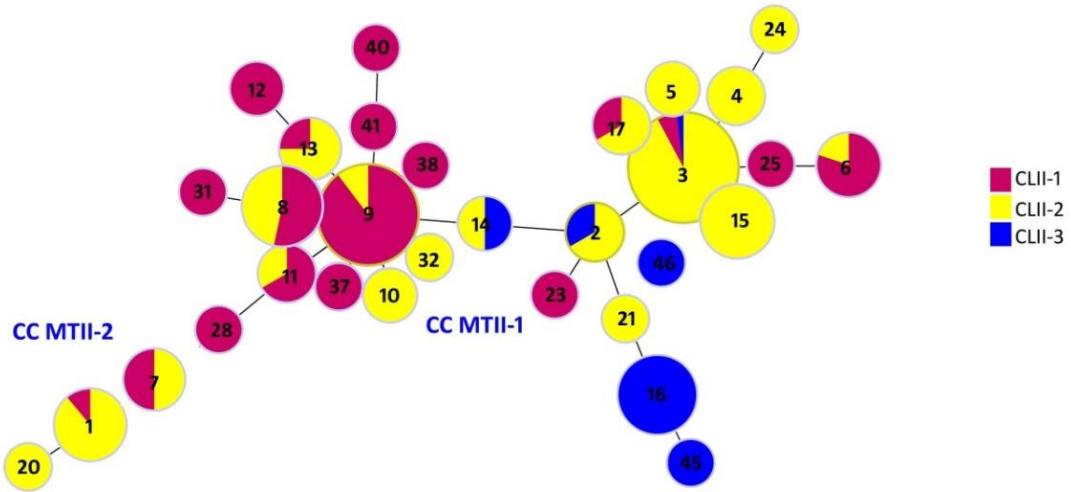


Figure 35 – Représentation de la répartition des 3 populations sur l'ACM2.

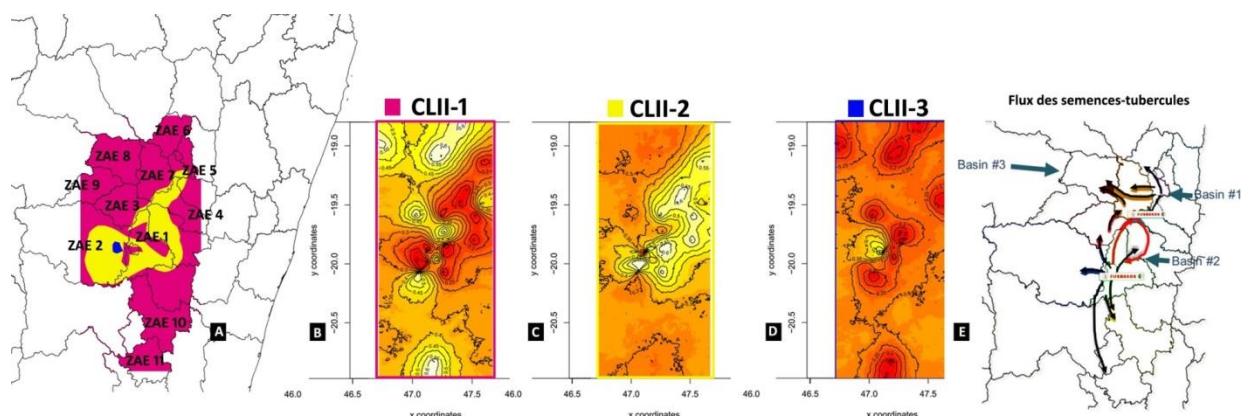


Figure 36 – Inférence de la structure génétique des populations des souches ceRs Brown rot (IIB-1) dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches sur la base des données RS2-MLVA9. (A) Répartition spatiale des 3 populations proposées par Geneland. (B, C, D) Les graphiques montrent la probabilité *à posteriori* de chaque pixel de la zone étudiée d'appartenir à une des trois populations CLII-1, CLII-2 et CLII-3. Le gradient de couleur va du blanc, jaune, jaune orangé vers le rouge exprime une plus forte à plus faible probabilité d'appartenance à une population (E) Illustration montrant la circulation des tubercules semences dans les bassins.

(ZAE 6, ZAE 7, ZAE 8, ZAE 10, ZAE 11) ; tandis que la population CLII-2 est plus centrée dans la partie centrale (ZAE 1, ZAE 2, ZAE 3, ZAE 4, ZAE 5). A partir de la structure spatiale de ces populations, on supposerait que le lot de tubercules semences infectées par les souches de la population CLII-1 serait plus ancien à celui infecté par les souches de la population CLII-2. En effet, les ZAEs situées dans la partie centrale sont plus proches des zones de multiplication de tubercules semences et ont la possibilité de renouveler leurs tubercules semences à chaque saison de culture. Ce qui expliquerait la prépondérance de la population CLII-2 dans ces zones. Notons au passage que dans la partie centrale, les ZAE 4 et ZAE 5 sont également des grands producteurs pomme de terre et de tubercules-semences, la ZAE 5 : 'Andramasina' étant le deuxième bassin de production de pomme de terre des Hauts Plateaux centrales. En outre la région 'Itasy' (troisième bassin de production où se situent les ZAE 7, ZAE 8 et ZAE 9 et colonisé par la population CL-I), pratique l'autoproduction en tubercules semences dans la zone de 'Manalalondo' (ZAE7). Pour la population CLII-3, soit elle dérive de l'une ou des deux populations qui se sont adaptées localement et que nous avons peu échantillonnées, soit elle provient d'une introduction de lot de pommes de terre infectées par les souches de cette population qui s'est établie localement.

Ainsi, le mécanisme de dispersion des souches 'Brown rot' se fait essentiellement par le biais de tubercules semences infectées. En outre, la présence de ces souches dans l'eau d'irrigation suppose la possibilité d'une contamination de parcelle en parcelle.

POPULATIONS ENDEMIQUES DIVERSIFIEES ET COMPLEXES DE SOUCHES MALGACHES DE L'ECOTYPE AFRICAIN PHYLOTYPE III

Diversité génétique des souches de phylotypes III

L'analyse du polymorphisme génétique des séquences partielles de gènes individuels et des séquences concaténées a été réalisée au sein d'une collection de 144 souches de phylotype III (C144) isolées dans les ZAEs localisées dans les bassins de production de pomme de terre (142 souches isolées en 2013 + 2 souches de référence isolées en 1997 et en 2006, (**Annexe 1**). Dans l'ensemble, les loci sont polymorphes ($P = 86\%$) exceptés le locus *leuS* qui ne présente pas de variations nucléotidiques. Le locus *egl* montre le plus de polymorphisme avec 23 sites polymorphes et une diversité nucléotidique $\pi = 0.015$. La variabilité élevée est sûrement liée à son implication dans les mécanismes de virulence. En revanche, le locus *leuS* semble être très conservé, n'évoluant pas au même rythme que les autres loci. La méthode MLSA/MLST indique une diversité importante dans la collection C144 avec un total de 15 haplotypes identifiés (Hd ou $H_E = 0.73$, $A = 2.3$, $P = 86\%$), le pouvoir de discrimination de la méthode étant de 0.73. Les indices de diversité Hd , π , Hap , S , $G+C$ et A pour chaque locus et sur l'ensemble des loci calculés par la méthode MLSA/MLST sont présentés dans le **Tableau 7** et les différents profils alléliques générés par la méthode MLST sont donnés en **Annexe 1**.

Les relations d'apparentement des séquences de gènes dans la collection C144 sont représentées sur des arbres individuels de locus et d'un concaténat de séquences. En effet, bien qu'un arbre de séquences concaténées est suggéré comme étant une représentation la plus robuste des relations phylogénétiques (Hanage *et al.* 2006), une analyse des caractères individuels de chaque locus permet de détecter parmi les sept loci celui ou ceux qui présentent un signal non phylogénétique permettant de déceler des probables événements de recombinaison ou d'homoplasie. Pour la construction de chacun des arbres ML des loci '*gdhA*', '*gyrB*', '*rplB*', '*adK*', '*mutS*' et '*egl*' (et BioNJ non représenté dans le manuscrit), le modèle de substitution proposé par JModelTest v.2.1.9 et la fonction 'Models' du logiciel MEGA v.7.0.18 est le

Tableau 7 – Indices de polymorphisme nucléotidique au niveau des sept loci MLSA/MLST dans un ensemble de 144 souches phylotype III isolées dans les Hauts Plateaux malgaches.

Gènes	Nb. Sites	Hd (H _E)	π	Hap	S	A
<i>gdhA</i>	603	0.50	0.003	3	4	2.13
<i>gyrB</i>	393	0.57	0.003	4	4	2.59
<i>rplB</i>	654	0.59	0.001	5	9	2.80
<i>leuS</i>	723	0.00	0.000	1	0	1.00
<i>adk</i>	468	0.64	0.005	7	19	3.19
<i>mutS</i>	681	0.46	0.001	3	13	2.12
<i>egl</i>	702	0.53	0.016	4	23	2.27
Concaténat	4224	0.73	0.004	15	59	2.3

Hd : Indice de diversité haplotypique, H_E : indice de diversité de Nei, π : Indice de diversité nucléotidique, S : nombre de sites polymorphes, A : richesse allélique.

Tableau 8 – Similarité entre la topologie des arbres phylogénétiques au seuil statistique de 5 %.

	<i>gdhA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rplB</i>	<i>leuS</i>	<i>adK</i>	<i>mutS</i>	<i>egl</i>	Concaténat	Concaténat sans régions recombinantes
Coefficient de corrélation de Mantel	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.96	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.58	0.60	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.71	0.71	0.69	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.75	0.77	0.51	0.57	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.64	0.60	0.48	0.59	0.67	1	9.99e-5	9.99e-5	9.99e-5
	0.82	0.86	0.67	0.72	0.61	0.48	1	9.99e-5	9.99e-5
	0.82	0.85	0.69	0.79	0.69	0.64	0.87	1	9.99e-5
	0.60	0.63	0.68	0.65	0.47	0.35	0.73	0.76	1
Moyenne	0.74	0.75	0.61	0.68	0.63	0.56	0.72	0.76	0.61

modèle d'évolution 'T92+G' (Tamura 1992) qui prend en compte les taux de 'Transitions/Transversions'³¹ et les variations dans le contenu G+C, en incluant les paramètres de distribution gamma (G)³². Le modèle 'TN93' (Tamura & Nei 1993) qui prend en compte les fréquences en bases distinctes et une distinction des transitions (AG) et (CT) a été utilisé sans distribution gamma, pour la construction de l'arbre du locus *leuS*. La construction de l'arbre basé sur les séquences concaténées a utilisé le modèle 'T92+G+I' combinant les modèles G et I qui autorise une fraction de sites invariables (I). Les réarrangements de l'arbre considèrent l'échange entre les plus proches voisins (NNI) et 1000 réplications de bootstrap pour tester la robustesse de l'arbre. Les huit arbres générés ne sont pas complètement congruents. Statistiquement, le signal phylogénétique et la similarité topologique entre les arbres sont en moyenne congruents à 67 % avec un coefficient de concordance de Kendall *W* de 0.70 et statistiquement significatif avec une valeur de *p* inférieure à 0.0001 au seuil de 5 % (10 000 permutations). Parmi les sept marqueurs, les loci *egl*, *gyrB* et *gdhA* présentent une topologie la plus proche de l'arbre de séquences concaténées (*r* = 0.87, 0.85, 0.82) où les branches internes sont soutenues par plus de 95 % des réplications pour l'arbre '*egl*', plus de 60 % pour l'arbre '*gdhA*' et plus de 70 % pour l'arbre '*rplB*'. Les différents coefficients de concordance entre les arbres phylogénétiques sont représentés dans le **Tableau 8** et les arbres phylogénétiques sont représentés sur la **Figure 37**.

L'incongruence entre la topologie et les données de séquences démontre que les séquences ne partagent pas la même histoire évolutive et que des événements de recombinaisons ont pu avoir lieu. L'analyse de la structure de l'arbre des séquences concaténées permet par ailleurs de distinguer 5 groupes génétiques bien distincts dans la collection C144, soutenus par une valeur de bootstrap supérieure à 60 % (**Figure 38**). Lorsqu'on enlève les régions recombinantes détectées, les cinq groupes génétiques sont toujours identifiés sur le nouvel arbre généré mais les nœuds sont moins soutenus pour les nœuds des clusters 1 et 5, tandis que les valeurs de bootstrap des nœuds des clusters 2, 3, 4 restent similaires à l'arbre initial (**Figure 38**). La congruence des deux arbres est de 76 % et avec un coefficient de concordance *W* égale à 0.87 (*p* < 0.0001). Pour les deux arbres, les nœuds profonds sont faiblement résolus qu'il est impossible de résoudre les liens de parenté entre les clusters.

Nous avons démontré plus haut que deux événements de recombinaison (évenement 1 et événement 2) ont été détectés au niveau du locus *egl*. Toutefois, aucun événement de recombinaison n'a été détecté avec le test PHI implémenté dans Splitstree v.4.14.4. et le logiciel RDP v.4.Beta 4.72 au niveau des six autres loci. Les valeurs de *p*-value du test de l'indice PHI est largement supérieure au seuil 0.05, allant de 0.8 pour le locus *adK* à 1 pour les loci *gdhA*, *gyrB*, *rplB*, *leuS* et *mutS*.

Pour l'ensemble des séquences concaténées de la collection C144, La valeur de *p*-value du PHI test inférieure à 0.05 (*p* = 3.7e-12) confirme que des événements de recombinaison pourraient avoir lieu. Les événements de recombinaison concernent en grande partie la portion de gène *egl*. Trois événements de recombinaison ont été détectés avec RDP par plus de 3 méthodes de détection (évenements 1' à 3') et un événement par seulement deux méthodes. L'événement 1' est détecté avec RDP par 6 méthodes (R, G, M, C, S, T) où les haplotypes STIII-38, STIII-39, STIII-42, STIII-43, STIII-45 sont considérés comme des haplotypes recombinants, l'haplotype STIII-22 comme parent majeur et l'haplotype STIII-37. L'événement 2' est détecté avec RDP par 4 méthodes (M, C, S, T) où les haplotypes STIII-34 et STIII-37

³¹ La transition est le remplacement d'une purine par une purine (A ⇌ G) ou d'une pyrimidine par une pyrimidine (C ⇌ T), la transversion est remplacement d'une purine par une ou d'une pyrimidine par une purine

³² La distribution gamma est une loi statistique permettant décrire des distributions en changeant la valeur d'un paramètre α de forme : en L proche de l'exponentielle négative caractérisant une faible hétérogénéité ($\alpha < 1$), en cloche proche de la loi normale caractérisant une forte hétérogénéité ($\alpha > 1$).

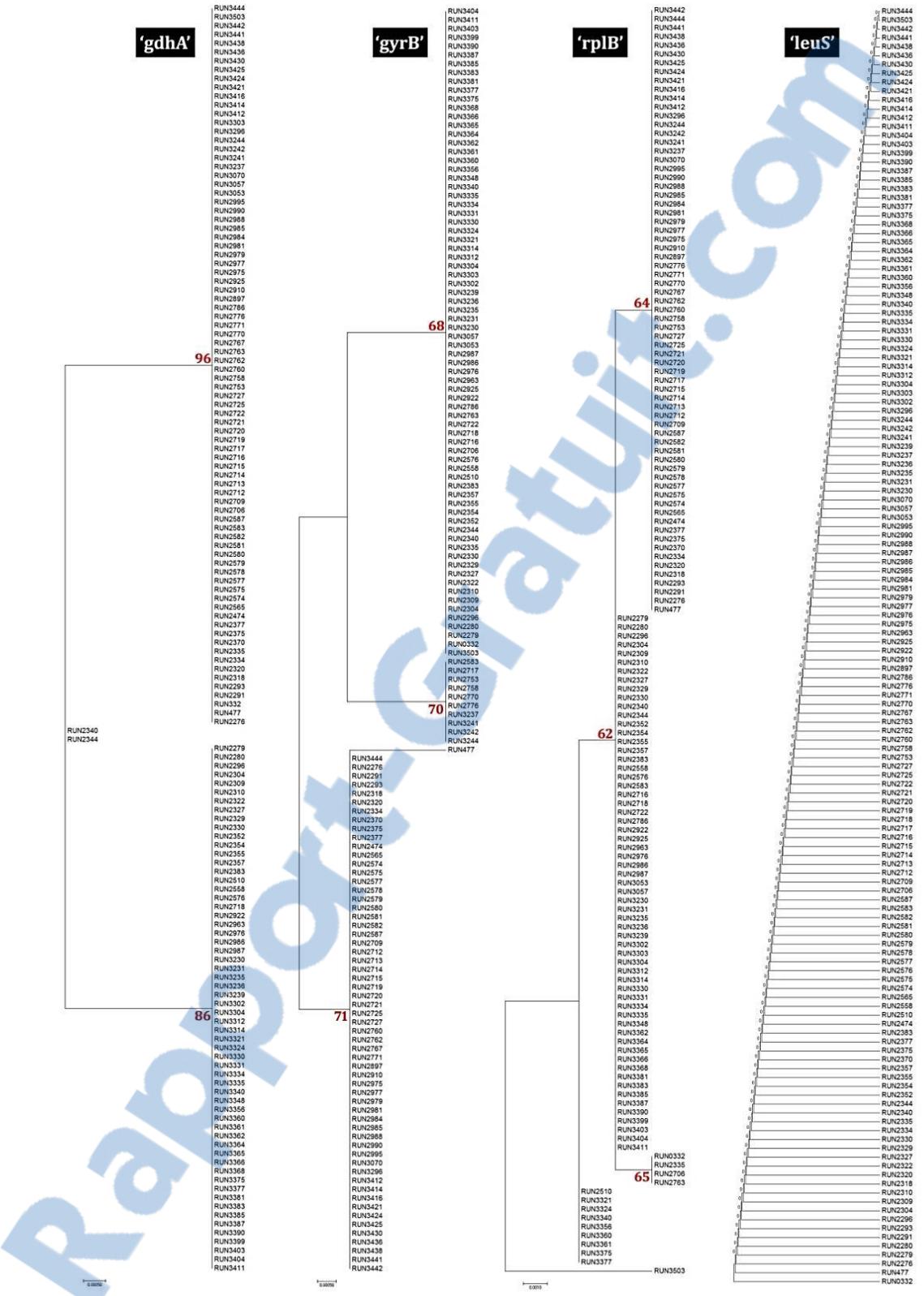
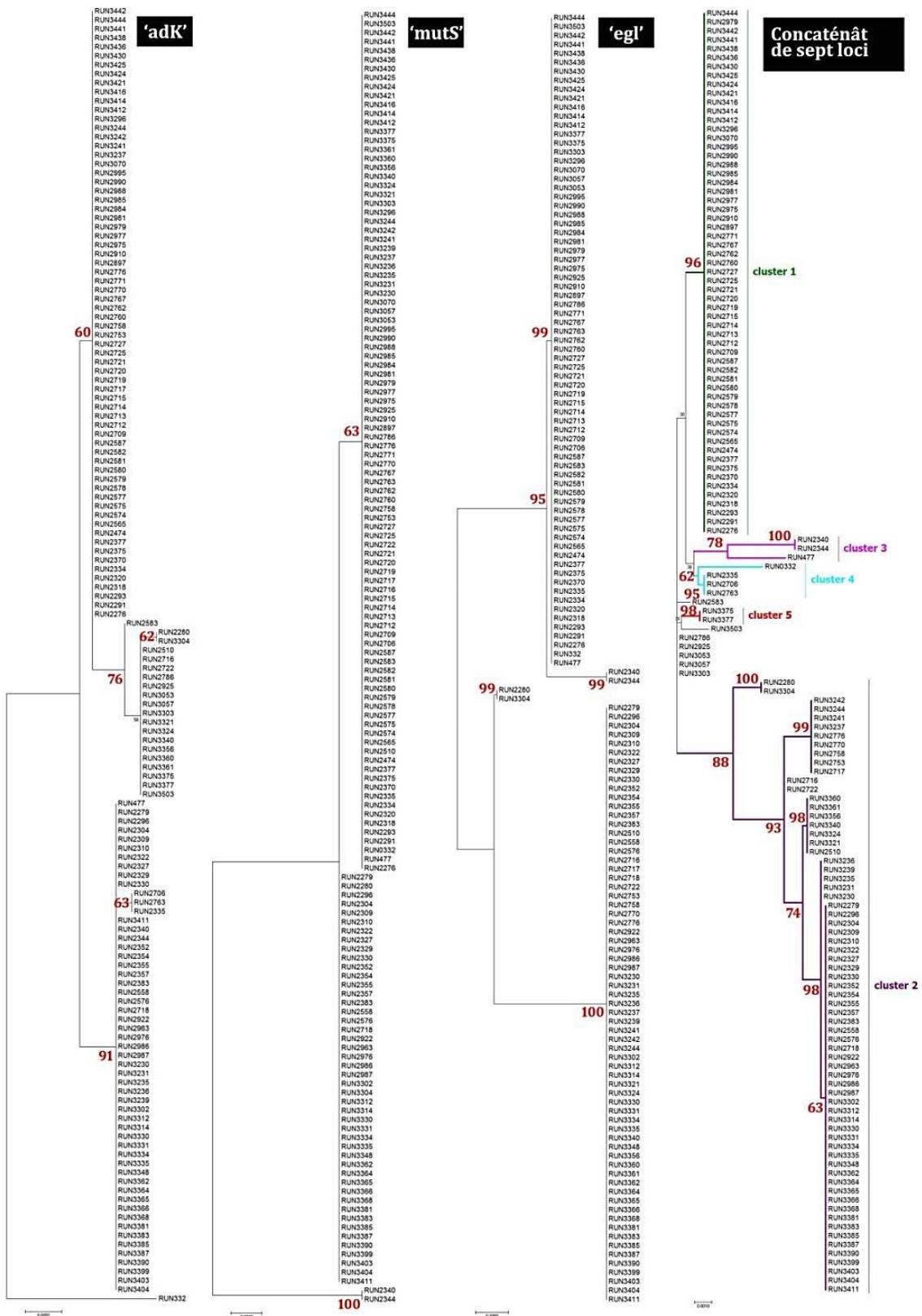


Figure 37 – Arbres phylogénétiques de maximum de vraisemblance basés sur des séquences partielles de sept loci individuels (*gdhA*, *gyrB*, *rplB*, *leuS*, *adK*, *mutS*, *egl*) et de séquences concaténées des sept loci obtenu sous le modèle d'évolution : 'T92+G5' pour '*gdhA*', '*gyrB*', '*rplB*', '*adK*', '*mutS*' et '*egl*' ; 'TN93' pour '*leuS*' et 'T92+G5+I' pour l'arbre des séquences concaténées. Les valeurs de bootstrap plus de 60 % obtenues après 1000 réplications sont indiquées en rouge. Les arbres sont dessinés à l'échelle, avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour inférer chaque arbre phylogénétique. La barre d'échelle représente le nombre de substitution par site. Les analyses évolutives ont été menées dans MEGA7 (Kumar et al. 2016).



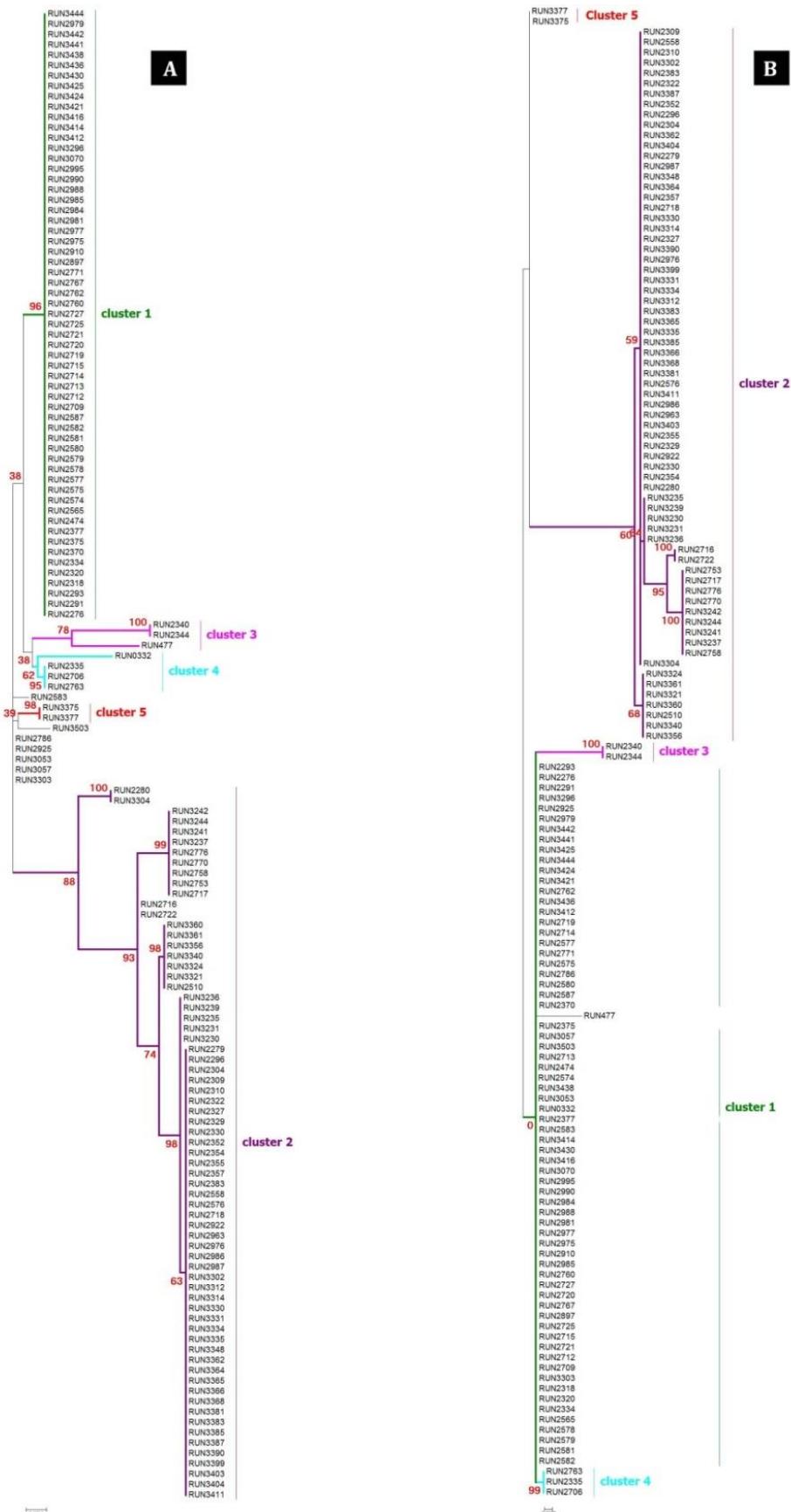


Figure 38 – Comparaison d’arbres phylogénétiques de maximum de vraisemblance basés sur des séquences partielles de sept loci individuels (A) en tenant compte des régions nucléotidiques recombinantes (arbre initial), (B) en enlevant les régions recombinantes. La similarité topologique est de 76 % ($p<0.0001$).

sont supposés être des haplotypes recombinants, l'haplotype STIII-44 comme parent majeur et l'haplotype STIII-33 comme parent mineur. L'événement 3' est détecté avec RDP par 6 méthodes (R, G, M, C, S, T) où l'haplotype STIII-40 est considéré comme recombinant, l'haplotype STIII-33 comme parent majeur et l'haplotype STIII-44 comme parent mineur. Les relations liées à l'évolution des séquences mettant en évidence des transferts horizontaux de gènes possibles sont visualisées dans un réseau phylogénétique représenté sur la **Figure 39**. L'ensemble des souches qui sont soutenus par un nœud présentant une valeur de bootstrap supérieure à 60 % correspond à un cluster. En joignant à ces données les haplotypes identifiés par la méthode MLST, le cluster 1 regroupe les souches ayant l'haplotype STIII-39 ; le cluster 2 regroupe les haplotypes STIII-34, STIII-35, STIII-36, STIII-37, STIII-41, STIII-44 ; le cluster 3 regroupe les haplotypes STIII-33 et STIII-22 ; le cluster 4 est composé des haplotypes STIII-40 et STIII-23 ; et le cluster 5 correspond à l'haplotype STIII-38. Les haplotypes STIII-42, STIII-43 et STIII-45 n'appartiennent à aucun groupe. Chacun pourrait constituer un groupe génétique indépendant mais peu représenté dans la collection de souches du ceRs échantillonnées dans les bassins de production ? Toutefois, au moins 5 groupes génétiques de souches du ceRs sont présents dans les bassins de production.

En joignant les données MLST obtenues à partir de notre premier travail de génotypage de la collection de référence P65 (Ravelomanantsoa *et al.* 2016) avec les données MLST de la collection C144, l'analyse confirme que les haplotypes sont propres à chaque pays. Les relations génétiques entre les haplotypes identifiés dans ces deux collections sont représentées sur l'ACM3 (**Figure 40**). En d'autres termes, les souches de phylotype III malgaches ne partagent aucun haplotype avec les autres pays d'Afrique (**Figure 40A**). Toutefois les haplotypes STIII-24 et STIII-6 identifiés à La Réunion sont génétiquement proches et forment un complexe clonal avec l'haplotype STIII-45 identifié à Madagascar. Aucun événement de recombinaison n'a par ailleurs été détecté impliquant les trois haplotypes. Aussi, l'haplotype STIII-25 (Réunion) est relativement proche, à deux locus variants (DLV) de l'haplotype STIII-45. Cet haplotype est par ailleurs relié à un événement de recombinaison détecté avec RDP où l'haplotype STIII-45 serait un recombinant, le STIII-43 serait le parent majeur et une autre séquence inconnu le parent mineur. Par ailleurs, l'ACM4 montre que l'haplotype STIII-42 fait partie d'un complexe clonal avec les haplotypes STIII-43 et STIII-41 qui pourraient être l'haplotype fondateur ; et également les paires d'haplotype STIII-35 et STIII-36 d'une part, STIII-38 et STIII-37 d'autre part (**Figure 40B**). Le reste des haplotypes sont distants génétiquement par deux loci. En résumant ces séries de relations génétiques, d'un côté on aurait une circulation de longue distance de populations de souches de phylotype III entre Réunion et Madagascar, et d'un autre côté, des populations de souches qui divergent par transfert horizontal et évoluent ensuite par expansion clonale dans les différentes ZAEs. Le pouvoir de résolution supérieur du génotypage MLST par rapport à l'assignement en sequevars avec le génotypage de séquence partielle du gène *egl* est visualisé sur la **Figure 40C**.

Pour comprendre l'épidémiologie des souches de phylotype III à l'échelle des bassins de production, une collection de 217 souches du phylotype III (CMG-III) (dont 215 souches sont isolées de 9 ZAEs : C3-ZAE1 ($n = 68$), C3-ZAE2 ($n = 2$), C3-ZAE3 ($n = 32$), C3-ZAE4 ($n = 18$), C3-ZAE 7 ($n = 17$), C3-ZAE 8 ($n = 9$), C3-ZAE10 ($n = 8$), C3-ZAE11 ($n = 21$), C3-ZAE12 ($n = 1$) en 2013 et 2 souches malgaches de référence isolées en 1997 et en 2006) sont génotypées en utilisant le schéma RS3-MLVA16 (Ravelomanantsoa *et al.* 2016). Dans l'ensemble, les loci sont polymorphes ($P = 81\%$). Les loci qui présentent les plus de variations alléliques sont RS3L33 et RS3L17 (respectivement $H_E = 0.90$ et 0.86 , $A = 6.81$ et 5.72). Cependant, trois loci (RS3L28, RS3L31, RS1L05) ne présentent pas de polymorphisme dans la collection CMG-III. La collection de souches CMG-III est génétiquement diverse. RS3-MLVA16 révèle un total de 117 haplotypes ($H_E = 0.40$, $A = 2.96$, $P = 81\%$) avec un pouvoir de résolution égale à

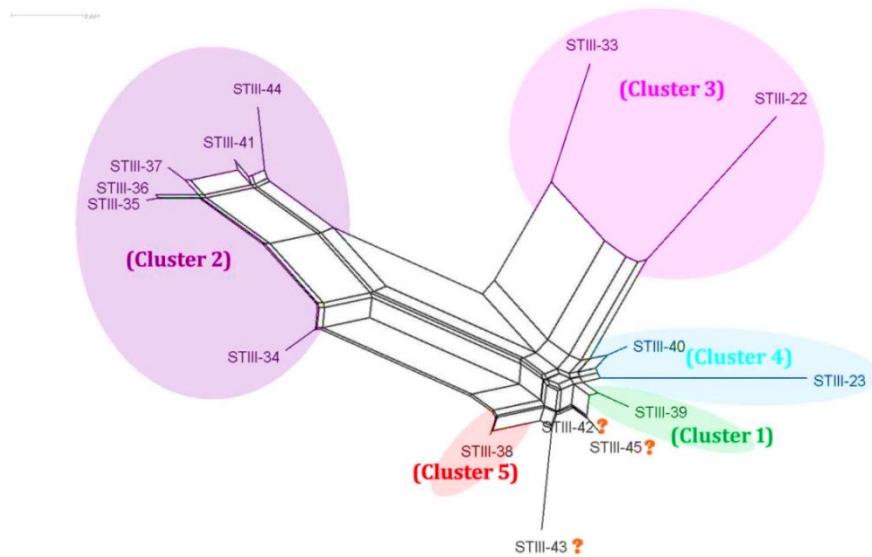


Figure 39 – Réseau phylogénétique des séquences concaténées des sept gènes dans la collection C144 de souches de phylotype III montrant les différents choix possibles de relations évolutives des groupes génétiques et haplotypes et mettant en évidence de possibles échanges de matériaux génétiques entre haplotypes par des branches qui se rejoignent pour former une surface réticulée.

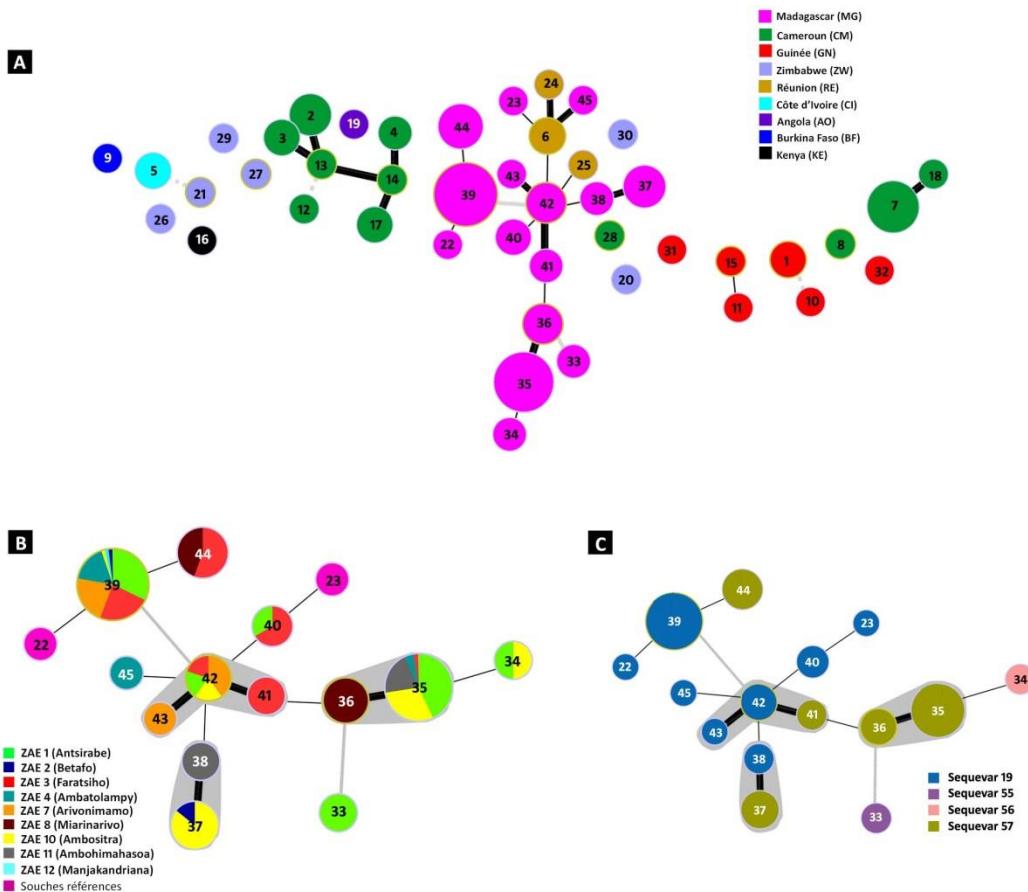


Figure 40 – Arbres couvrant minimums obtenus à partir des données de génotypage MLST (7 loci). Chaque cercle représente un haplotype (STIII) unique défini par un nombre à l'intérieur du cercle ; la taille est proportionnelle au nombre de souches. Les couleurs correspondent (A) dans l'ACM3, aux pays où les souches ont été échantillonnées ($n = 207$) ; (B) dans l'ACM4, aux ZAEs ($n = 144$) ; et (C) à l'assignation en sequevars. Un trait épais reliant deux cercles correspond à un SLV et un trait plus fin correspond à un DLV, un trait de couleur gris correspond à un 3 locus variants (LV) et un trait en pointillé correspond à un 4LV. Un complexe clonal est entouré d'un halo de couleur grise.

0.98. A l'évidence, le génotypage RS3-MLVA16 est plus discriminatif que le génotypage MLSA/MLST. Le polymorphisme génétique des 16 loci est présenté au **Tableau 9**, et les différents profils alléliques des souches étudiées générés par la méthode MLVA sont donnés en **Annexe 1**.

En outre, pour situer les haplotypes des souches malgaches et évaluer leur relation avec les autres souches de l'écotype africain, une analyse supplémentaire a été réalisée en combinant les données génétiques de la collection CMG-III avec celles de la collection P65 (Ravelomanantsoa *et al.* 2016) qui est une collection de souches de référence phylotype III isolées de différents pays Africains et de l'île de la Réunion. Les relations génétiques sont présentées sur les arbres ACM5 et ACM6 (**Figure 41**). Comme observée dans l'analyse MLST, aucun haplotype n'est partagé entre Madagascar et les pays du continent Africain plus l'île de la Réunion. Par ailleurs, la clonalité des haplotypes identifiés à la Réunion et des haplotypes identifiés à Madagascar est confirmée par le génotypage RS3-MLVA16. En effet, les haplotypes MTIII-9 (isolé de pomme de terre en 1993) et MTIII-48 (isolé de *Pelargonium* en 1980) correspondant à STIII-6 et l'haplotype MTIII-72 (STIII-42 isolé de pomme de terre en 2013) forment un complexe clonal qui indiquerait que ces souches sont épidémiologiquement liées. Sous réserve d'homoplasie à la fois des marqueurs MLSA/MLST et des TRs, on pourrait supposer que la dispersion longue distance de ces souches s'est probablement faite à l'origine par échange de matériels végétaux infectés et la conservation dans le temps dans une même localité pourrait être liée à des modes de conservation de l'inoculum primaire sur les débris végétaux, plantes hôtes réservoirs dans le sol, etc.

Au total 11 complexes clonaux (CC) sont identifiés dans la collection CMG-III dont deux complexes CC MTIII-1 et CC MTIII-2 majoritairement représentés. Les CC distants entre eux par 4LV, présentent généralement une structure est en étoile suggérant que chaque haplotype dérive d'un haplotype ancestral (fondateur) par mutation, et évoluent de façon sporadique au sein de chaque ZAE pour former une population. Les complexes CC MTIII-1 et CC MTIII-2 rassemblent des populations qui forment des sous-complexes clonaux composés de souches génétiquement liés évoluant par expansion clonale probablement par l'adaptation de mutant à sa nouvelle niche écologique après son implantation. D'après l'analyse de l'ACM6, les ZAE 1, ZAE 3, ZAE 4, ZAE 7 et ZAE 10 sont colonisées par plus d'un complexe clonal de souches distant chacun de plus de 2LV ; et les ZAE 2, ZAE 8, ZAE 11 sont colonisées par des haplotypes évoluant au sein de chaque zone par expansion clonale (sauf la ZAE 12 qui ne compte qu'un haplotype identifié car nous n'avons pu échantillonner qu'une seule souche). En outre, il est à noter que chaque ZAE contient des haplotypes singltons qui sont très distants des CC. En moyenne ils diffèrent par plus de 4 loci et le niveau de liaisons le plus éloigné arrive jusqu'à 9LV. Une analyse plus poussée a montré qu'au niveau des parcelles de culture (P3-Z1, P3-Z3, P3-Z4, P3-Z7, P3-Z10, P3-Z11), la population de souches est diversifiée avec une proportion d'haplotypes singltons isolées des plants de pomme de terre symptomatiques assez élevée et distants des autres haplotypes de plus de 4LV, preuve probable de la persistance des souches dans le sol au travers d'hôtes réservoirs ou de contamination mécanique. La diversité génétique des souches et le niveau de liaison existant au sein de chaque ZAE sont résumés au **Tableau 10**.

Les collections de souches de phylotype III isolées dans les ZAEs sont diversifiées et présentent une diversité assez similaires (moyenne des H_E = 0.33) sauf pour la ZAE 11 qui semble être constituée majoritairement d'haplotypes ayant le même profil allélique (ou clones) probablement dû à une dispersion clonale de souches. Les collections de souches issues des ZAEs sont relativement différenciées entre elles ($F_{ST} = 0.24$, $R_{ST} = 0.46$) et la majeure partie de la variation se situe au sein de chaque collection (coefficient de variation $F_{ST} = 76\%$; coefficient de variation $R_{ST} = 54\%$) (**Figure 42**). Dans l'ensemble, un fort déséquilibre de liaison est mis en évidence entre les 13 loci polymorphes au sein de chaque ZAE.

Tableau 9 – Indices de polymorphisme des 16 loci constitutifs du schéma RS3-MLVA16 mesurés dans la collection CMG-III.

Loci	Plage de taille allélique	Na	A	H_E
RS3L27	6-13	8	3.04	0.44
RS3L28	3	1	1.00	0.00
RS3L29	2-3	2	1.65	0.18
RS3L17	6-14, 17-18, 21-23, 25	16	5.72	0.86
RS3L19	4-8, 11, 14, 15	8	3.19	0.63
RS3L30	3-11, 15, 17-34	26	5.45	0.80
RS3L31	2	1	1.00	0.00
RS3L32	2-3	2	1.17	0.04
RS3L33	12-13, 15-16, 18-31, 34, 45, 55-59	25	6.81	0.90
RS3L34	6-9	4	2.41	0.42
RS1L05	3	1	1.00	0.00
RS3L35	5, 7	2	1.71	0.20
RS3L36	2, 3, 4-7, 10-13	10	2.59	0.35
RS1L10	3-5	3	1.94	0.33
RS3L37	2-9, 12, 14-18, 20-21	16	4.52	0.75
RS1L12	6, 8-16	10	4.21	0.67
<hr/>				
Nombre de souches				217
Pourcentage de loci polymorphes (%)				81.25
Moyenne de la richesse allélique				2.96
Moyenne de l'indice de diversité de Nei				0.41
Pouvoir de discrimination (HGDI)				0.98
Nombre d'haplotypes				117
Nombre de singltons				37
<hr/>				

Na : nombre d'allèles, A : richesse allélique, H_E : indice de diversité de Nei.

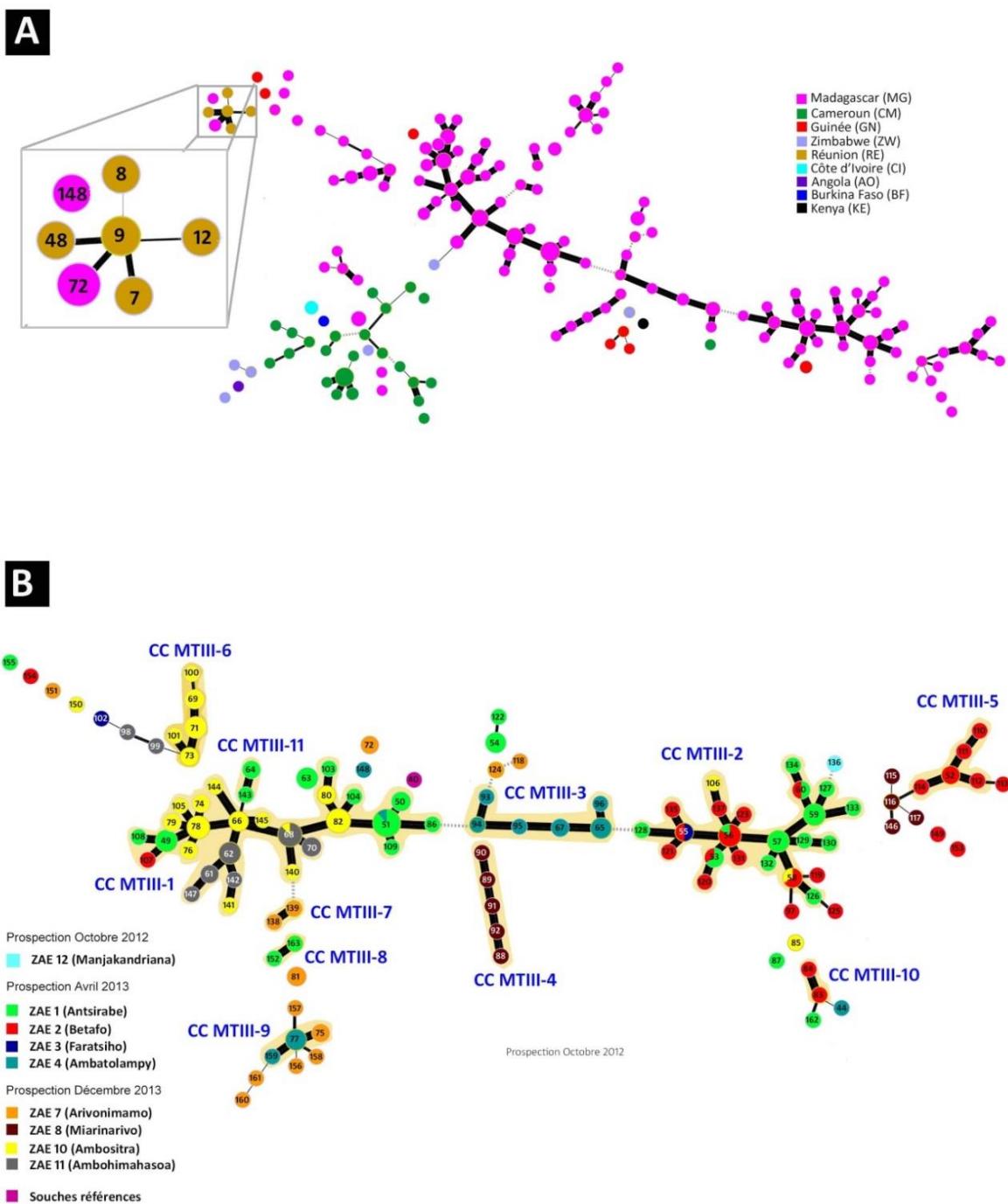


Figure 41 – Arbres couvrant minimums obtenus à partir des données de génotypage RS3-MLVA16 (16 loci). Chaque cercle représente un haplotype (STIII) unique défini par un nombre à l'intérieur du cercle ; la taille est proportionnelle au nombre de souches. Les couleurs correspondent (A) dans l'ACM5, aux pays où les souches ont été échantillonnées ($n = 280$) ; (B) dans l'ACM6, aux ZAEs ($n = 217$). Un trait épais reliant deux cercles correspond à un SLV et un trait plus fin correspond à un DLV, un trait de couleur gris correspond à un 3 locus variants (LV) et un trait en pointillé correspond à un 4LV. Un complexe clonal est entouré d'un halo de couleur orange.

Distance method: No. of different alleles (FST)

AMOVA design and results :

Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.
Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.
Weir, B. S., 1996.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
<hr/>				
Among populations	8	160.815	0.80865 Va	23.73
Within populations	206	535.460	2.59932 Vb	76.27
Total	214	696.274	3.40797	
Fixation Index FST :		0.23728		
<hr/>				

Significance tests (10100 permutations)

Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
P(rand. value = obs. value) = 0.00000
P-value = 0.00000+-0.00000

Population pairwise FSTs

ZAE 1	ZAE 11	ZAE 10	ZAE 4	ZAE 7	ZAE 2	ZAE 3	ZAE 8	ZAE 12
ZAE 1 0.00000								
ZAE 11 0.17740 0.00000								
ZAE 10 0.11226 0.15133 0.00000								
ZAE 4 0.22052 0.45443 0.34738 0.00000								
ZAE 7 0.22655 0.42109 0.33053 0.11546 0.00000								
ZAE 2 0.16206 0.59840 0.29308 0.28314 0.20683 0.00000								
ZAE 3 0.14020 0.41032 0.31578 0.27466 0.23565 0.05221 0.00000								
ZAE 8 0.25016 0.48581 0.36865 0.29085 0.23851 0.12621 0.20958 0.00000								
ZAE 12 0.23297 0.70575 0.45034 0.26376 0.12302 -0.33333 0.06325 0.20946 0.00000								

Matrix of significant Fst P values
Significance Level=0.0500

Number of permutations : 110

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 + + + + - + + -	2 + + + + + + + -	3 + + + + + + + -	4 + + + + - + + -	5 + + + + + + + -	6 - + + - + - - -	7 + + + + + + + -	8 + + + + + + + -	9 - - - - - - - -

Distance method: No. of different alleles (FST)

AMOVA design and results :

Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.
Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.
Weir, B. S., 1996.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
<hr/>				
Among populations	8	616769.316	3377.21289 Va	45.78
Within populations	206	823822.908	3999.14033 Vb	54.22
Total	214	1440592.223	7376.35322	
Fixation Index FST :		0.45784		
<hr/>				

Significance tests (10100 permutations)

Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
P(rand. value = obs. value) = 0.00000
P-value = 0.00000+-0.00000

Population pairwise FSTs

ZAE 1	ZAE 11	ZAE 10	ZAE 4	ZAE 7	ZAE 2	ZAE 3	ZAE 8	ZAE 12
ZAE 1 0.00000								
ZAE 11 0.13149 0.00000								
ZAE 10 0.10195 0.04223 0.00000								
ZAE 4 0.49082 0.40396 0.54070 0.00000								
ZAE 7 0.75066 0.65670 0.76672 0.19379 0.00000								
ZAE 2 -0.18884 0.25163 0.03124 0.08527 0.42213 0.00000								
ZAE 3 0.05006 0.13773 0.16777 0.33782 0.61337 -0.18243 0.00000								
ZAE 8 0.29286 0.48265 0.52083 0.16164 0.44077 0.30181 0.12246 0.00000								
ZAE 12 0.61426 0.92461 0.89601 0.05054 0.19811 0.88830 0.32216 0.70668 0.00000								

Matrix of significant Fst P values
Significance Level=0.0500

Number of permutations : 110

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 + + + + + + + -	2 + + + + + + + -	3 + - + + + + + -	4 + + + + + + + -	5 + + + + + + + -	6 - + + - + - - -	7 + + + + + + + -	8 + + + + + + + -	9 - - - - - - - -

Figure 42 – Résultats de l'analyse de variance moléculaire et différenciation génétique intra et inter-collections. Les collections sont différencierées entre elles avec une importante diversité exprimée au sein de chaque collection. Les valeurs de F_{ST} et R_{ST} pour les collections ZAE 2 et ZAE 12 ne sont pas significatives à cause de leur faible effectif.

Tableau 10 – Indices de diversité génétique, niveau de liaison entre haplotypes au sein de chaque ZAE et au niveau de la parcelle.

Indices de diversité										Niveau de liaison									
Collection	N	P (%)	Na	A	Hap	H_E	Sing	CC	LV	SLV	DLV	3LV	4LV	5LV	6LV	7LV	8LV	9LV	Total
C3-ZAE1	68	81.25	4.56	2.45	31	0.35	7 (10%)	5	9	11+5+1+1+1=19 (33%)	3	1	2	1	2	1	1	58	
C3-ZAE3	32	81.25	4.31	1.63	21	0.37	8 (25%)	4	9	8+4+1+1=14 (56%)	5		1	1	2	1	1	25	
C3-ZAE4	18	56.25	2.56	1.78	9	0.32	2 (11%)	2	8	5+1=6 (60%)			1		1	1		9	
C3-ZAE7	17	56.25	3.94	2.14	13	0.41	11 (65%)	1	8	1 (8%)		1	4	1	1	2	1	1	12
C3-ZAE8	9	68.75	2.19	2.66	9	0.41	4 (44%)	1	9	4 (44%)		1	2				1	8	
C3-ZAE10	47	75.00	3.13	3.04	21	0.29	5 (11%)	2	8	12+3=15 (71%)		1	1	2		1	1	21	
C3-ZAE11	21	62.50	1.94	2.41	8	0.15	2 (10%)	1	8	5 (71%)		1				1		7	
Parcelle																			
P3-Z1	11	75.00	2.4	2.09	9	0.3	1 (9 %)	3	8	3+1+1=5 (63%)		1		1	1	1	1	8	
PE-Z3	16	75.00	3.4	2.64	14	0.4	8 (50%)	1	9	5 (39%)		1	2	1	1	2	1	1	13
P3-Z4	14	56.25	2.5	2.12	9	0.30	3 (21%)	1	8	5 (63%)				1	1	1	1	8	
P3-Z7	12	50.00	2.8	2.41	9	0.3	7 (58%)	1	6	1 (13%)		1	3	1	2			8	
P3-Z10	11	50.00	1.6	1.5	5	0.2	1 (9%)	1	6	3 (75%)				1				4	
P3-Z11	11	18.75	1.3	1.25	6	0.1	0 (%)	1	1	5 (100%)								5	

Seules les collections qui ont un effectif d'échantillons supérieur ou égal à 9 ont été analysées statistiquement. *N*: nombre de souches, *P*: pourcentage de loci polymorphes, *Na*: nombre d'allèles, *A*: richesse allélique, *Hap*: nombre d'haplotype, H_E : indice de diversité de Nei, *Sing*: nombre de singltons, *CC*: nombre de complexes clonaux, *LV*: niveau de liaison, *nLV*: *n* locus variant, *P3-Zx*: parcelle de culture localisé dans la ZAE x.

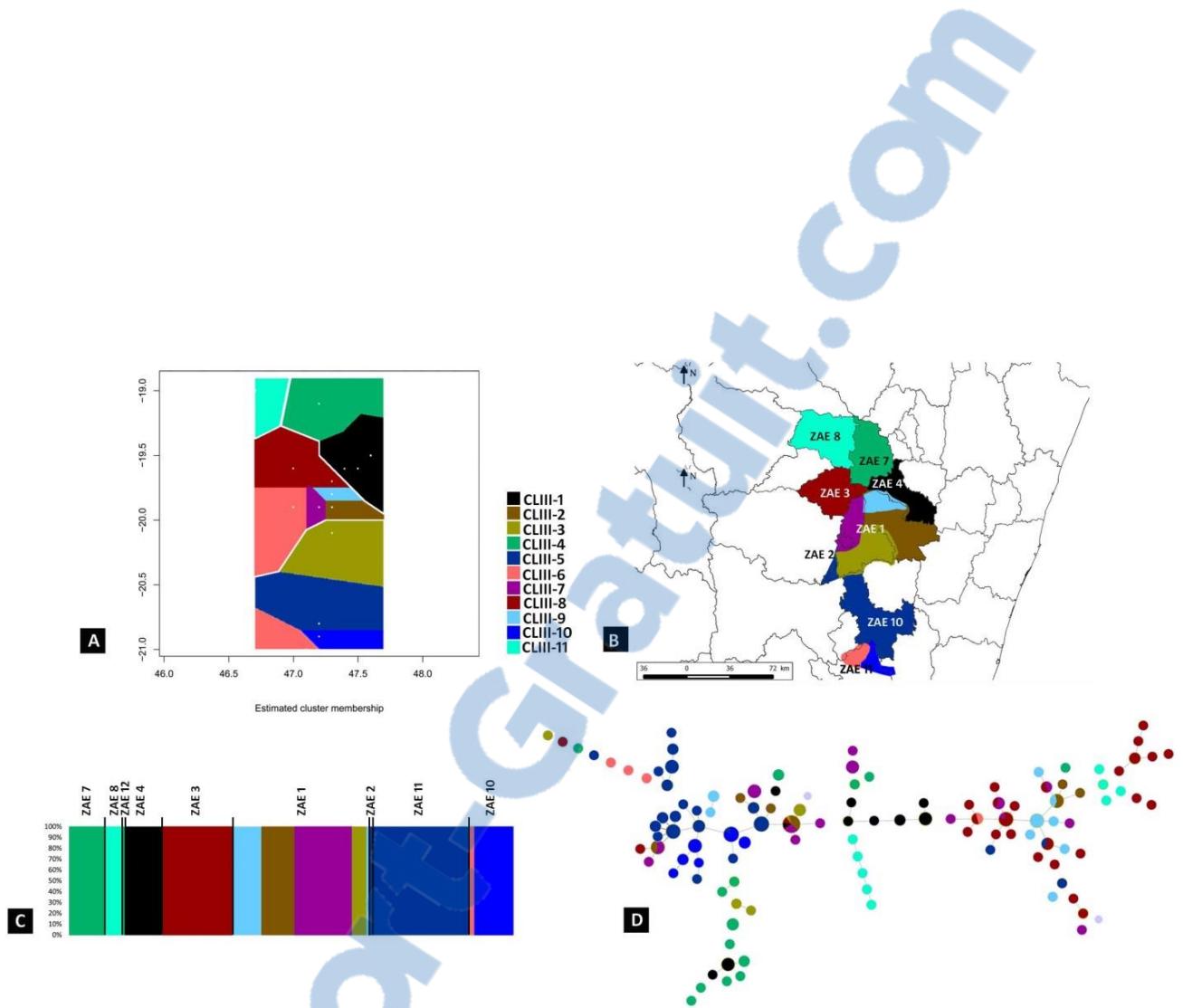


Figure 43 – Inférence de la structure génétique des populations des souches ceRs phylotype III dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches sur la base des données RS3-MLVA16. (A) Répartition spatiale des 11 populations. (B) Projection des polygones sur une carte géographique. (C) Représentation de la structure génétique à 11 populations bien distinctes ($\text{Prob} > 0.99$) de la collection de souches ceRs phylotype III (CMG-III) isolée dans 8 ZAEs des bassins de production de pomme de terre. Le graphique est construit à partir des probabilités d'appartenance aux populations Prob générées par le logiciel Geneland. Chaque couleur représente une population et la couleur des haplotypes individuels représente la probabilité d'appartenance Prob à différentes populations. Les traits verticaux de couleur noir marquent la délimitation de chaque ZAE. L'assignement obtenu avec l'option ‘fréquence allélique corrélée’ et ‘données spatiales non corrélées’. (D) Représentation des populations sur l'ACM6.

Tableau 11 – Indices de diversité génétique et degré de déséquilibre de liaison des loci au niveau de chaque population.

Population	N	P (%)	Na	A	Hap	H_E	Combinaison polymorphes	Nb. Loci	% DL	ZAE
CLIII-1	18	56%	2.56	1.41	10	0.32	36	9	75	ZAE 4
CLIII-2	16	50%	1.69	1.41	7	0.21	28	8	68	ZAE 1
CLIII-3	7	63%	2.19	1.31	5	0.36	45	10	33	ZAE 3
CLIII-4	18	63%	4.06	1.21	14	0.41	45	10	69	ZAE 7
CLIII-5	49	75%	3.19	1.36	24	0.30	66	12	67	ZAE 10 + ZAE 2
CLIII-6	2	13%	1.13	1.39	2	0.13	45	2	0	ZAE 11
CLIII-7	28	75%	3.25	1.26	14	0.39	66	12	77	ZAE 1
CLIII-8	34	81%	4.38	1.38	27	0.38	78	13	72	ZAE 3 + ZAE 1
CLIII-9	15	63%	2.19	1.29	9	0.26	45	10	49	ZAE 1
CLIII-10	19	19%	1.31	1.07	6	0.07	3	3	0	ZAE 11
CLIII-11	9	69%	2.19	1.38	9	0.41	55	11	69	ZAE 7

N: nombre de souches, *P*: pourcentage de loci polymorphes, *Na*: nombre d'allèles, *A*: richesse allélique, *Hap*: nombre d'haplotypes, H_E : indice de diversité de Nei, %DL: pourcentage de combinaisons significatives.

Un total de 74 % de combinaisons alléliques sont significatives sur les 394 combinaisons testées dans l'ensemble des 7 collections de souches provenant des ZAE 1, ZAE 3, ZAE 4, ZAE 8, ZAE 10, ZAE 11 ($p < 0.05$), ce qui suggèrerait que les loci TR évoluent en majorité sans recombinaison génétique et qu'on a une structure clonale des populations au niveau de chaque ZAE modulée par des événements mutationnels, et/ou que la dispersion se fait à très faible échelle (différenciation entre parcelles au sein des ZAE ou entre zones au sein des parcelles). Par ailleurs sur un modèle d'évolution SMM des loci, une faible différenciation génétique est significativement détectée entre les collections C3-ZAE 1 et C3-ZAE 3 ($R_{ST} = 0.05$, p -value < 0.05) suggérant qu'il existerait une migration des souches d'une population à l'autre.

Structure génétique et organisation spatiale des populations des souches de phylotype III

Les hypothèses énoncées précédemment sont testées en identifiant les entités génétiques probables formant chacune une population avec le logiciel Geneland à partir des données RS3-MLVA16. Nous avons choisi d'utiliser le modèle spatialement explicite avec l'option 'fréquence allélique corrélée'. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence 11 populations bien distinctes dans la collection CMG-III (**Figure 43**). Les probabilités d'appartenance de tous les individus aux différentes populations ont été élevées (égale à 1). Les populations sont organisées dans l'espace et différenciées généralement selon les zones d'échantillonnage. La population CLIII-1 se retrouve dans la ZAE 4 ; les populations CLIII-2, CLIII-7, CLIII-9, CLIII-3 sont concentrées dans la ZAE 1 mais avec des délimitations géographiques bien nettes ; la population CLIII-4 dans la ZAE 7 ; la population CLIII-5 colonise la ZAE 10, plus deux souches de la ZAE 2 sont incluses dans cette population ; les populations CLIII-6 et CL10 se retrouvent dans la ZAE 11, CLIII-8 est présent dans la ZAE 3, plus deux souches de la ZAE 1 sont incluses dans cette population ; et la population CLIII-11 se retrouve dans la ZAE 8. Les 11 populations sont génétiquement différenciées les unes par rapport aux autres ($F_{ST} = 0.26$ / $R_{ST} = 0.43$) (**Figure 44**). La diversité génétique de la collection CMG-III est exprimée au sein des populations (coefficient de variation $F_{ST} = 74\%$; coefficient de variation $R_{ST} = 56\%$) qui présente un importante déséquilibre de liaison sauf pour les populations CLIII-6 et CLIII-10 colonisant la ZAE11 où tous les loci polymorphes sont faiblement liés confirmant ainsi une dispersion clonale des souches entre parcelles. Par ailleurs, la valeur de F_{ST} entre les populations CLIII-2 vs CLIII-7 et la valeur de R_{ST} entre les populations CLIII-2 vs CLIII-7 et CLIII-5 vs CLIII-10 sont très faibles suggérant un flux de gènes entre chaque paire de populations. En effet ces populations sont géographiquement voisines.

En combinant avec l'analyse MLST, les 11 populations présentent un important déséquilibre de liaison au niveau des loci MLST. Les analyses des tests de recombinaison et de neutralité pour chaque population supposent un excès d'allèles de fréquence intermédiaire (valeur de Fs de Fu positives) qui serait dû à une sélection équilibrante. La valeur D de Tajima positive chez les populations CLIII-2 et CLIII-3 ($D = 1.87$, $p < 0.05$) indiquerait une présence de mutations en fréquences intermédiaires par maintien d'allèles avantageux ancestraux ou l'effet d'un goulot d'étranglement des populations. La valeur D est en outre négative chez les populations CLIII-8 et CLIII-9 (respectivement, $D = -1.98$ et -1.51 , $p < 0.05$) qui exprimerait une accumulation de mutations, signe d'expansion récente des populations. Chez le reste des populations les résultats n'étaient pas statistiquement significatifs. Par ailleurs, en croisant les données MLVA aux données MLST, les événements de recombinaison et les indices de différenciation des populations, les populations CLIII-1, CLIII-4, CLIII-5, CLIII-6, CLIII-10 et CLIII-11 sont également des populations issues chacune d'haplotypes recombinants anciens qui ont évolué chacune localement. Ces haplotypes fondateurs ancestraux sont les haplotypes qui sont les plus prédominants

Distance method: No. of different alleles (FST)

AMOVA design and results:

```
</data>
<Reference>Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.</Reference>
<Reference>Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.</Reference>
<Reference>Weir, B. S., 1996.</Reference>
</data>
```

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	10	187.449	0.86783	Va 25.81
Within populations	204	508.825	2.49424	Vb 74.19
Total	214	696.274	3.36207	
Fixation Index FST :		0.25812		

Significance tests (1023 permutations)

```
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
P(rand. value = obs. value) = 0.00000
P-value = 0.00000+0.00000
```

Population pairwise FSTs

```
</data> <PairFstMat time="10/08/16 at 08:05:36">
```

Distance method: No. of different alleles (FST)

CLIII-1	CLIII-2	CLIII-3	CLIII-4	CLIII-5	CLIII-6	CLIII-7	CLIII-8	CLIII-9	CLIII-10	CLIII-11
CLIII-1 0.00000										
CLIII-2 0.34055 0.00000										
CLIII-3 0.22454 0.14361 0.00000										
CLIII-4 0.10967 0.32181 0.16450 0.00000										
CLIII-5 0.33119 0.13760 0.13700 0.21034 0.00000										
CLIII-6 0.53099 0.63564 0.44158 0.39527 0.37266 0.00000										
CLIII-7 0.20969 0.08519 0.06292 0.19011 0.10257 0.37931 0.00000										
CLIII-8 0.25855 0.20112 0.21645 0.20918 0.26875 0.44871 0.13318 0.00000										
CLIII-9 0.32250 0.22422 0.29978 0.29260 0.28545 0.59291 0.18031 0.05836 0.00000										
CLIII-10 0.52917 0.34080 0.38437 0.48441 0.22691 0.86478 0.26935 0.42529 0.55374 0.00000										
CLIII-11 0.29085 0.38181 0.24560 0.23025 0.34847 0.40984 0.21495 0.20027 0.32759 0.58872 0.00000										

Matrix of significant Fst P values
Significance Level=0.0500

Number of permutations: 110

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

AMOVA design and results:

```
</data>
<Reference>Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984.</Reference>
<Reference>Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992.</Reference>
<Reference>Weir, B. S., 1996.</Reference>
</data>
```

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	10	623094.044	3113.49801	Va 43.72
Within populations	204	817498.179	4007.34402	Vb 56.28
Total	214	1440592.223	7120.84202	
Fixation Index FST :		0.43724		

Significance tests (1023 permutations)

```
Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000
P(rand. value = obs. value) = 0.00000
P-value = 0.00000+0.00000
```

Population pairwise FSTs

```
</data> <PairFstMat time="10/08/16 at 08:13:25">
```

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

CLIII-1	CLIII-2	CLIII-3	CLIII-4	CLIII-5	CLIII-6	CLIII-7	CLIII-8	CLIII-9	CLIII-10	CLIII-11
CLIII-1 0.00000										
CLIII-2 0.40366 0.00000										
CLIII-3 0.07038 0.31024 0.00000										
CLIII-4 0.17087 0.61549 0.34880 0.00000										
CLIII-5 0.54651 0.13563 0.41503 0.74508 0.00000										
CLIII-6 0.13877 0.82997 0.13199 0.40355 0.63131 0.00000										
CLIII-7 0.39980 0.09166 0.26192 0.64418 0.24177 0.34803 0.00000										
CLIII-8 0.35095 0.05746 0.13155 0.59276 0.15262 0.22564 0.07942 0.00000										
CLIII-9 0.38064 0.18988 0.33879 0.60119 0.30041 0.62635 0.02264 0.03585 0.00000										
CLIII-10 0.39786 0.37560 0.27331 0.61485 0.08665 0.88900 0.28176 0.12396 0.51546 0.00000										
CLIII-11 0.16164 0.55972 0.00152 0.40390 0.52400 0.56610 0.34965 0.12848 0.52976 0.52201 0.00000										

Matrix of significant Fst P values
Significance Level=0.0500

Number of permutations: 110

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 44 – Résultats de l'analyse de variance moléculaire et différentiation génétique intra et inter-populations. Les populations sont différencierées entre elles avec une importante diversité exprimée au sein de chaque population.

l'ACM4, ce sont les haplotypes qui ont le plus grand diamètre de cercle pour chaque CC ou SCC et qui possèdent le plus grand nombre de branches qui divergent) et pouvant aussi être partagés par les différentes populations : MTIII-51, MTIII-56, MTIII-57, MTIII-59, MTIII-49, MTIII-56, MTIII-62, MTIII-68, MTIII-66, MTIII-78, MTIII-82, MTIII-77, MTIII-73, etc. D'une part, les multiples haplotypes fondateurs prédits, le nombre élevé de CC et les relations proches entre ces derniers sous-tendent une propagation des souches du ceRs dans les Hauts Plateaux malgaches par de multiples introductions et échanges de matériels végétaux infectées. A ce propos, les mécanismes de transmissions n'impliquent pas à l'évidence la transmission par des tubercules semences de pomme de terre. En effet en tenant compte des flux de semences au sein des bassins de production (**Figure 36E**), nous devrions avoir une structure de CC où un ou plusieurs haplotypes sont partagés avec plusieurs ZAE. La diversité génétique et le degré de déséquilibre de liaison au sein de chaque population sont résumés au **Tableau 11**.

Dispersion des souches du ceRs de l'écotype Africain dans les bassins

Si nous revenons à l'historique des souches et les données d'analyse MLST qui reflètent l'épidémiologie à long terme, nous avons vu que les haplotypes STIII-45, STIII-42 ont été génétiquement proches des haplotypes identifiés à la Réunion STIII-6 et STIII-25, isolées tous les deux de *Pelargonium sp*. Ensuite avec les données MLVA, l'haplotype MTIII-72 inclus dans l'haplotype STIII-42 et l'haplotype MTIII-148 inclus dans l'haplotype STIII-45 sont proches des haplotypes MTIII-7 (STIII-25) et MTIII-8 et MTIII-48 inclus dans l'haplotype STIII-6. Plus haut, nous avons émis que l'hypothèse d'une propagation de matériel végétal de longue distance était probable mais en confrontant avec les données MLVA où les loci TRs évoluent rapidement, la parenté proche entre ces haplotypes pourrait être due à une homoplasie des loci à évolution parallèle. Ces haplotypes seraient alors issus d'un ancêtre commun. Ainsi, à partir de ces trois informations, nous pourrions supposer que les mécanismes de transmission de ces souches s'est fait par le biais de boutures de pélargonium. Certes historiquement, le pélargonium est une plante originaire de l'Afrique du Sud introduit à la Réunion et à Madagascar vers la fin du XIXe siècle (Clément 1981 ; Dasuki 2002 ; de La Bathie 1931). Le pélargonium à cette époque était une culture de rente florissante dans les deux îles. A Madagascar, Bouriquet en 1935 a rapporté que les cultures de pélargonium étaient gravement atteintes de flétrissement bactérien causé par *R. solanacearum* (Bouriquet 1946). En tenant compte du fait que les souches phylotype III affectent aussi les pélargoniums, on pourrait supposer ainsi que les souches phylotypes III dans les Hauts Plateaux malgaches sont transmises à l'origine (au début du lancement de la culture) par de multiples introductions de boutures infectées de pélargonium au niveau de chaque ZAE. En effet, cette hypothèse est possible du fait que toutes les ZAEs d'échantillonnage pratiquent la culture de pélargonium comme culture de rente (Michellon *et al.* 1999 ; Ninnin 1998 ; PADR 2007 ; Randrianangaly 2003) bien avant le déploiement même de la culture de pomme de terre dans la région Vakinankaratra incitée par l'installation du projet FIFAMANOR en 1972. La filière pélargonium a connu son essor vers les années 90 et la culture reste pratiquée de nos jours du fait que les débouchés sont assurés. Le fait qu'aujourd'hui chaque ZAE ait sa propre pépinière (mise en place par divers projets œuvrant dans la filière huile essentielle, (**Figure 45**) pourrait expliquer la structuration des populations de souches du ceRs selon des zones géographiques bien délimitées et conforté par l'hypothèse de non transmission par les tubercules semences malgré les échanges de tubercules semences entre les différents ZAEs. Les flux de gènes entre les ZAEs voisines pourraient alors impliquer des échanges de matériels végétaux infectés.

Les souches phylotype III pourraient perdurer ensuite au niveau de la parcelle *via* les plantes réservoirs telles que les adventices. En effet, nous avons isolées des souches des adventices les plus communes des parcelles de cultures : bident et brède morelle sauvage, reconnus comme étant des plantes réservoirs (Akiew & Trevorrow 1994 ; Girard *et al.* 1993 ; Shekhawat *et al.* 1992 ; Stander 2001 ; Swanepoel 1992 ; Tusiime *et al.* 1998). Par ailleurs, comme nous avons isolé des souches du phylotype III chez une plante non symptomatique qui est l'espèce *Physalis sp.*, cette plante pourrait jouer un rôle de réservoir naturel aux souches du phylotype III dans la parcelle. Diverses études ont souligné cette potentialité chez *Physalis sp.* (Buddenhagen 1962 ; Mondal *et al.* 2011) pour les biovar 2 et biovar 3 (Akiew *et al.* 1993 ; Black & Sweetmore 1993 ; Dittapongpitch & Surat 2003 ; Swanepoel 1992). Belalcázar (2004) a obtenu des symptômes bénins sur *Physalis peruviana* inoculés avec des souches de la race 1, 2 et 3 et a rapporté que l'espèce montre une résistance aux souches *R. solanacearum* (Belalcázar *et al.* 2003). La culture de *Physalis peruviana* ou 'pok pok', une plante introduite à Madagascar, originaire des Andes (Decary 1963) fait partie des cultures de rente d'exportation pratiquée dans les Hauts Plateaux vers le début des années 90 jusqu'à aujourd'hui (ATW Consultants 1994 ; CTHA 2004 ; PNUD 2000) (**Figure 46**). Si elle n'est pas cultivée sur une grande surface, cette culture est souvent mise en bordure des parcelles de culture. Enfin, l'inoculum peut être conservé dans les résidus de fanes de haricot laissées dans la parcelle après récolte, disséminé par l'eau d'irrigation et l'eau de ruissellement pendant la saison des pluies comme pour le cas de la dispersion de souches clonales dans la ZAE 11 où les parcelles d'échantillonnage sont situées en pente avec un dénivellation de 20 m.

Entre autre, le voisinage des souches Zimbabwéennes et les souches malgaches représentées : • sur l'arbre phylogénétique (basé sur les séquences *egl*) où les sequevars 20, 21, 22 (ZW) et sequevar 19 (MG) sont groupées (mais le nœud est faiblement soutenu) ; • sur l'ACM4 où l'haplotype MTIII-35 (ZW) est distant à 3LV de l'haplotype MTIII-70 (MG, sequevar 57, CLIII-10) et distant de 6LV de l'haplotype MTIII-90 (MG, sequevar 57, CLIII-11) ; • plus le fait qu'un évènement de recombinaison a été détecté avec RDP par deux méthodes (B, M) impliquant la souche NCPPB0505 (ZW, sequevar 20, STIII-29, MTIII-38) comme parent majeur de la souche MAD403 (MG, sequevar 57, STIII-37, MTIII-101, CLIII-5) considérée comme ayant une portion de gène recombinant *egl* (67 souches du sequevar 57 groupés dans les populations CLIII-5, CLIII-7, CLIII-9, CLIII-10, CLIII-11 possèdent les mêmes séquences recombinants ou des traces de celles-ci) ont attiré l'attention. Ces observations rejoignent celles issues des travaux de Fegan et Prior (2005), Mahbou (2009), Poussier *et al.* (1999, 2000), Remenant *et al.* (2010) sur les relations de parenté entre les génotypes du sous-groupe des régions Afrique du Sud et Océan Indien incluant les souches du Zimbabwe, Madagascar et la Réunion. On notera aussi le voisinage des haplotypes ZW-CM et CM-MG (haplotypes singuliers anciens MLTIII-63, MTIII-87, MTIII-85 groupés dans le sequevar 56). A la lumière de ces constats, on pourrait avancer que ces haplotypes ont un passé commun, c'est-à-dire qu'ils sont issus d'un ancêtre commun et qu'ils ont ensuite évolué indépendamment dans chaque pays pour créer de nouveaux variants qui deviennent à leur tour les fondateurs. Le facteur commun est l'exploitation tabacole au niveau des trois pays. Le tabac, une plante originaire d'Amérique, a été introduit à Madagascar antérieurement au XVII^e siècle. Elle est devenue une culture d'exportation pendant la période de colonisation française (vers le début du XIX^e siècle) où elle a été améliorée par l'introduction de variétés plus performantes en terme de rendement, de résistance à la maladie et de qualité recherchée au niveau du marché international (Menier 1934 ; Monnier 1946) (**Figure 47**). Actuellement la culture du tabac est toujours pratiquée au sein du bassin de production (MAEP-UPDR 2004b). Rasolofa en 1965 a rapporté que la culture de tabac a souffert de flétrissement



Figure 45 – Exploitation de Pélargonium sur les Hauts Plateaux malgaches (champs, pépinière, alambic). Crédits photos : G. Cellier et L. Costet.



Figure 46 – Plantation de ‘Pok pok’ (*Physalis sp.*) sur les Hauts Plateaux malgaches. Sources : Agrisud (2016), www.fedevaco.ch



Figure 47 – Centres de production de tabac à Madagascar. Crédit illustration : P. Monnier.

bactérien dans la région d'Ambatolampy (ZAE 4) et d'Antanifotsy (une partie de la ZAE 1), que l'IRAT³³ a remédié par l'introduction et la sélection de nouvelles variétés. Aucune information n'est disponible concernant les formes d'introduction du tabac (graines, plants, boutures ?) pouvant donner des éclairages sur la possibilité de transmission à longue distance de ces souches. Mais comme les souches phylotypes III sont isolées et affectent les plants de tabac (Elphinstone 2005b ; Subedi *et al.* 2013), on pourrait supposer qu'ils constituent un réservoir d'inoculum potentiel au niveau des parcelles de cultures où les rotations par la culture de pomme de terre est pratiquée.

SYNTHESE ET ANALYSES DES DONNEES D'ENQUETES

Historique du flétrissement bactérien

Selon les paysans, le flétrissement bactérien existe depuis toujours de mémoire d'homme dans les bassins de production de pomme de terre causant de pertes acceptables de rendement surtout, en cultivant les variétés résistantes ou tolérantes développées par FIFAMANOR. Autrefois, le flétrissement bactérien se manifestait surtout en période chaude et humide, sur des cultures pluviales et en saison intermédiaire, cultivées sur '*tanety*'. Le début de développement des symptômes est en général observé par les agriculteurs avant la floraison avec un pic pendant la phase de floraison. Longtemps, le flétrissement bactérien n'a été observé sur les cultures installées sur des sols volcaniques et peu fréquents sur '*baiboho*'. A lumière de nos résultats, ces infections impliquent probablement les populations endémiques de souches du phylotype III qui sont prévalentes dans l'ensemble des ZAEs des bassins de production, le phylotype I étant plus localisé dans la partie Nord-Est des Hauts Plateaux.

Situation phytosanitaire actuelle

Depuis ces cinq dernières années³⁴, le flétrissement bactérien s'est développé sévèrement dans la région Vakinankaratra, Andramasina et Manjakandriana (où la culture de pomme de terre est presque abandonnée) sur des cultures de pomme de terre et de tomate de contre saison sur rizières ou parcelles irriguées, et également sur sol volcanique (dans la région de Betafo) avec d'importantes pertes de rendement pouvant aller jusqu'à 80 %. Dans la région Itasy, Ambositra et Ambohimahasoa, bien qu'elle ait été remarquée environ vers l'année 2009 pour certaines zones, le flétrissement bactérien est devenu dans l'ensemble plus importante depuis l'année 2011 sur les cultures de pomme de terre et de tomate. Le développement de la maladie commence au début de la phase de croissance du plant et jusqu'à la tubérisation, ce qui est tout à fait inhabituel. Comme explication, l'émergence des souches 'Brown rot' est associée à ce changement de situation épidémiologique dans les différentes ZAEs. Le contraste entre la période d'apparition des épidémies dans la région Vakinankaratra et Andramasina (ZAE 1 à ZAE 5) et dans la région Itasy (ZAE 7 à ZAE 9) et les régions du Sud des Hauts Plateaux (ZAEs 10 et ZAE 11) serait lié à l'ampleur des activités agricoles et flux de semences au niveau de ces ZAEs. La production de pomme de terre dans la région centrale où sont situés les deux premiers bassins de production étant le plus intense avec des échanges importants de tubercules semences.

Résistance des variétés de pomme de terre

Certains paysans ont constaté que les variétés estimées autrefois résistantes ou tolérantes au flétrissement bactérien comme *Bandy akama*, *Diamondra1*, *Meva*, *Maneva*, *Bemanga*, *Jaingy* apparaissent désormais sensibles à la maladie. De même, ils ont remarqué que les cultures de haricots sont maintenant atteintes

³³ IRAT : Institut de Recherche Agronomiques Tropicales et des Cultures vivrières

³⁴ Année de l'enquête était en 2013

par le flétrissement bactérien. Quelles que soient leur origine, les variétés locales paraissent plus ou moins sensibles à tolérantes au flétrissement bactérien, tandis que les variétés développées par FIFAMANOR sont plus sensibles. Autrement dit, les variétés de pomme de terre dont les semences sont produites localement sont plus ‘résistantes’ que les variétés dont les semences proviennent de FIFAMANOR. Ces constatations sont liées par l’infection aux souches hautement agressives de l’écotype ‘Brown rot’. A l’évidence les variétés de pomme de terre améliorées sont sensibles aux souches IIB-1. Pour ce qui est de la résistance des variétés locales, cela indique que la contamination aux souches IIB-1 provient des lots de tubercules semences nouvellement sélectionnées présentant des infections latentes ou d’introductions non contrôlés.

Flux de tubercules semences

Les tubercules semences de pomme de terre utilisées proviennent généralement du marché local (autoproduction locale de tubercules semences et distribution par des organisations paysannes), du marché de gros d’Anosibe (Antananarivo) (notamment pour la Région Itasy, Analamanga (Ambohidratrimo, Andramasina)), le marché de gros d’Asabotsy (Antsirabe) pour l’ensemble des zones de production de la région Vakinankaratra et le marché d’Arivonimamo pour la région Itasy. La qualité sanitaire de ces semences n’est cependant pas vérifiée. En outre, FIFAMANOR est le fournisseur national de semences de base certifiées en pomme de terre. Dans chaque zone productrice de la région Vakinankaratra existe des groupements de paysans semenciers qui se procurent ces tubercules semences certifiées et font ensuite de l’autoproduction dans leur zone d’activité respective. A leur tour, ces groupements de paysans semenciers revendent leur récolte au marché local, où les autres paysans agriculteurs de la même zone s’en approvisionnent. Pour la région Sud (Ambositra, Ambohimahasoa, etc.), le Ceffel³⁵ - un centre d’expérimentation et de formation en fruit et légumes en collaboration avec le projet Fert, assure l’approvisionnement en tubercules semences de pomme de terre, des tubercules semences qui sont achetées à l’origine au FIFAMANOR, et une autoproduction de tubercules semences est ensuite réalisée par le centre à l’issu des travaux d’expérimentation et de sélection variétale.

Pour la zone Andramasina, le deuxième bassin de production de l’île, les tubercules semences de pomme de terre sont à l’origine issus de FIFAMANOR, puis les paysans ont pratiqué une auto-sélection et une autoproduction de tubercules semences. Par ailleurs, il leur arrive de se procurer des tubercules semences au marché de gros d’Antananarivo et également de la zone d’Ambatolampy qui s’approvisionnent en tubercules semences chez FIFAMANOR.

Pour la région Itasy, le troisième bassin de production (Arivonimamo), une autoproduction de tubercules semences est réalisée en altitude dans la zone de Manalalondo. Les tubercules semences proviennent principalement ainsi de cette zone. Par ailleurs, certains paysans de cette région se procurent les tubercules semences au marché de gros d’Anosibe. Egalement, pour Ambohidratrimo et Manjakandriana, les tubercules semences proviennent du marché de gros d’Anosibe. Les principales zones multiplicatrices de tubercules semences identifiées sont Manandona (Antsirabe), Androkavato (Antsirabe), Andranobe (Antsirabe), Antanifotsy (Antsirabe), Faratsiho, Ambohimiadana (Andramasina) et Manalalondo (Arivonimamo). La majorité des paysans utilise un tubercule entier pour le semis, mais il existe également ceux qui pratiquent le partage du tubercule.

Pratique et itinéraire cultural

Concernant les pratiques culturales, la majorité des parcelles de cultures sont fertilisées avec du compost ou du fumier de ferme, des engrains chimiques comme le NPK et l’Urée et chaulées avec de la dolomie.

³⁵ Ceffel : Centre d’expérimentation et de formation en fruits et légumes (Antsirabe)

Au cours de leur cycle végétatif, les plants de pomme de terre sont également traités avec des insecticides à base de pyréthrinoïdes, et de fongicide comme le Dithane (mancozèbe) pour contrôler le mildiou. La rotation culturelle est pratiquée, par exemple : jachère – pomme de terre – riz – haricot – maïs – pomme de terre ; mais les paysans de la région Itasy (ZAE 7, ZAE 8, ZAE 9) ont affirmé que le flétrissement bactérien revient même en pratiquant la rotation et les jachères. Cette situation pourrait liée par la persistance des souches dans le sol favorisée par les plantes réservoirs. Nous avons vu par exemple que les souches du phylotype III possèdent un spectre d'hôte élargi qui pourrait assurer leur survie dans les parcelles de culture.

Observations et données supplémentaires

Dans la majorité des parcelles de pomme de terre et de tomate, nous avons observé une distribution irrégulière et ponctuelle de flétrissement sur les plants. Néanmoins, de grands foyers de maladie sont observés sur aubergine (Miarinarivo) et géranium (Ambositra). Une distribution sporadique de la maladie suggèrerait un inoculum de départ via des semences contaminées, tandis qu'une distribution régulière de la maladie en un vaste foyer d'infection indiquerait un inoculum permanent d'origine tellurique. Les adventices que nous avons pu reconnaître sont le bident hérissonné (*Bidens pilosa*) qui présente également le symptôme de flétrissement, le cosmos (*Cosmos sp.*), le cyperus (*Cyperus sp.*), le galinsoga (*Galinsoga sp.*), etc. Par ailleurs, au cours de ses observations, le sélectionneur en pomme de terre de FIFAMANOR (R. Randriatsalama.) a observé que le bident hérissonné à proximité d'un plant de pomme de terre flétris est lui aussi flétri. A la lumière de cette observation, le bident qui est une adventice commune dans les terrains de culture pourrait être utilisée comme 'plante indicatrice' pour la détection de la présence des souches du ceRs au niveau de la parcelle.

CONCLUSION PARTIELLE

Ce travail avait pour objectif de caractériser la diversité et la structure des populations des souches malgaches du ceRs pour décrire les épidémies dans les bassins de production de pomme de terre de Madagascar.

La caractérisation moléculaire des souches du ceRs isolées des différents ZAEs montre une **forte diversité génétique** des souches malgaches qui sont constituées de trois lignées phylogénétiques : les phylotypes I et III qui ont été déjà auparavant décrits (Poussier *et al.* 2000 ; Prior *et al.* 2006, non publié) et la **première signalisation des souches ‘Brown rot’ phylotype IIB-1**.

L’analyse des séquences partielles du gène *egl* a permis d’identifier **4 nouveaux sequevars : I-58, III-55, III-56 et III-57** chez le ceRs en plus des 3 sequevars connus : I-18, III-19 et IIB-1. Le phylotype I de sequevar I-46 n’a pas été retrouvé dans la collection. En effet, ces séquevars ont été isolées en zone de plaine de basse altitude (27m) (Prior *et al.* 2006, non publié).

L’analyse de diversité génétique des souches ‘**Brown rot**’ **IIB-1** a permis de mettre évidence l’**émergence** de populations récentes de ces souches à Madagascar. Il est démontré que les souches isolées dans les bassins de production de pomme de terre présentent des similitudes génétiques avec des souches IIB-1 mondialement répandues, confirmant ainsi leur **introduction** malheureuse sur le territoire malgache. Ces souches affectent principalement les cultures de pomme de terre et de tomate et ont une très large distribution géographique. Elles sont présentes dans 11 ZAEs échantillonnées et sont associées à l’épidémie de flétrissement bactérien dans les bassins de production de pomme de terre. Ces souches sont regroupées en **deux complexes clonaux**, dont un complexe clonal majeur. Les structures en étoile au sein de ce complexe clonal suggèrent une récente expansion de **populations clonales** qui se diversifient par des **mutations**. Ces observations corroborent une structure de **population épidémique**. La présence des 3 populations dans les bassins pourrait être liée à de multiples introductions ou d’introductions polyclonales de souches qui se sont **propagées par des tubercules semences infectées**. Par ailleurs, au niveau d’une parcelle ou d’une localité, l’eau d’irrigation ou les adventices sont reconnues comme des sources potentielles de contamination (Álvarez *et al.* 2010 ; CABI 2016 ; EPPO 2015 ; Stander 2001 ; Swanepoel 1992).

L’exploration de la diversité des souches malgaches de l’**écotype Africain** révèle une **diversité intra et inter-populations très importante** qui se retrouvent **uniquement à Madagascar**. Un total de **11 populations hétérogènes** est distribué dans des zones géographiques bien délimitées dans les bassins de production. Cette observation corrobore celle de Poussier *et al.* (1999) sur une structuration géographique de la diversité génétique chez les biovar 1. L’excès de mutations à faible ou à fréquence intermédiaire au sein de chaque population semble indiquer que les populations de souches de phylotype III sont soumises aux **pressions de sélection** du milieu et évoluent en conséquence par des séries de **mutations** pour s’adapter aux conditions locales, par exemple à une niche écologique (le froid) ou à un hôte (la pomme de terre) particulier. Ce scénario d’évolution est caractéristique d’une population **persistante** confirmant le caractère **endémique** de la maladie. La présence des 11 populations dans les bassins de production est probablement liée à des **flux anciens de matériels végétaux infectés** comme les boutures de

pélargonium, de tabac (ou graines), ou d'autres plantes hôtes ; n'impliquant pas une transmission par tubercules semences de pomme de terre. Outre la contamination par les eaux d'irrigation et les eaux de ruissellement, l'hétérogénéité, le large spectre d'hôtes des souches phylotype III contribuent à son succès de dispersion et de sa persistance à l'échelle d'une parcelle et d'une localité.

Par ailleurs, assez curieusement, nous n'avons **pas retrouvé des souches des phylotypes IIA ou IIB** correspondant à la **race 1 biovar 1** (Lallmahomed & Rakotobe-Rabehivitra 1988 ; Rahetlah 2008 ; Randriamampianina 1997 ; Randrianangaly 2003). Etant donné que les souches de phylotype II sont pathogènes de la pomme de terre, de la tomate, de l'aubergine et d'autres espèces (Cellier & Prior 2010), le fait que nous ne l'ayons pas identifié à partir de ce large échantillonnage dans les bassins de production pourrait signifier que :

- 1) Ces groupes de souches ne sont pas présents dans les zones d'altitude prospectées et que nous les avons pas prélevé dans leur zone de prévalence.
- 2) Ces groupes de souches sont présents mais masqués par l'abondance des souches de phylotype IIB-1.
- 3) Ces groupes de souches ont subi un goulet d'étranglement réduisant la population voire sa disparition.
- 4) Il s'agit d'un défaut d'appréciation lors de la classification en race de ces souches. En effet, le biovar 1 tombe aussi dans le phylotype III lorsqu'il est associé à la race 3. La classification en race 1 a été sans doute adoptée après isolement ou identification des souches sur différentes cultures et que la maladie n'a pas été identifiée dans les zones d'altitude. Cependant le spectre d'hôte de la race 3 est bien plus large que tel qu'il a été défini à l'origine (Cellier 2012) et comme nous l'avons identifié dans cette étude le phylotype III (ancien race 3 biovar 1) est bel est bien présent en moyenne altitude et également en basse altitude (743 m) comme dans l'île de la Réunion (Yahiaoui 2016). La présence de ces groupes de souches reste ainsi à élucider.

Les deux schémas de génotypage '**RS2-MLVA9**' et '**RS3-MLVA16**' développés dans le cadre de ce travail ont révélé un **pouvoir discriminant élevé** par rapport au génotypage MLST/MLSA. L'analyse des données MLVA et MLST/MLSA ont permis de décrire **deux profils épidémiologiques contrastés** de l'écotype 'Brown rot' et 'l'écotype Africain' prévalant dans les Hauts Plateaux malgaches dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches.

Pour conclure, cette étude illustre la valeur d'une approche de génétique des populations pour mieux comprendre, d'une part, les mécanismes biologiques qui contribuent à l'adaptation et à la diversification évolutive de ces deux écotypes ; et leur mécanisme de dispersion dans les bassins de production, d'autre part. Les données fournies par ces analyses vont nous permettre de définir aux mieux des mesures de gestion du flétrissement bactérien adaptées dans les Hauts Plateaux malgaches. Cette étude constitue une première étude d'épidémiologie moléculaire portant sur des souches du ceRs isolées à Madagascar. A l'issu de ces analyses, des souches représentatives de la diversité génétique sont sélectionnés pour évaluer la résistance d'une core-collection de variétés de pomme de terre cultivées à Madagascar.

CHAPITRE 3.

**ÉVALUATION PRÉLIMINAIRE DE
LA RÉSISTANCE DES VARIÉTÉS
CULTIVÉES À MADAGASCAR**



INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien causé par le ceRs est parmi les maladies les plus dommageables de la pomme de terre. Mes travaux ont montré que les épidémies massives dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches sont dues à une introduction de souches 'Brown rot' IIB-1. Outre les mesures prophylactiques, le contrôle de cette maladie dépend aussi de l'utilisation de variétés génétiquement résistantes, issues de la sélection conduite par le centre FIFAMANOR en partenariat avec le CIP. Une dizaine de variétés présentant différents degrés de résistance au flétrissement bactérien ont été vulgarisées (**Tableau 12**). Toutes sont des accessions de pomme de terre du CIP. Ces variétés ont été généralement éprouvées pendant une période minimum de cinq ans dans diverses sites représentatifs des ZAEs favorables à la culture de pomme de terre de la région Vakinankaratra (essais multilocaux) et durant plusieurs saisons de culture : en saison sur les '*tanety*' et en contre saison sur les terrains irrigués. La sélection variétale a porté sur la faculté d'adaptation aux conditions agroécologiques locales, la résistance aux maladies (mildiou, flétrissement bactérien, alternariose, virose, etc.), la tolérance au stress abiotique (aléas du climat), le potentiel de rendement et les qualités technologiques et gustatives. Ces essais multilocaux ont constitué un moyen non négligeable d'évaluer les propriétés de résistance de ces variétés qui ont montré des différences de comportement vis-à-vis de la maladie, selon les zones d'évaluation (données FIFAMANOR).

A Madagascar, la sélection pour la résistance au flétrissement bactérien est en partie menée de manière empirique, car avant cette thèse la variabilité génétique et la dynamique des populations des souches du ceRs dans les bassins de production étaient méconnues, ne permettant pas de caractériser les différences de comportement selon l'assignation phylogénétique des souches. L'acceptation du terme 'résistance' au flétrissement bactérien a vraisemblablement été considérée dans sa globalité, et serait plutôt assimilée à de la tolérance à telle types de souches. En effet, elle implique généralement la notion de seuil de tolérance acceptable pour attribuer la note de variété résistante à moyennement résistante, jusqu'à moyennement sensible à sensible. La notion de résistance ou de sensibilité se réfère à l'aptitude de la plante à empêcher ou non l'infection par l'agent pathogène et sa croissance *in planta*. En revanche, la tolérance est plutôt assimilée à la capacité de la plante à survivre à l'infection et implique l'absence d'incidence sur le rendement.

Les variétés de pomme de terre les plus populaires à Madagascar sont déployées et cultivées dans des zones agroécologiques où elles n'ont pas été testées vis-à-vis des populations du ceRs prévalant dans ces zones. Aussi, il n'est pas étonnant qu'étant notée 'résistante' dans une zone donnée, la même variété s'avère plus ou moins résistante dans un autre lieu. Si on se réfère à la diversité des populations de souches du ceRs qui a été identifiée au plan de chaque ZAE (chapitre précédent), on peut anticiper que ces variétés réagissent différemment au flétrissement bactérien. C'est dans ce contexte que cette étude est réalisée en vue d'évaluer le niveau de résistance des variétés déployées et cultivées actuellement dans les trois bassins, vis-à-vis d'une collection de souches du ceRs représentant la diversité génétique identifiée dans l'ensemble des principaux bassins de production.

MATERIELS ET METHODES

MATERIEL VEGETAL

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est composé de 8 variétés de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) cultivées à Madagascar, dont 5 sont évaluées comme résistantes au flétrissement bactérien au champ [800946 (1), 800934, 720118, 394895.7, 395438.1], 2 variétés sont en cours d'évaluation [377957.5, 381381.2] et la variété 'Spunta' (800923) qui est utilisée comme témoin sensible. Ces variétés ont été obtenues auprès des centres FIFAMANOR et CIP (Pérou et Kenya) sous forme de vitroplants. La micropropagation des vitroplants a été assurée pour le Cirad par le laboratoire VitroRun³⁶ (Saint Pierre, La Réunion). La production de plants pour l'essai a été ensuite réalisée par le centre Armeflhor³⁷ (Saint Pierre, La Réunion). Les principales caractéristiques de chaque variété sont présentées dans le **Tableau 12**.

RALSTONIA SOLANACEARUM

Douze souches représentant la diversité génétique des souches du ceRs identifiée au cours de ce travail sont utilisées : 9 souches de phylotype III, 2 souches de phylotype IIB-1, et 2 souches de phylotype I, plus une souche du phylotype I-31 qui est isolée à la Réunion. Les caractéristiques de chaque souche sont présentées dans le **Tableau 13**. Les processus de régénération des souches sont décrits dans Ravelomanantsoa (2016). L'inoculum est constitué d'une suspension bactérienne calibrée à une concentration équivalent à 10^8 cfu/ml ($DO_{600nm} \sim 0.1$) préparée à partir d'une culture pure de 24 h. La morphologie muqueuse (virulente) des souches est vérifiée sur milieu gélosé de Kelman.

DISPOSITIF EXPERIMENTAL ET INOCULATION

Les essais sont réalisés dans des chambres climatiques à Rotoplan, dans un niveau de confinement renforcé de niveau 2 (NS2). Chaque combinaison souche x variété a été testée sur 5 répétitions de 7 plants groupés dans un même bac (une répétition = un Rotoplan). Dans chaque Rotoplan, les plants inoculés par la même souche sont regroupés et isolés sur un plateau pour éviter les contaminations croisées. Chaque chambre climatique est paramétrée pour avoir une humidité relative de 90 %, une température de $30^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ le jour et $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ la nuit et une photopériode de 12h. Les plants de pomme de terre (qui ont été repiquées en pots) âgés approximativement de 4 semaines (au stade de 3 à feuilles, environ 10 cm de hauteur) sont infectés par 5 ml d'inoculum déposés en surface du substrat de culture après scarification des racines au scalpel (**Figure 48**). Les plateaux où sont disposés les bacs de plants sont ensuite placés aléatoirement dans la chambre climatique. Les plants sont régulièrement arrosés pour éviter l'assèchement du substrat. Un traitement témoin non inoculé composé de plants de la variété témoin est placé dans la chambre pour évaluer l'effet des conditions appliquées dans chambre et de l'arrosage.

³⁶ VitroRun : Laboratoire réunionnais de production de plantes *in vitro*

³⁷ Armeflhor : Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole

Tableau 12 – Caractéristiques des variétés de pomme de terre utilisées.

Code	CIP ID	Autre nom	Nom malgache	Pedigree		Comportement	Origine	Origine vitroplants
				Female	Male			
A	800946(1)	AL-624	DIAMONDRA 1	BR-112.114	?	MR	USA	FIFAMANOR
B	377957.5	-	MEVA	Snow flake	N551.12	-	PER	FIFAMANOR
C	800934	MS-35.9	MIOVA	ICA PURACE	PI	R - MR	-	CIP (Peru)
D	381381.2	Victoria	MAHAREVO	378493.915	PRECOZ BULK	-	Victoria	FIFAMANOR
E	720118	Cruza 148	JAINGY	MONTSERRATE	PI ?	R - MR	-	CIP (Kenya)
F	394895.7	-	S1	BWH-87.230	C90.205	MR	-	CIP (Peru)
G	395438.1	-	S8	BWH-97.344R	393617.1=(TXY.11)	R - MR	-	CIP (Peru)
H	800923	-	SPUNTA	BEA	USDAX96.56	S	NLD	FIFAMANOR

Tableau 13 – Caractéristiques des souches utilisées.

Code	RUNID	StrainID	Altitude (m)	ZAE	Origine	Phylotype	Sequevar	CC	ST	MT	Population
RS1	RUN2577	MG459	1596	ZAE 4	ST. var. meva	III	19	CC MTIII- 3	STIII-39	MTIII-65	CLIII-1
RS2	RUN2587	MG474	1596	ZAE 4	ST. var. jengy	III	19	CC MTIII- 9	STIII-39	MTIII-77	CLIII-1
RS3	RUN2753	MG603	1937	ZAE 3	ST.var. diamondra 1	III	57	CC MTIII- 5	STIII-44	MTIII-111	CLIII-8
RS4	RUN2760	MG590	1941	ZAE 3	ST.var. diamondra 1	III	19	CC MTIII- 2	STIII-39	MTIII-56	CLIII-8
RS5	RUN2983	MG1B5	1700	ZAE 1	eau d'irrigation	III	-	S	-	MTIII-54	CLIII-7
RS6	RUN2995	MG883	1550	ZAE 12	ST. var. jengy	III	19	S	STIII-39	MTIII-136	CLIII-4
RS7	RUN3231	MAD237	1176	ZAE 8	ST.var.fotsy	III	57	CC MTIII- 4	STIII-36	MTIII-88	CLIII-11
RS8	RUN3340	MAD378	1629	ZAE 10	ST.var.menamaso	III	57	CC MTIII- 6	STIII-37	MTIII-71	CLIII-5
RS9	RUN3368	MAD410	1641	ZAE 10	Pelargonium	III	57	CC MTIII- 1	STIII-35	MTIII-66	CLIII-5
RS10	RUN3232	MAD-238	1176	ZAE 8	ST.var.fotsy	II	1	CC MTII-1	-	MTII-9	CLII-1
RS11	RUN2414	MG-159	1629	ZAE 2	ST.var.bandy akama	II	1	CC MTII-1	-	MTII-3	CLII-3
RS12	RUN0305	MAD-002	1321	REF	SL	I	18	-	-	-	-
RS13	RUN3288	MGII0382	1261	ZAE 6	ST.var.potamenamaso	I	18	-	-	-	-
RS14	RUN5277	-	743	Réunion	ST	I	31	-	-	-	-

SUIVI ET MESURE DES SYMPTOMES

L'apparition et le développement des symptômes de flétrissement sur les parties aériennes des plants (épinastie, chlorose) sont notés 7 jours après l'inoculation (JAI) et pendant 7 semaines. L'incidence de la maladie est enregistrée par dénombrement des plants flétris au moins une fois par semaine après l'apparition du premier symptôme de flétrissement. Au terme de l'expérimentation, les infections latentes sur les plantes asymptomatiques sont détectées par isolement sur milieu Kelman. Pour cela, des portions de tige située près du collet sont prélevées, désinfectées en surface (trempage rapide à éthanol 90 % suivi de flambage), dilacérées dans 5 ml de tampon Tris et laissées macérer pendant environ 15 minutes pour libérer les bactéries des tissus vasculaires. 50- μ l de chaque macérât sont ensuite étalés en trois secteurs sur milieu gélosé à raison de deux réplicats par macérât. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C pendant 2 à 4 jours.

ANALYSES DES DONNEES

La résistance au flétrissement bactérien est exprimée par l'incidence du flétrissement qui est déterminée par le pourcentage de plants flétris quel que soit le degré de symptômes observées. Les analyses statistiques sont réalisés en utilisant le package 'agricolae' (de Mendiburu 2016) sous le logiciel R version 3.0.2. La surface sous la courbe de progression de maladie 'AUDPC' (Campbell & Madden 1990) est calculée avec la fonction '*audpc*', le test des hypothèses nulles pour les effets du facteur 'souche' et 'variété' sur la moyenne des valeurs de la variable incidence de la maladie (AUDPC) est testée par des modèles linéaires avec la fonction '*lm*', l'analyse des variances est effectuée avec la fonction '*aov*' au seuil de 5 % sous l'hypothèse H_0 : 'il n'y a pas de différence significative entre deux groupes testés'. Enfin lorsqu'il y a une différence statistique, le test de comparaison multiple des moyennes par la méthode de HSD de Tukey au seuil de 5 % est lancé avec la fonction '*TukeyHSD*'.

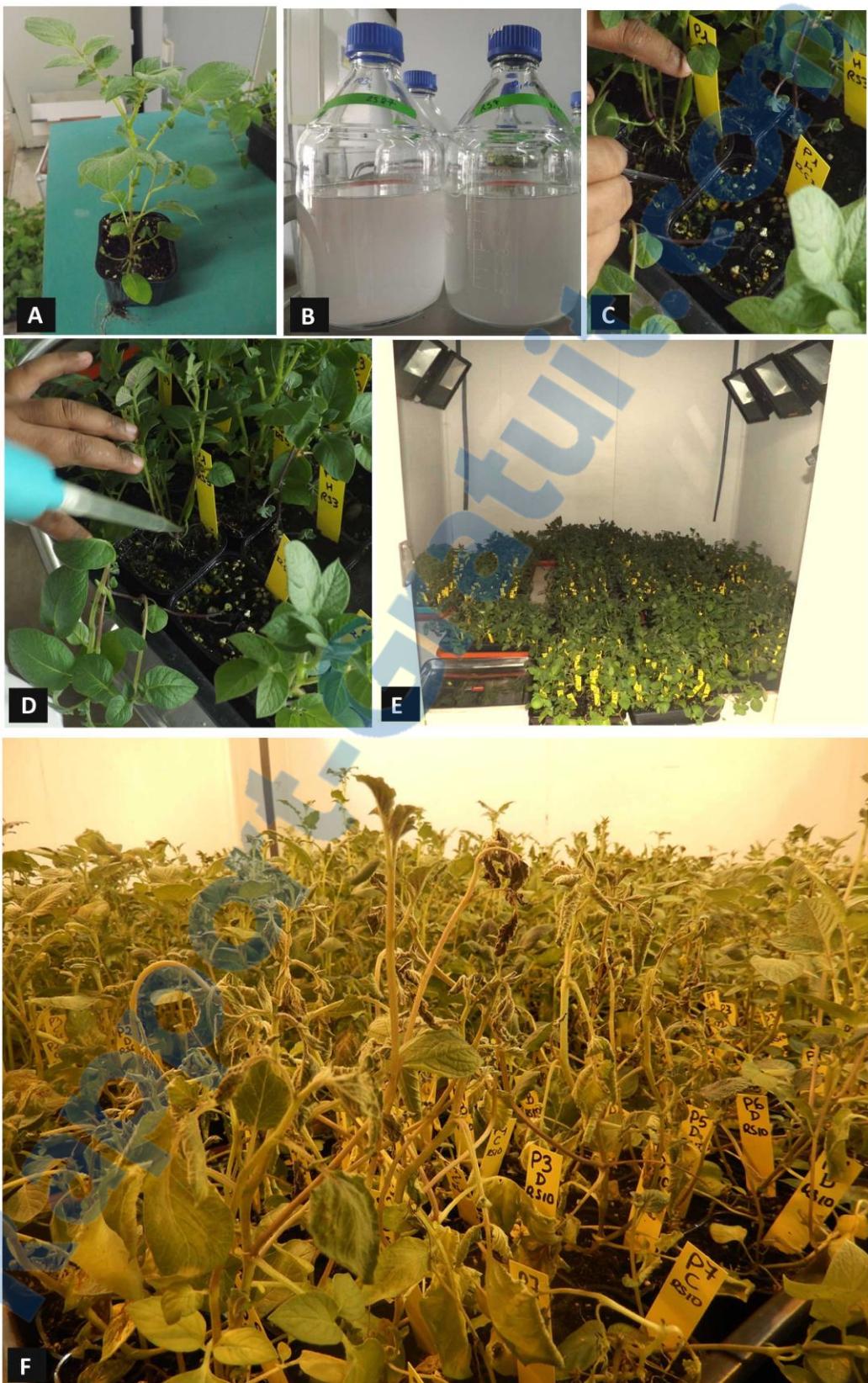


Figure 48 – Dispositif expérimental. (A) Plant de pomme de terre âgé de 4 semaines. (B) Flacons contenant les inoculums. (C) Etape de scarification au niveau des racines. (D) Etape d'inoculation. (E) Disposition des bacs dans la chambre climatique. (F) Plants montrant un symptôme de flétrissement.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'évolution des symptômes de flétrissement bactérien pour chaque combinaison souche x variété est présentée sur la **Figure 49**. Les valeurs moyennes de l'AUDPC et les résultats de l'analyse de variance sont présentés dans les **Tableaux 14 et 15**. Les résultats montrent dans l'ensemble que les variétés testées sont sensibles à l'infection par les souches du ceRs phylotypes I, II et III : plus l'AUDPC est important plus l'incidence du flétrissement bactérien est grande. Excepté pour les variétés 720118 (Jaingy) et 800934 (Miova) qui résistent de manière remarquable à la souche RUN5277 (I-31). Cette souche RUN5277 a été isolée à la Réunion dans le cadre de la thèse de Yahiaoui. Elle a été incluse dans l'étude pour représenter un groupe de souche, le phylotype I-31, qui est prévalent dans l'ensemble de la zone de l'Océan Indien. Ce génotype I-31 n'a pas été identifié pour l'instant à Madagascar. Mais comme il s'agit d'une souche de plaine et que ces travaux n'ont pas exploré la diversité génétique dans ces zones, on peut parfaitement anticiper que le I-31 soit aussi présent à Madagascar.

L'accession 720118 fait partie des variétés utilisées comme géniteur dans la création variétale considérée comme 'résistante' mais pouvant porter des infections latentes (French *et al.* 1998 ; Silveira *et al.* 2007). Elle a été rapporté comme 'tolérante' au Kenya, ainsi que l'accession 381381.20 (Ateka *et al.* 2001). La variété 800934 montre également une résistance à la souche RUN 5277 (I-31).

En revanche comme toutes les variétés testées, la variété 394895.7 montre une sensibilité notable aux souches du ceRs, y compris au phylotype IIB-1. Il en est de même pour la variété 395348.1 qui est également sensible au phylotype I, contrastant ainsi avec les observations de Gutarra *et al.* (2015). Cette différence au niveau de la résistance pourrait être expliquée par l'instabilité de la résistance chez ces variétés qui peut être liée, par exemple, à la température. Il se pourrait que la plante soit plus sensible à une température plus élevée. En effet, les conditions de température sont différentes entre l'essai réalisé par Gutarra *et al.* (2015) (température jour/nuit 25°C/16°C) et les températures que nous avons appliquées qui sont plus élevées (30°C/25°C). Les effets de la température sur la résistance des variétés ont été rapportés par Hayward (1991) et Schmiediche (1990). L'expression de maladie aux champs est favorisée par une forte température selon French (1994) et Hayward (1991). Zehr (1970) rapporte que des températures jour/nuit 21-24/16-18°C permettent l'infection sans développement de symptômes. Ce qui expliquerait probablement la colonisation des souches en état d'infection latente (Gutarra *et al.* 2015).

De même, on peut aussi anticiper que cette résistance n'ait pas pu s'exprimer dans nos conditions expérimentales très contraignantes pour la plante : température chaude, inoculation très forte (5 ml à 10⁸ cfu/ml) et scarification du système racinaire. Ce choix expérimental extrême a été conçu pour repérer de très hauts niveaux de résistance génétique, comme pour les accessions du 720118 et 800934. Il conviendra sans doute de reprendre ces essais en allégeant les contraintes imposées à la plante, de manière à pouvoir repérer des propriétés de résistance partielle.

L'expression de la maladie chez les huit variétés infectées par la même souche est statistiquement différente (anova et HSD, $p > 0.05$). En effet, nous pouvons constater sur les courbes d'évolution de la maladie que les symptômes en réponse à une infection aux souches du phylotype IIB-1 se déclarent plus rapidement, environ une semaine après l'inoculation, et augmentent ensuite de manière exponentielle jusqu'aux alentours du 16^{ème} jours après inoculation où la majorité des plants sont flétris (**Figure 49**).

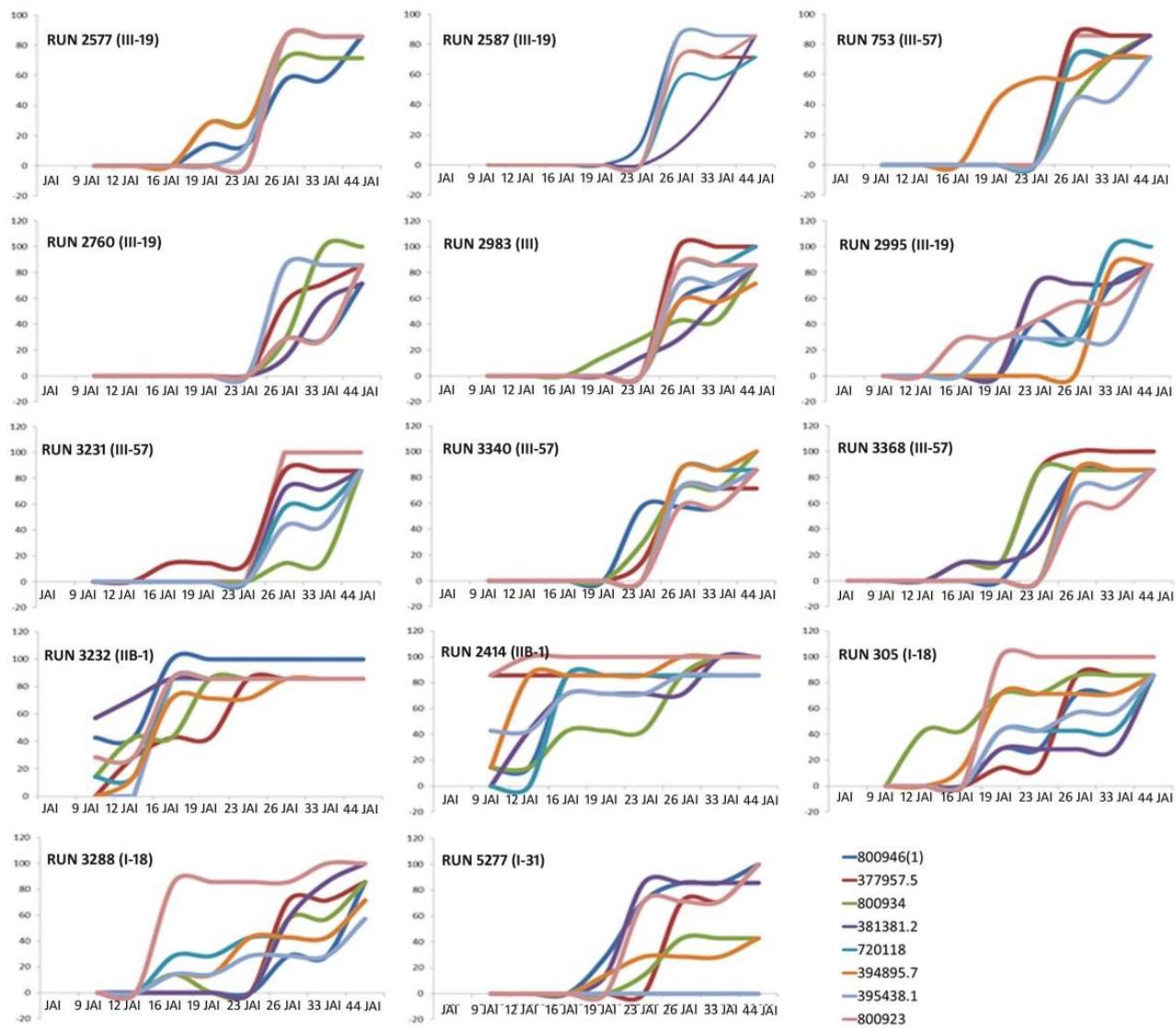


Figure 49 – Evolution du flétrissement bactérien exprimée en pourcentage de plants flétris (en ordonné) par nombre de jours après inoculation (en abscisse). Les graphes sont présentés par souche. L'apparition du flétrissement s'échelonne selon le phylotype où l'infection par les souches du phylotype IIB-1 apparaît en premier (9-12 JAI), suivi de l'infection par les souches du phylotype I (12-16 JAI), et de l'infection par les souches du phylotype III (16-23 JAI).

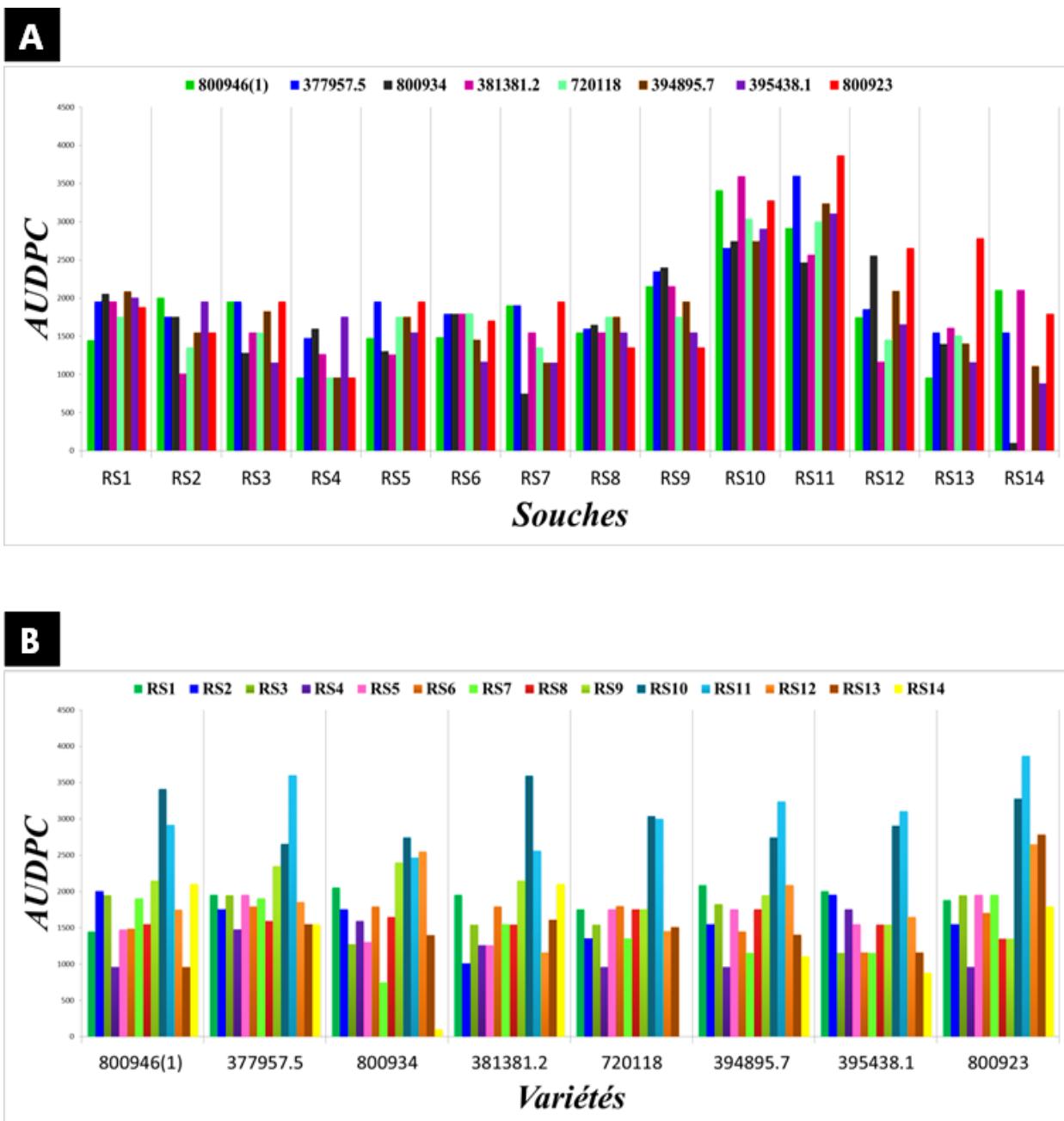


Figure 50 – Représentation de l'AUDPC : (A) AUDPC par souche, (B) AUDPC par variété. L'expression de la maladie se manifeste différemment en fonction du type de souche et selon la variété. La figure A nous montre que l'incidence du flétrissement bactérien est élevée chez les variétés de pomme de terre inoculées par les souches du phylotype IIB-1 (RS10 et RS11).

L'apparition des symptômes à l'infection aux souches du phylotype I se manifeste aux alentours de 16 JAI, sauf pour la souche I-31. La maladie progresse ensuite légèrement. Enfin, les symptômes apparaissent plus tard vers 19 JAI et en moyenne vers 23 JAI chez les plantes inoculées par les souches du phylotype III. Notons qu'entre 19 JAI et 23 JAI, les plantes ont fleuri.

Au vu de ces résultats il apparaît que le type de souche a un effet sur l'incidence du flétrissement bactérien ($p < 2e-16$), avec un développement des symptômes qui s'échelonnent selon le type de souche du stade végétatif à la période de floraison des plantes. Ces résultats corroborent les observations effectuées en milieu naturel. Ainsi nous confirmons que l'apparition précoce des symptômes pendant la phase de développement de la pomme de terre sont caractéristique de l'infection par le phylotype IIB-1 et les symptômes qui apparaissent plus tardivement sont associés aux souches des phylotypes I (16 JAI qui pourrait être équivalent en milieu naturel à la fin de la phase du développement des feuilles et début de tubérisation) et III (19 JAI correspondrait au début de la floraison). Différents travaux ont également rapporté des différences de l'agressivité chez les souches du même biovar, race et phylotype chez une même espèce d'hôte (Cellier & Prior 2010 ; Fock *et al.* 2005 ; Jaunet & Wang 1999 ; Lebeau *et al.* 2013 ; Siri *et al.* 2011) et que le comportement des variétés peut varier selon le type de souches (Champeiseau *et al.* 2009 ; Hanson *et al.* 1996 ; Wang *et al.* 1998). Le résultat du test de comparaison des moyennes des valeurs de la variable AUDPC pour le facteur souche montre une différence significative entre les haplotypes au sein d'une même population, entre souches de population différente ($p > 0.05$). Ce qui signifie que l'expression de la maladie chez la plante est différente entre haplotypes et entre populations (**Figure 50**).

S'agissant de la recherche d'infections latentes, les isolements ont principalement porté sur les plantes asymptomatiques inoculées par les souches du phylotype III. Aucune colonie bactérienne n'a poussé sur le milieu de Kelman montrant que les plantes asymptomatiques testées ne présentent pas d'infection latente au niveau des vaisseaux conducteurs. Cette information nous est essentielle pour supporter l'hypothèse de non transmission des souches du phylotype III par les semences tubercules. En effet, plusieurs études ont confirmé l'aptitude des souches à des infections latentes dans les tubercules mais principalement associées aux souches 'Brown rot' (IIB-1) (French *et al.* 1998 ; Granada 1988 ; Priou *et al.* 2001 ; Silveira *et al.* 2007). Ce qui explique l'intensification de la propagation des souches IIB-1 au plan mondial. Toutefois, de telle information n'a pas encore été observée chez les souches du phylotype III qui étaient prépondérantes dans la région Vakinankaratra avant les épidémies associées aux souches IIB-1. En considérant le flux important de semences entre les différents ZAEs combiné aux informations fournies par la structure génétique des populations, nous sommes arrivés au chapitre précédent à conclure que la dispersion des souches du phylotype III n'implique pas la transmission directe par les semences. L'absence d'infection latente chez les plantes asymptomatiques renforce cette conclusion qui, compte tenu de l'importance épidémiologique nécessite d'autres essais de validation en condition réelle.

CONCLUSION PARTIELLE

Nous avons mis en évidence que les variétés cultivées dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux de Madagascar sont sensibles aux souches des phylotypes I, IIB-1 et III prévalentes dans le bassin.

L'apparition et l'expression du flétrissement bactérien se manifestent différemment selon les types de souches et selon les variétés. Les plantes asymptomatiques inoculées par les souches du phylotype III ne présentent aucune infection latente soutenant ainsi notre hypothèse de non transmission des souches du phylotype III par les semences tubercule. Ainsi à la lumière de ces résultats, les souches du ceRs prévalentes sur les Hauts Plateaux malgaches présentent une variabilité phénotypique dont les périodes d'apparition de symptômes sur les cultures de pomme de terre dans les champs peuvent donner une indication globale sur la lignée phylogénétique des souches associées au symptôme, notamment pour la région Vakinankaratra.

Autre constatation stratégique, dans nos conditions expérimentales les variétés 720118 (Jaingy) et 800934 (Miova) montrent une très forte résistance aux souches réunionnaises I-31. Considérant le fait que les variétés testées étaient supposées montrer certaines propriétés de résistance au flétrissement bactérien (dont on ne connaît pas à quel type de souche), ce résultat attire l'attention pour avancer l'hypothèse qu'il y ait eu une résistance partielle chez ces variétés, même faible, qui était largement suffisante compte tenu de l'absence avérée de transmission par le tubercule. On pourrait supposer en outre que le sequevar I-31, qui jusqu'ici non identifié dans les bassins de production des Hauts Plateaux, n'a pas encore eu le temps de faire face aux gènes de résistance présentes chez les variétés 720118 et 800934 pour contourner sa résistance. Pour les autres variétés, elles sont tout simplement sensibles. Comme jusqu'à aujourd'hui aucune variété connue ne présente une résistance totale aux souches du ceRs, les stratégies de sélection vont conditionner la durabilité des résistances obtenues.

Tableau 14 – Incidence du flétrissement bactérien sur les huit variétés de pomme de testées, exprimée par la moyenne des valeurs AUDPC par traitement.

Souches	Variétés								Coefficient		
	800946(1)	377957.5	800934	381381.2	720118	394895.7	395438.1	800923	Moyenne	Ecart-type	de variation
Phylotype III	RS1	1446	1950	2052	1950	1754	2083	1999	1880	1889	206
	RS2	1999	1754	1754	1007	1348	1544	1950	1544	1613	327
	RS3	1950	1950	1278	1544	1544	1824	1152	1950	1649	318
	RS4	956	1474	1595	1259	956	956	1754	956	1238	331
	RS5	1474	1950	1303	1257	1754	1754	1544	1950	1623	271
	RS6	1485	1793	1793	1793	1798	1450	1159	1702	1621	235
	RS7	1901	1901	746	1544	1348	1152	1152	1950	1462	439
	RS8	1548	1593	1646	1544	1754	1754	1544	1348	1591	132
Phylotype II	RS9	2150	2349	2398	2150	1754	1950	1544	1348	1955	379
	RS10	3409	2654	2741	3591	3035	2745	2902	3276	3044	346
	RS11	2916	3600	2465	2561	3000	3238	3104	3866	3094	477
Phylotype I	RS12	1747	1852	2552	1159	1453	2090	1649	2650	1894	516
	RS13	956	1544	1397	1609	1506	1401	1156	2783	1544	545
	RS14	2104	1544	888	2104	0	1107	550	1793	1261	760
		Moyenne	1860	1993	1758	1791	1643	1789	1654	2071	1820
		Ecart-type	673	562	619	673	747	627	687	803	569
		Coefficient de variation	0.36	0.28	0.35	0.38	0.45	0.35	0.42	0.39	0.31

Tableau 15 – Résultat de l’analyse de variance des effets du facteur ‘variété’ et du facteur ‘souche’ sur la variable ‘AUDPC’.

Source de variabilité	Df - Df residus	MS	F-value	p-value	r2 ajusté
Variété	7 - 104	318400	2.06	0.06	- 0.02
Souche	13 - 98	2589109	16.72	< 2e-16***	0.63
Variété x souche	91 - NA	154809	NA	NA	NA

Df : degré de liberté, MS : carrée moyen

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES



Le flétrissement bactérien causé par les souches du ceRs figure parmi les principales maladies bactériennes occasionnant d'importants dégâts sur les cultures et donc la perte de production dans le monde (Castillo & Plata 2016 ; Elphinstone 2005 ; Habetewold kifelew *et al.* 2015 ; Muthoni *et al.* 2012 ; Tengku Ab. Malik *et al.* 2012). Le ceRs compte de ce fait parmi les bactéries pathogènes des plantes la plus étudiée (Ade & Innes 2001 ; Mansfield *et al.* 2012). Madagascar n'est pas épargné par cette redoutable maladie et le flétrissement bactérien demeure l'un des plus dévastateurs des cultures de pomme de terre dans les bassins de production de pomme de terre (Andriamihaja 2013 ; GRET/CITE 2000 ; Rabakoarihanta & Rakotondramanana 1984 ; Rakotondramanana 1984) (données FIFAMANOR 2013). Des efforts ont été réalisés pour sélectionner de manière empirique des variétés de pomme de terre résistantes qui ont été déployées pour contrôler la maladie. Cependant, cette résistance au flétrissement bactérien se retrouve aujourd'hui inefficace. La variabilité génétique de l'agent pathogène et le contournement de la résistance sont connus chez les agents phytopathogènes pour compromettre le déploiement de variétés résistantes (Ade & Innes 2001 ; McDonald & Linde 2002a ; McDonald & Linde 2002b). La forte variabilité génétique et phénotypique des souches du ceRs (Cellier & Prior 2010 ; Fegan & Prior 2005 ; Fock *et al.* 2005 ; Jaunet & Wang 1999 ; Lebeau *et al.* 2013 ; Siri *et al.* 2011) contribue à l'adaptation rapide et au contournement de la résistance, compromettant ainsi dans un court laps de temps les propriétés de résistance des variétés déployées. L'épidémie de flétrissement bactérien qui sévit dans plusieurs ZAEs des Hauts Plateaux connaît actuellement une évolution rapide et c'est la plus grave jamais observée auparavant. Avant ces travaux de thèse, les données expérimentales font défauts sur l'épidémiologie du flétrissement bactérien dans les bassins de production de pomme de terre. Pour envisager une méthode de gestion de lutte, voire l'éradication de la maladie et pour orienter la sélection de nouvelles résistances à ces souches épidémiques, une connaissance de la variabilité génétique et de la structure des populations des souches du ceRs est indispensable. Ainsi, l'objectif initial de cette thèse a été de caractériser la diversité génétique des souches du ceRs prévalant dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches et de décrire les souches responsables de l'épidémie. Pour ce faire, il a été primordial de disposer d'outils de génotypage à fort pouvoir discriminant capable de détecter le polymorphisme génétique et les relations entre les souches.

EPIDÉMIOLOGIE MOLECULAIRE : RS3-MLVA16 ET RS2-MLVA9, DEUX PUISSANTS OUTILS HAUTEMENT RESOLUTIFS POUR CARACTERISER RESPECTIVEMENT LES SOUCHES DU PHYLOTYPE III ET DU PHYLOTYPE II.

Les avancées de la biologie moléculaire ont élargi les possibilités de choix d'outils de génotypage en microbiologie, et s'agissant des bactéries pathogènes en particulier avec davantage d'application en épidémiologie végétale. La stratégie du génotypage consiste à mettre en évidence les variations génétiques de marqueurs moléculaires et d'associer à ces variations la dynamique du développement d'une maladie. Parmi l'ensemble des avancées techniques offertes, nous avons choisi l'approche MLVA combinée avec l'approche MLSA/MLST pour atteindre les objectifs définis dans cette thèse. Ma première contribution a été de développer au cours de ce travail de thèse :

- un nouveau schéma de génotypage 'RS3-MLVA16' pour analyser les souches du phylotype III. Le schéma est composé de 16 TR loci dont 5 loci TR retenus du schéma RS3-MLVA11 de N'Guessan *et al.* (2013) et 11 loci TR nouvellement identifiés.
- un schéma de génotypage 'RS2-MLVA9' pour analyser les souches du phylotype IIB-1. Le schéma est composé de 9 loci TR sélectionnés du schéma RS2-MLVA12 développé par N'Guessan *et al.* (2013) et des 5 loci TR identifiés par Parkinson *et al.* (2013).

Comparé avec le schéma MLSA/MLST qui est constitué de 7 gènes (dont 6 sont des gènes de ménage et 1 gène associé à la virulence, Wicker *et al.* 2012), les deux schémas **RS3-MLVA13 et RS2-MLVA9 sont hautement résolutifs** avec une congruence avec les données MLSA/MLST. Cette capacité à différencier les souches entre elles trouve son origine dans le polymorphisme élevé de la longueur des répétitions en tandem qui est dû à une recombinaison ou à des mutations par glissement relativement élevées dans un cours laps de temps (Bi & Liu 1996 ; Bichara *et al.* 2006 ; Gemayel *et al.* 2010 ; Richard & Pâques 2000 ; Van Belkum *et al.* 1998). Généralement conservées chez les souches et populations génétiquement apparentées (Lindstedt *et al.* 2013), l'analyse de la différence entre les loci TR a **fourni des informations sur le degré de diversité génétique** des souches actives dans les bassins de production et a permis de **grouper les souches épidémiologiquement liées** dans un complexe clonal, où elles se différencient entre elles par un locus TR. Le fait que les souches soient groupées dans un complexe clonal signifie qu'elles ont divergées à partir d'un haplotype commun supposé être le fondateur (Francisco *et al.* 2009), une information essentielle qui **nous a permis d'identifier les types de souches impliquées dans l'épidémie et de tracer les sources d'inoculum** (Lindstedt *et al.* 2013). La concordance épidémiologique entre deux souches peut cependant être mise en cause par l'homoplasie des loci TR, i.e. l'assignation de deux souches à un complexe clonal peut être erronée (Estoup *et al.* 2002 ; Reyes *et al.* 2012). L'homoplasie des loci TR désigne une ressemblance dans le nombre de motifs répétés chez deux loci homologues de deux souches qui ne divergent pas d'un même ancêtre. Cette perte d'information pourrait être levée par le séquençage des loci homoplasiques ou l'utilisation de plusieurs marqueurs (Estoup *et al.* 2002 ; Reyes *et al.* 2012). Au cours du développement des schémas RS3-MLVA16 (présenté dans le chapitre I) et RS2-MLVA9, une évaluation rigoureuse a été faite dans le choix des loci pour minimiser l'effet de l'homoplasie de taille. Nous avons évité d'utiliser des loci qui présentent une identité de séquence inférieure à 80 % ou qui sont composés de deux séries de séquences répétées qui sont adjacents ou qui se chevauchent. Également, nous avons sélectionné le plus de loci TR possible avec nos critères de sélection sur le génome complet de la souche de référence du phylotype III cible.

Le schéma RS3-MVA16 que nous avons développé est suffisamment robuste à la fois pour (i) différencier les souches géographiquement éloignées du phylotype III et (ii) relier les souches épidémiologiquement liées à l'échelle des bassins de production, des ZAEs et des parcelles. Concernant les souches de phylotype IIB-1, le schéma RS2-MLVA9 est particulièrement discriminant pour différencier ces souches monomorphes et relier les souches épidémiologiquement actives à différentes échelles : dans les bassins, les ZAEs et les parcelles. De plus les données du génotypage MLVA a permis d'évaluer la diversité des souches du ceRs prévalentes dans les bassins de production des Hauts Plateaux, de mesurer la variabilité génétique au sein et entre les populations, de décrire la structure des populations repérées et les flux de gènes pour dresser le profil épidémiologique des souches de l'écotype 'Brown rot' et de l'écotype 'Africain' présentes dans les bassins de production de pomme de terre des Hauts Plateaux malgaches.

La robustesse des deux schémas RS3-MLVA16 et RS2-MLVA9 est éprouvée et attestée par leur application à une large collection de souches (n = 280 pour le phylotype III et 285 pour le phylotype IIB-1) prélevées dans divers zones agroécologiques géographiquement distantes (bassins, ZAEs), dans des zones voisines (ZAEs, sites) et dans une même parcelle ; mais également des souches prélevées sur différentes espèces d'hôtes (**Annexe 1**). Le schéma RS3-MLVA16 a été aussi testé en génotypant 63 souches de la collection mondiale de phylotype III et le schéma RS2-MLVA9 a été testé en génotypant 30 souches de la collection mondiale de phylotype IIB-1. L'avantage de la méthode MLVA réside sur le fait qu'elle est appropriée pour le génotypage de grandes collections de souches à des coûts

considérablement plus faibles que la méthode MLSA/MLST. La méthode MLVA a largement fait preuve de son utilité comme outil d'investigation épidémiologique chez de nombreuses bactéries phytopathogènes d'importance agronomique comme *Xanthomonas citri* (Bui Thi Ngoc *et al.* 2009 ; Leduc *et al.* 2015 ; Pruvost *et al.* 2015 ; Vernière *et al.* 2014), *Pseudomonas syringae* (Ciarroni *et al.* 2015), *Xanthomonas oryzae* (Poulin *et al.* 2015 ; Zhao *et al.* 2012), *Clavibacter michiganensis* (Zaluga *et al.* 2013), *Erwinia amylovora* (Bühlmann *et al.* 2014) et *Candidatus liberibacter* (Katoh *et al.* 2011) et chez notre modèle *Ralstonia solanacearum* (Parkinson *et al.* 2013).

A l'issu de ce travail :

- Un outil moléculaire discriminant, robuste et s'appliquant à différentes échelles spatiotemporelles est disponible pour étudier le flétrissement bactérien provoqué par le phylotype III. Le schéma RS3-MLVA16 est proposé à la communauté scientifique mondiale pour le génotypage des souches du ceRs de l'écotype 'Africain' qui est présent en Afrique et dans les îles de la zone SOOI.
- Le schéma RS2-MLVA9 est proposé pour le génotypage des souches du ceRs de l'écotype 'Brown rot'.

Les deux outils que nous proposons sont appropriés pour une étude d'épidémiologie moléculaire.

DEUX MODELES EPIDEMIOLOGIQUES CONTRASTES AU SEIN DU CERS : L'ECOTYPE 'BROWN ROT' ET L'ECOTYPE 'AFRICAIN'

Les études d'épidémiologie moléculaire de ces deux écotypes du ceRs identifiés à Madagascar ont été réalisées grâce au génotypage MLVA combiné avec des études de génétique des populations. Ces investigations nous ont permis d'accéder à de précieuses informations concernant la biologie des populations des souches du ceRs de l'écotype 'Brown rot' et de l'écotype 'Africain' prévalant dans les bassins de production pour parvenir à caractériser l'épidémiologie du flétrissement bactérien. La distribution des haplotypes identifiés par les schémas RS3-MLVA16 et RS2-MLVA9 dans les différents ZAEs ainsi que les relations génétiques entre ces haplotypes ont été révélées par la construction des arbres couvrants minimum (ACM) (Francisco *et al.* 2009) (Figures 31, 32, 41). Les souches épidémiologiquement liées sont rassemblées dans un complexe clonal. L'analyse de ces ACM nous a renseigné sur les haplotypes prédominants qui pourraient être des haplotypes fondateurs ; le nombre de loci variant qui relient les haplotypes entre eux et la structure du complexe clonal ont donné une indication sur l'ancienneté de la maladie/épidémie ; les couleurs attribuées à chaque cercle renseignent sur les ZAEs où l'haplotype est présent et offre une vue sur la dispersion. En joignant toutes ces données avec les données biologiques et d'enquêtes épidémiologiques, nous sommes arrivés à tracer les sources d'inoculum possibles et le mode de dispersion. Les résultats ont ainsi montré que : **(i)** Les souches malgaches de l'écotype 'Brown rot' (IIB-1) sont liées aux souches 'Brown rot' réparties dans le monde. Elles sont groupées en 2 complexes clonaux dont un majeur où 3 haplotypes : MTII-9, MTIII-3 et MTII-2 pourraient être des haplotypes fondateurs suggérant *ad minima* 3 introductions de souches génétiquement discernables au sein du IIB-1, reconnu comme un groupe à très forte clonalité. La structure du complexe clonal montre une structure en étoile (avec plusieurs liens de SLV qui divergent de l'haplotype présumé fondateur) caractéristique d'une épidémie à expansion clonale récente. Plusieurs haplotypes sont partagés par différents ZAE, ce qui est expliqué par une dispersion des souches suite à la circulation des tubercules semences infectées. **(ii)** Les souches malgaches de l'écotype 'Africain' (phylotype III) ne présentent aucune parenté génétique forte avec les souches des autres pays 'Africain'. Avec les critères de la MLVA, un haplotype est épidémiologiquement lié à un autre haplotype insulaire de La Réunion. Les souches malgaches sont groupées en 11 complexes clonaux distants de plusieurs loci qui présentent chacun une structure clonale, caractéristique d'une maladie endémique. En majorité, les haplotypes ne sont pas partagées entre les ZAEs suggérant très fortement l'hypothèse que les souches ne sont pas transmises par les semences.

Les données de génétiques des populations ont été utilisées pour mesurer la diversité au sein de chaque ZAE et la différenciation génétique entre les différentes collections. Cette analyse a livré un aperçu sur les mécanismes de diversification intra- et inter population. Les informations obtenues nous a permis de confirmer les hypothèses posées sur les possibles flux de gènes entre les différentes ZAEs et de définir la structure des populations. Ces données nous renseignent sur le mode de diversification des souches du ceRs qui est principalement assuré par des événements mutationnels. Pour les souches de phylotype III, les différentes collections sont fortement différenciées renforçant encore l'hypothèse de l'absence de transmission par les tubercules.

La structure génétique et la structure spatiale de la collection globale sont identifiées par une approche bayésienne afin d'identifier sans *a priori* le nombre de populations qui existent dans la collection. Cette approche nous a permis de mieux définir la dispersion des souches entre les populations et également au

niveau des ZAEs. Ces données ont été combinées avec celles obtenues précédemment pour confirmer les hypothèses formulées suivantes : **(i)** les souches du phylotype IIB-1 sont transmises par les tubercules semences, **(ii)** les souches du phylotype III ne sont pas transmises par les tubercules. L’analyse de la structure des populations a confirmé chacune des hypothèses où les populations ($n = 3$) des souches du phylotype IIB-1 sont généralement structurées selon les échanges de tubercules semences entre les ZAEs et les populations des souches du phylotype III ($n = 11$) sont structurées géographiquement sans impliquer le mode de transmission par le tubercule.

Ainsi, nous avons effectué :

- Une première description des souches IIB-1 à Madagascar en donnant les éléments de biologie des populations ;
- Une première étude mondiale portant sur la biologie des populations souches du phylotype III ;
- Une première évaluation de la résistance variétale au phylotype III chez la pomme de terre ;

Enfin, c'est la première fois qu'on étudie en même temps deux modèles épidémiologiques qui coexistent. Nous avons mis en évidence que l'écotype 'Brown rot' et l'écotype 'Africain' présentent deux modèles épidémiologiques différents, que nous résumons sous forme de tableau comparatif (**Tableau 16**). Notons que les marqueurs utilisées ne sont pas identiques pour génotyper chaque écotype mais la comparaison permet néanmoins d'avoir une vue globale sur la disparité des deux modèles.

Nous avons obtenu des informations sur les éléments d'épidémiologie des modèles où nous avons pu expliquer que l'épidémie du flétrissement bactérien qui sévit dans les bassins de production de pomme de terre est attribué par l'émergence des souches introduites IIB-1. Les phylotypes IIB-1 ont la capacité de faire des infections latentes observées dans la majorité des isolements que nous avons fait, la dispersion des souches IIB-1 suit le flux de distribution de semences. Donc le mode de transmission se fait par le tubercule, ce qui lui donne une vocation à faire des épidémies. Les souches IIB-1 sont des mauvais compétiteurs dans le sol. Cependant, les souches du phylotype III sont associées à l'endémie. Elles ne font pas d'infection latente. Un constat confirmé par des travaux parallèles réalisés par d'autres équipes qui ont montré qu'il n'y a pas d'infection latente ni sur l'aubergine et ni sur la tomate avec le phylotype III. De plus compte tenu des données obtenus en biologie des populations par rapport la circulation des tubercules dans les ZAE, il est fort probable qu'il n'y ait pas d'infection latente dans les tubercules pour le phylotype III. Ce qui indique qu'il n'a pas de transmission par les tubercules. Bien que ces souches soient présentes en permanence dans les zones d'endémie, le phylotype III n'a pas de vocation à faire des épidémies.

Nous avons vu que les deux modèles sont très différents. A notre connaissance, c'est une première étude d'épidémiologie moléculaire effectuée chez les souches du ceRs.

Tableau 16 – Tableau comparatif de la diversité génétique et épidémiologique des deux écotypes modèles : écotype ‘Brown rot’ et écotype ‘Africain’ présents dans les Hauts Plateaux de Madagascar.

Souches malgaches		
	Ecotype Brown rot	Ecotype Africain
DIVERSITE GENETIQUE ET STRUCTURE DES POPULATIONS		
Outils moléculaire	RS2-MLVA9	RS3-MLVA16
Phylotype	IIB1	III
Sequevar	1	54, 55, 56, 57
Complexe clonal	2	11
Relation avec les souches de la collection mondiale	(ACM1) <ul style="list-style-type: none"> • MTII-9 partagé avec Nigeria, Réunion, Guinée, Rwanda, Maroc, Suède, Guadeloupe, Espagne, Turquie et Angleterre, • MTII-6 partagé avec la Norvège, • MTII-8 partagé avec France et Israël, • Compris dans un même CC avec les souches de Belgique, Haïti, Australie, Zimbabwe, Portugal, Inde, Chypre, Sri Lanka, Egypte, Taiwan et Kenya, • DLV avec Chine, Uruguay, Cameroun, Ouganda, Mali. 	(ACM3) <ul style="list-style-type: none"> • Pas de relation génétique avec les autres pays du continent Africain, • MTIII-72 compris dans un complexe clonal avec les haplotypes de la Réunion (MTIII-48, MTIII-7).
Relation entre ZAEs	(ACM2) <ul style="list-style-type: none"> • MTII-9 partagé entre 8 ZAEs, • MTII-3 partagé entre 4 ZAEs, • MTII-8, MTII-4, MTII-6, MTII-13, MTII-14 partagés chacun entre 2 ZAEs. • MTII-1, MTII-7, MTII-11, MTII-15 partagés chacun entre 3 ZAEs. 	(ACM4) <ul style="list-style-type: none"> • MTIII-60, MTIII-55, MTIII-56 MTIII-53, MTIII-51, MTIII-68 partagés chacun entre 2 ZAEs.
Structuration génétique	3 populations avec une structure corrélée avec le mode de diffusion de tubercules semences (Figure 36).	11 populations structurées géographiquement (Figure 43).
Structure des populations	Epidémique avec expansion clonale dans les bassins.	Endémique avec une expansion clonale au sein de chaque ZAE.
Indice de différenciation	$F_{ST} = 0.47 / R_{ST} = 0.40$	$F_{ST} = 0.26 / R_{ST} = 0.43$
Variation intra population	52% (F_{ST}) / 59% (R_{ST})	74% (F_{ST}) / 56% (R_{ST})
Variation entre population	48% (F_{ST}) / 41% (R_{ST})	26% (F_{ST}) / 48% (R_{ST})
Diversité génétique	Etroite.	Large.
Diversité phénotypique (manifestation des symptômes)	Précoce : début du développement des feuilles.	Tardive : tubérisation et début floraison.
EPIDEMIOLOGIE		
Maladie	Epidémique	Endémique
Origine des souches	Emergence : introductions multiples	Endémique
Mode de transmission	Tubercules (infection latente)	Pas de transmission par tubercules
Dispersion	<ul style="list-style-type: none"> • Multiples contaminations dans les bassins, entre ZAEs, • Irrigation, échange de tubercules contaminé. 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitée à chaque ZAE, • Irrigation, eau de ruissellement, équipements contaminés.
Spectre d'hôte	Réduit ?	Large.
Réservoirs	Eau d'irrigation, adventices, etc.	Eau d'irrigation, adventices, etc.
Altitude	1000-2000m	1000-2000m
Facteurs étiologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Introduction et multiplication de tubercules semences infectées, • Faiblesse du système de contrôle de tubercules semences, • Pratique culturelle : division des tubercules semences, matériaux et équipements contaminés, désherbage non appliqué, etc. • Variétés sensibles : pas de résistance génétique. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pratique culturelle : division des tubercules semences, matériaux et équipements contaminés, désherbage non appliqué, etc. • Variétés sensibles : pas de résistance génétique.

EVALUATION DE LA RESISTANCE GENETIQUE DES PRINCIPALES VARIETES DE POMME DE TERRE CULTIVEES A MADAGASCAR : PAS DE RESISTANCE AUX SOUCHES MALGACHES ; RESISTANCE GENETIQUE DES VARIETES 720118 (JAINGY) ET 800934 (MIOVA) AUX SOUCHES I-31

Aujourd’hui, la résistance variétale reste la stratégie de lutte de choix contre le flétrissement bactérien. En ce qui concerne l’évaluation des propriétés de résistance des variétés cultivées à Madagascar, dans nos conditions expérimentales (artificielles) mes travaux n’ont montré aucune résistance génétique aux souches malgaches du phylotype I, IIB-1 et III ; même pour les variétés 394895.7 et 395348.1 qui ont été identifiées par Gutarra *et al.* (2015) comme résistantes respectivement aux souches du phylotype IIB-1 et phylotype I. Cependant, les variétés 720118 et 800934 ont montré une résistance très élevée à la souche RUN0577 qui appartient au groupe I-31. Le phylotype I-31 est un groupe de souches prédominant dans les îles du Sud-Ouest de l’océan Indien (Yahiaoui 2016) qui n’a pas été identifié dans ma collection car ce groupe de souches se trouvent associé au climat chaud des plaines, des zones que nous n’avons pas prospectées.

Il est à noter que notre expérimentation a été conçue pour détecter de niveau de résistance génétique élevée (très forte concentration en inoculum de l’ordre de 10^8) qui pourrait être différents des conditions réelles. Cette évaluation n’étant que préliminaire, il conviendrait de réaliser d’autres d’évaluations en condition réelle pour évaluer les propriétés de résistance partielle de ces variétés. A cet effet vu que chaque ZAE est infestée par une population spécifique à la zone géographique, il serait intéressant de quantifier le potentiel d’inoculum de chaque type de souche représentatif de la diversité des souches du ceRs prévalant dans chaque ZAEs, et réaliser une évaluation de la résistance sur une gamme de concentration en inoculum afin d’estimer de façon approximatif le degré de résistance de chaque variété. Les résultats obtenus pourront orienter la prise de décision concernant le déploiement des variétés dans chaque ZAE. Il conviendrait aussi d’explorer la diversité génétique des souches dans les autres zones de production de pomme de terre que nous n’avons pas pu couvrir dans nos prospections, comme les régions d’Alaotra Mangoro, Boeny, Analamanga, Vatovavy fitovinany.

Ainsi, les résultats de ce travail de thèse viennent enrichir les connaissances sur la diversité génétique des souches du ceRs notamment de l’écotype ‘Africain’, et sur le comportement des variétés de pomme de terre les plus cultivées vis-à-vis des souches du ceRs prévalentes à Madagascar. Ces données intéresseraient les sélectionneurs de FIFAMANOR et du CIP pour orienter la création et la sélection de variétés résistantes notamment vis-à-vis de l’écotype ‘Africain’ qui est endémique.

PRIORITES DANS LA STRATEGIE DE LUTTE CONTRE LE FLETRISSEMENT BACTERIEN DU AUX SOUCHES DE QUARANTAIN IIB-1

Les données obtenues ont sans doute un grand intérêt académique, tout en s'ouvrant à des perspectives de recherche appliquée au développement de méthode de gestion du flétrissement bactérien. Ces travaux ont permis d'identifier la présence des souches IIB-1 – qui est un organisme nuisible réglementé faisant l'objet de quarantaine dans divers pays (EPPO 2015 ; USDA/APHIS 2005), dans toutes les ZAEs des bassins de production de pomme de terre. La présence et la dispersion d'un tel agent pathogène posent problème notamment pour la filière pomme de terre à Madagascar.

Compte tenu du fait que plusieurs études académiques ont été réalisés sur le IIB-1 sur la biologie de la bactérie, sur la génomique comparative, la transcriptomique ; et de l'urgence phytosanitaire à Madagascar, les orientations des perspectives sont axées essentiellement agronomiques pour Madagascar qui consiste à instaurer des mesures d'urgence pour l'assainissement de la filière semences pomme de terre. A ce titre, il faut pouvoir stopper et garantir l'éradication de cette souche en premier lieu pour limiter des pertes de production en pomme de terre au niveau national. Une telle opération est possible mais nécessite une stratégie de lutte intégrée sans faille.

Nous avons pu dresser le profil épidémiologique des souches IIB-1 dans les bassins de production. Il a révélé que le mode de diffusion des tubercules semences dans les bassins de production influe sur la structure génétique des populations des souches du phylotype IIB-1. Cette observation suppose une dispersion des souches assurée par des échanges de tubercules semences qui présentent des infections latentes. Un mode de propagation reconnu conditionnant son succès invasif à l'échelle mondiale (French *et al.* 1998 ; Granada 1988 ; Priou *et al.* 2001 ; Silveira *et al.* 2007). L'incidence de la maladie est également liée à la sensibilité des variétés déjà déployées vis-à-vis de ces souches particulièrement agressives. Ces souches peuvent être hébergées dans les mauvaises herbes et également transmises par l'eau d'irrigation contaminée. La connaissance de ces informations permet de mieux prendre en charge le flétrissement bactérien qui nécessite une approche coordonnée entre les différents acteurs de la filière pomme de terre. Ainsi un modèle de plan pour le contrôle de ces souches est proposé ci-après.

Communication

L'approche clé de ce programme de contrôle et d'éradication est avant tout la communication de ces résultats de recherche aux différents acteurs de la filière. Il s'agit de les informer sur l'épidémiologie du flétrissement bactérien dans les bassins de production en vue de les sensibiliser à réfléchir sur les différentes risques et points de contrôle à maîtriser pour la gestion du flétrissement bactérien et de les inciter à élaborer un plan d'action de contrôle intégré contre la maladie.

Assainissement de la filière de production de tubercules semences

Comme les souches IIB-1 se transmettent par les semences, le premier facteur à respecter consiste à utiliser des semences saines certifiées. Dans ce contexte, il faut d'une part renforcer le système de production de tubercules semences saines et de certification des semences au niveau national, et d'autre part renforcer le système de contrôle végétal au niveau national. En effet, la faiblesse des systèmes de contrôle et de certification des semences figure parmi les facteurs étiologiques qui peuvent compromettre les actions d'éradication du flétrissement bactérien entreprises en aval. Nous avons pu mettre en évidence dans notre travail que les souches IIB-1 ont été introduites à Madagascar. Ce qui indique une faille au niveau du contrôle et de réglementation de l'importation de pomme de terre ou d'autres plantes matériels végétaux susceptibles d'être réservoirs d'inoculum.

Mesures prophylactiques

La phase d'assainissement du flétrissement bactérien requiert aussi des bonnes pratiques culturales intégrant les mesures prophylactiques. Comme il a été dit précédemment, l'utilisation de tubercules semences exempts du ceRs est une des premières mesures à adopter. Ensuite, il est nécessaire de tenir compte de l'historique de la parcelle de culture. A ce propos étant donné que les souches du phylotype IIB-1 ont été isolées du bident qui est une mauvaise herbe commune des parcelles de cultures, il est indispensable de procéder au nettoyage, au désherbage et au brûlage des débris sur des parcelles connues comme infectées des souches du ceRs. Sur le terrain, le flétrissement du bident sur une parcelle peut être utilisé comme indicateur pour dépister la présence d'inoculum. En se basant sur la littérature, il est indispensable de faire l'inventaire des mauvaises herbes communes sur les terrains de cultures pour identifier les potentiels réservoirs d'inoculum.

En tenant compte du fait que la bactérie IIB-1 est adaptée au froid et développe des symptômes à des températures comprises entre 24 et 30°C (CABI 2016 ; Kelman 1953), le dépistage des symptômes sur des tubercules semences qui peuvent présenter des infections latentes peut être réalisé en les stockant dans un endroit chaud (28-30°C) (Nortjé 2015) favorisant l'apparition des symptômes chez les tubercules infectées (French 1985).

La pratique de la jachère, de la rotation des cultures ou du pâturage sont des solutions préconisées pour rompre le cycle d'infection. Par une rotation des pâturages minimum de deux ans et demi accompagnée de l'utilisation de semences saines et l'application d'une politique de quarantaine effective ont permis l'éradication du flétrissement bactérien causé par les souches IIB-1 en Australie (Kloos *et al.* 1986). Le choix des cultures à adopter pour la rotation doit se baser sur des cultures non hôtes des souches IIB-1. Pour aider les cultivateurs à établir la combinaison des cultures pour la rotation, il est primordial de dresser une liste des cultures potentiellement hôtes des souches du ceRs. Enfin, comme nous avons détecté la présence des souches IIB-1 dans l'eau d'irrigation, il serait judicieux de mettre en place un système de traitement préventif pour éviter la contamination, puis de programmer des prélèvements dans les eaux d'irrigations des principaux centres de production de tubercules semences pour détecter la présence de ces souches. En effet, les souches IIB-1 peuvent survivre dans l'eau (état planctonique) et plus généralement l'eau d'irrigation (gravitaire) constitue une voie de propagation des souches du ceRs (Álvarez *et al.* 2008 ; Elphinstone 2005). A cet effet, il serait opportun de prohiger de jeter les fanes de cultures ou de nettoyer les équipements et matériels de cultures contaminés dans les eaux d'irrigation ou dans la rivière.

Les matériels de cultures devraient être désinfectés après utilisation. Comme désinfectant on peut utiliser l'hypochlorite de sodium ou eau de javel (Muthoni *et al.* 2012). Cependant, il faut réfléchir d'une part, à une stratégie pour adapter cette technique au niveau des zones rurales, et d'autre part penser à un système de recyclage de ce produit chimique pour ne pas polluer l'environnement ; ou sur la base d'une bibliographie adopter d'autres alternatives déjà développées concernant la décontamination des matériels agricoles. Pour la plantation, la division du tubercule semence est à éviter.

Au champ, le dépistage des symptômes de flétrissement est nécessaire afin de réaliser une sélection positive et négative avant la récolte et de détruire les plantes infectées. Pour cela, il est important de renseigner les paysans sur la reconnaissance des symptômes. En effet, lors de nos missions de prospection nous avons constaté que les paysans confondent les symptômes du mildiou (*Phytophtora infestans*) et ceux du flétrissement bactérien.

APPROFONDIR LES CONNAISSANCES SUR LE PHYLOTYPE III ET ERIGER EN MODELE D'ETUDE LA CAPACITE A DEVELOPPER DES INFECTIONS LATENTES

Les souches phylotype III ne constituent pas jusqu'à présent de problème phytosanitaire majeur et ne pouvant pas être éradiquer immédiatement, les perspectives agronomiques pouvant être envisagées concernent la résistance variétale. Il s'agit de vérifier s'il existe une résistance partielle chez les variétés cultivées de pomme de terre.

Les perspectives se situent surtout au niveau académique, il s'agit d'approfondir les connaissances sur le phylotype III. En effet, nous avons très peu de données et qui sont fragmentaires sur le plan académique du phylotype III : par exemple sur la survie des souches dans l'environnement ou les processus infectieux. Ainsi les perspectives académiques reposent sur l'étude du compartiment naturel vs cultivé, la vérification expérimentale des faisceaux d'information sur l'absence d'infection latente : est-ce seulement les souches de Madagascar qui ne font pas d'infection latente ou c'est généralisé chez toutes les souches phylotype III, provenant d'autres pays. Une fois qu'il y a certitude que le phylotype III ne fait pas d'infection latente, il peut devenir un modèle d'étude pour comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent les infections latentes (III vs IIB-1), les composants du pouvoir pathogène et les déterminants génétiques.

Cependant, étant donné d'une part qu'un seul génome disponible n'est disponible à ce jour pour le phylotype III (ce qui limite les travaux académiques), d'autre part au vu de la grande diversité génétique des souches du phylotype III dans notre collection (qui sont très différent de la souche CMR15), il y a nécessité de disposer de génomes de ce groupe pour aborder la génomique comparative et éventuellement l'approche transcriptomique RNAseq pour répondre à des questions de phylogénie, par exemple pour supporter la similarité entre les phylotypes I et III (Prior *et al.* 2016 ; Safni *et al.* 2014).

ET DEMAIN...

A l'issu de ma thèse, les connaissances et les outils d'exploration acquis seront utilisées pour mettre en place un système d'épidémosurveillance des souches causant le flétrissement bactérien à Madagascar en collaboration avec le centre CIRAD-3P (Saint Pierre, La Réunion), le centre FIFAMANOR (Antsirabe, Madagascar) et le FOFIFA (Antananarivo, Madagascar). Ce projet est une composante du programme Epibio-OI qui se concentre sur l'épidémosurveillance et le contrôle biologique dans les îles de la zone SOOI. Les objectifs sont de contrôler la dissémination de l'inoculum au plan national et entre les pays de la zone SOOI et de contribuer à l'amélioration de la production par la formulation de gestion intégrée du flétrissement bactérien appropriée.

- La première approche consisterait à instaurer une stratégie d'assainissement de la filière pomme de terre incluant des actions conjointes d'informations et de formation sur l'épidémiologie des souches ceRs et l'instauration d'un ensemble de mesures basées sur les bonnes pratiques culturelles et le contrôle de l'état sanitaire des plants aux différentes étapes de la filière pomme de terre. Pour la production de tubercules semences de base, il faut instaurer un schéma de certification avec vérification de l'état sanitaire des plants aux différentes étapes de la production, à l'aide de méthodes sérologiques ou moléculaires adaptées. D'autres mesures complémentaires doivent être prises comme le diagnostic pré-culture de la présence d'inoculum par l'indexage biologique, l'épidémosurveillance au champ avec la possibilité d'identifier rapidement la

maladie par des méthodes utilisables sur site comme la LAMP (méthode déjà publiée chez le ceRs, à adapter), ainsi que la vérification post-récolte de l'absence du ceRs. S'agissant de ce dernier point, bien que nous ayons un faisceau d'information allant dans ce sens, nous devons confirmer que les autres souches du ceRs du phylotype III et I ne présentent pas d'infections latentes dans les semences de pomme de terre, au même titre que les souches IIB-1 ('Brown rot').

- La deuxième approche serait de poursuivre la collection des souches du ceRs dans les différentes zones non prospectées dans le cadre de la thèse (Nord, Ouest, Est, Centre, Sud) combinée à des enquêtes épidémiologiques, et le prélèvement sur les plantes soupçonnées d'être un réservoir potentiel d'inoculum. A ce propos, notons au passage que le ceRs héberge des souches génétiquement et phénotypiquement très diverses et sont capables d'infecter une large gamme de plantes dont les cultures d'intérêts agronomiques comme la tomate, l'aubergine, le haricot, le tabac, le géranium, etc. Une typologie de la distribution de la diversité génétique des souches du ceRs à Madagascar paraît indispensable afin de continuer à caractériser la structure des populations des souches du ceRs à Madagascar.

Enfin, les données générées par ma thèse concernant la clarification de la diversité génétique et la structure des populations sur les Hauts Plateaux serviront de référentiel pour des futures études sur la dynamique des populations des souches au niveau national, sur leur dispersion au niveau de la zone SOOI et également l'évaluation de leur comportement au champ vis-à-vis des variétés de pomme de terre et d'autres cultures de rente.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aanensen D, and Spratt B. 2005. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* 33:W728-733. DOI:10.1093/nar/gki415.
- Achtman M. 2008. Evolution, Population Structure, and Phylogeography of Genetically Monomorphic Bacterial Pathogens. *Annual Review of Microbiology* 62:53-70. DOI:10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.
- Ade J, and Innes RW. 2001. Resistance to Bacterial Pathogens in Plants. *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Agrios G. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Science.
- Agrios G. 2008. Transmission of plant diseases by insects. *Encyclopedia of Entomology*:Springer, 3853-3885.
- Ailloud F, Lowe T, Cellier G, Roche D, Allen C, and Prior P. 2015. Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity. *BMC Genomics* 16:1-11. DOI:10.1186/s12864-015-1474-8.
- Akiew E, and Trevorrow P. 1994. Management of bacterial wilt of tobacco. Aciar proceedings: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Akiew E, Trevorrow P, and Tonello P. 1993. Management of bacterial wilt of tobacco. Aciar proceedings. Australian Centre for International Agricultural Research. p 270-270.
- Alim MA, Larissa L, Gulnara T, Tatyana M-M, Yerlan P, Sarkis Z, Georgiy D, Easterday WR, Matthew NVE, Paul K, Stephen CF, Jason KB, Martin H-J, and Ted H. 2010. Historical Distribution and Molecular Diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerging Infectious Disease journal* 16:789. DOI:10.3201/eid1605.091427.
- Álvarez B, López M, and Biosca E. 2008. Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology* 154:3590-3598. DOI:10.1099/mic.0.2008/019448-0.
- Álvarez B, Biosca EG, and López MM. 2010. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology Volume 1*.
- Andriamihaja A. 2013. Madagascar: Les paysans cultivent des pommes de terre pour combler le manque du riz. Dépêche de nouvelles agricoles africaines. ARH.
- Ateka E, Mwang'Ombe A, and Kimenju J. 2001. Reaction of potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya. *African Crop Science Journal* 9:251-256.
- ATW Consultants. 1994. Etude sur les produits d'horticulture et de floriculture d'exportation de Madagascar.
- Azevedo H, Lopes FM, Silla PR, and Hungria M. 2015. A database for the taxonomic and phylogenetic identification of the genus *Bradyrhizobium* using multilocus sequence analysis. *BMC Genomics* 16:S10.
- Baize S, Pannetier D, Oestereich L, Rieger T, Koivogui L, Magassouba N, Soropogui B, Sow M, Keita S, De Clerck H, Tiffany A, Dominguez G, Loua M, Traoré A, Kolié M, Malano E, Heleze E, Bocquin A, Mély S, Raoul H, Caro V, Cadar D, Gabriel M, Pahlmann M, Tappe D, Schmidt-Chanasit J, Impouma B, Diallo A, Formenty P, Van Herp M, and Günther S. 2014. Emergence of Zaire Ebola Virus Disease in Guinea. *New England Journal of Medicine* 371:1418-1425. DOI:10.1056/NEJMoa1404505.
- Belalcázar S, Rosales F, and Pocasangre LE. 2003. El "Moko" del plátano y banano y el rol de las plantas hospederas en su epidemiología. *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos*: 159.

- Bertolla F, Frostegård Å, Brito B, Nesme X, and Simonet P. 1999. During Infection of Its Host, the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Naturally Develops a State of Competence and Exchanges Genetic Material. *Molecular plant-microbe interactions* 12:467-472. DOI:10.1094/MPMI.1999.12.5.467.
- Bertrand S, De Lamine de Bex G, Wildemauwe C, Lunguya O, Phoba MF, Ley B, Jacobs J, Vanhoof R, and Mattheus W. 2015. Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat (MLVA) Typing Tools Improved the Surveillance of *Salmonella enteritidis*: A 6 Years Retrospective Study. *PLoS One*. 10:e0117950. DOI:10.1371/journal.pone.0117950.
- Bi X, and Liu L. 1996. A Replication Model for DNA Recombination between Direct Repeats. *Journal of Molecular Biology* 256:849-858. DOI:10.1006/jmbi.1996.0131.
- Bichara M, Wagner J, and Lambert I. 2006. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 598:144-163. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2006.01.020.
- Bidet P, and Bingen É. 2012. Apports des marqueurs moléculaires dans l'analyse des mécanismes d'acquisition et dans le suivi des infections nosocomiales. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie* 15:46-61.
- Bingen EH, Denamur E, and Elion J. 1994. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clinical Microbiology Reviews* 7:311-327. DOI:10.1128/cmrv.7.3.311.
- Black R, and Sweetmore A. 1993. Identification and characterisation of *Pseudomonas solanacearum* using metabolic profiles. Aciar proceedings: Australian Centre for International Agricultural Research, p 32-32.
- Bocsanczy A, Huguet-Tapia J, and Norman D. 2014. Whole-Genome Sequence of *Ralstonia solanacearum* P673, a Strain Capable of Infecting Tomato Plants at Low Temperatures. *Genome Announcements* 2:e00106-00114. DOI:10.1128/genomeA.00106-14.
- Boucher C, Barberis P, and Arlat M. 1988. Acridine orange selects for deletion of *hrp* genes in all races of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 1:282-288.
- Bouriquet G. 1946. Les maladies des plantes cultivées à Madagascar. P. Lechevalier.
- Brewer M, Butler A, and Cooksley S. 2016. The relative performance of AIC, AICC and BIC in the presence of unobserved heterogeneity. *Methods in Ecology and Evolution* 7:679-692. DOI:10.1111/2041-210X.12541.
- Bruen T, Philippe H, and Bryant D. 2006. A Simple and Robust Statistical Test for Detecting the Presence of Recombination. *Genetics* 172:2665-2681. DOI:10.1534/genetics.105.048975.
- Brumley S, Carney B, and Denny T. 1993. Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative *LysR* transcriptional regulator. *J Bacteriol* 175:5477-5487.
- Bryant D, and Moulton V. 2004. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution* 21:255-265. DOI:10.1093/molbev/msh018.
- Brynildsrød O, Snipen L, and Bohlin J. 2015. CNOGpro: detection and quantification of CNVs in prokaryotic whole-genome sequencing data. *Bioinformatics* 31:1708-1715. DOI:10.1093/bioinformatics/btv070.
- Buddenhagen I. 1962. Bacterial wilt of certain seed-bearing musa spp caused by tomato strain of *pseudomonas-solanacearum*. *Phytopathology*. Amer Phytopathological SOC 3340 Pilot Knob Road, St Paul, MN 55121. p 286-&.

- Buddenhagen I, Sequeira L, and Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. Amer Phytopathological SOC 3340 Pilot Knob Road, St Paul, MN 55121 USA. p 726.
- Bühlmann A, Dreö T, Rezzonico F, Pothier J, Smits THM, Ravnikar M, Frey JE, and Duffy B. 2014. Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental Microbiology* 16:2112-2125. DOI:10.1111/1462-2920.12289.
- Bui Thi Ngoc L, Vernire C, Jarne P, Brisse S, Guerin F, Boutry S, Gagnevin L, and Pruvost O. 2009. From local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Appl Environ Microbiol* 75. DOI:10.1128/aem.02245-08.
- CABI. 2016. *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of potato). Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/45009#20133173129> (accessed 28 January 2016).
- Campbell C, and Madden L. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons.
- Campbell V, Legendre P, and Lapointe F-J. 2009. Assessing congruence among ultrametric distance matrices. *J Classif* 26. DOI:10.1007/s00357-009-9028-x.
- Campbell V, Legendre P, and Lapointe F-J. 2011. The performance of the Congruence Among Distance Matrices (CADM) test in phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* 11:1-15. DOI:10.1186/1471-2148-11-64.
- Carefoot GL, and Sprott ER. 1967. Famine on the wind: man's battle against plant disease. Rand McNally.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, and Besse P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylotype II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:110-121. DOI:10.1007/s00122-006-0277-3.
- Carriço J, Sabat A, Friedrich A, and Ramirez M. 2012. Bioinformatics in bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-generation sequencing revolution. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 18:20382-20382.
- Castillo J, and Greenberg JT. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 73:1225-1238. DOI:10.1128/AEM.01253-06.
- Castillo J, and Plata G. 2016. The expansion of Brown Rot disease throughout Bolivia: Possible role of climate change. *Canadian Journal of Microbiology*.
- CEFFEL. 2014. Pomme de terre: Note d'analyse et de conseil économique Contre saison 2014.
- Cellier G, and Prior P. 2010. Deciphering Phenotypic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains Pathogenic to Potato. *Phytopathology* 100:1250-1261. DOI:10.1094/PHYTO-02-10-0059.
- Cellier G, Remenant B, Chiroleu F, Lefevre P, and Prior P. 2012. Phylogeny and population structure of brown rot- and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Appl Environ Microbiol* 78:2367-2375. DOI:10.1128/AEM.06123-11.
- Chamoiseau P, Jones J, and Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress* 10:1-10.
- Chen L, Guo X, Xie C, He L, Cai X, Tian L, Song B, and Liu J. 2013. Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics* 126:1861-1872. DOI:10.1007/s00122-013-2098-5.

- Ciarroni S, Gallipoli L, Taratufolo MC, Butler MI, Poulter RTM, Pourcel C, Vergnaud G, Balestra GM, and Mazzaglia A. 2015. Development of a Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA) to Unravel the Intra-Pathovar Structure of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Populations Worldwide. *PLoS ONE* 10:e0135310. DOI:10.1371/journal.pone.0135310.
- Clément JM. 1981. *Larousse agricole*. Larousse.
- Cohan FM. 2006. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 361:1985-1996. DOI:10.1098/rstb.2006.1918
- Cook D, Barlow E, and Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular plant-microbe interactions* 1:113-121.
- Cook D, and Sequeira L. 1993. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Aciar proceedings. Australian Centre for International Agricultural Research. p 96-96.
- Coupat-Goutaland B, Bernillon D, Guidot A, Prior P, Nesme X, and Bertolla F. 2011. *Ralstonia solanacearum* Virulence Increased Following Large Interstrain Gene Transfers by Natural Transformation. *Molecular plant-microbe interactions* 24:497-505. DOI:10.1094/MPMI-09-10-0197.
- CTHA. 2004. Etre au top avec le pok-pok. Bulletin bimestriel du Centre Technique Horticole d'Antananarivo Association interprofessionnelle de fruits, légumes et plantes ornementales.
- Cueva F, Balendres M, Concepcion D, Binahon P, Waje A, Tiongco RL, Vergara M, Justo V, Pathania N, and Trevorrow P. 2013. Phenotypic and genotypic relationships of *Ralstonia solanacearum* isolates from the northern and southern Philippines. *Smallholder HOPES—horticulture, people and soil*: 148.
- Dasuki U. 2002. Pelargonium Rosat Group. Record from Protabase. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa/Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen.
- de La Bathie H. 1931. Les Plantes introduites à Madagascar. *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale* 11:719-729.
- de Mendiburu F. 2016. Package 'agricolae'. Version 1.2-4.
- de Vienne D. 1998. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA.
- Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, Launay J, Noreskal M, Riviere P, Vigne F, Laplace D, Lebreton L, and Wicker E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the "emerging ecotype". *Phytopathology* 104:586-596. DOI:10.1094/PHYTO-09-13-0264-R.
- Decary R. 1963. Plantes introduites à Madagascar et toponymie locale. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*. 10:204-218.
- Denny T, Brumbley S, Carney B, Clough S, Schell M, Hayward A, and Hartman G. 1994. Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*:137-155.
- Denny T, and Hayward A. 2001. Gram-negative bacteria: *Ralstonia*. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria Third edition APS PRESS The American Phytopathological Society St Paul Minnesota.
- Dencœud F, and Vergnaud G. 2004. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics* 5:1-12. DOI:10.1186/1471-2105-5-4.

- Derzelle S, Girault G, Roest HJJ, and Koene M. 2015. Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in the Netherlands: Investigating the relationship to the worldwide population using whole-genome SNP discovery. *Infection, Genetics and Evolution* 32:370-376. DOI:10.1016/j.meegid.2015.03.030.
- Derzelle S, and Thierry S. 2013. Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiologic Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism. Biodefense Strategy, Practice, and Science* 11:S166-S176. DOI:10.1089/bsp.2013.0003.
- Didelot X. 2010. Sequence-Based Analysis of Bacterial Population Structures. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*: 37-60.
- Dittapongpitch V, and Surat S. 2003. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil and Weeds from Commercial Tomato Fields Using Immunocapture and the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Phytopathology* 151:239-246. DOI:10.1046/j.1439-0434.2003.00714.x.
- Doolittle W, Boucher Y, Nesbø C, Douady C, Andersson J, and Roger A. 2003. How big is the iceberg of which organellar genes in nuclear genomes are but the tip? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B. Biological Sciences* 358:39-58. DOI:10.1098/rstb.2002.1185.
- Eden-Green S, Balfas R, Sutarto T, and Jamalius. 1992. Characteristics of the transmission of Sumatra disease of cloves by tube-building cercopoids, Hindola spp. *Plant Pathology* 41:702-712. DOI:10.1111/j.1365-3059.1992.tb02553.x.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797. DOI:10.1093/nar/gkh340.
- Edwards A, and Cavalli-Sforza L. 1965. A Method for Cluster Analysis. *Biometrics* 21:362-375. DOI:10.2307/2528096.
- Efron B, Halloran E, and Holmes S. 1996. Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:13429.
- El Mousadik A, and Petit R. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92:832-839. DOI:10.1007/bf00221895.
- Elphinstone J. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Allen CP, P.; Hayward, A. C. , ed. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St. Paul, Minnesota USA:APS Press, 9-28
- Elphinstone J, Hennessy J, Wilson J, and Stead D. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bulletin* 26:663-678. DOI:10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x.
- Emerson D, Agullo L, Liu H, and Liu L. 2008. Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience* 58:925-936. DOI:10.1641/b581006.
- EPPO. 2015. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests: *Ralstonia solanacearum* (RALSSO). Available at <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO> (accessed 10 February 2016).
- Essakhi S, Cesbron S, Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Jacques M, and Manceau C. 2015. Phylogenetic and Variable-Number Tandem-Repeat Analyses Identify Nonpathogenic *Xanthomonas arboricola* Lineages Lacking the Canonical Type III Secretion System. *Applied and Environmental Microbiology* 81:5395-5410.
- Estoup A, and Angers B. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations.
- EU. 1998. Council Directive 98 / 57 / EC of 20 July 1998 on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* . Official Journal of the European Communities. p.1-39.

- Excoffier L, and Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567. DOI:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Excoffier L, Smouse PE, and Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Eyre D, Fawley W, Best E, Griffiths D, Stoesser N, Crook D, Peto T, Walker A, and Wilcox M. 2013. Comparison of Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Investigation of *Clostridium difficile* Transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 51:4141-4149. DOI:10.1128/jcm.01095-13.
- Fall S, Mercier A, Bertolla F, Calteau A, Gueguen L, Perriere G, Vogel T, and Simonet P. 2007. Horizontal gene transfer regulation in bacteria as a "spandrel" of DNA repair mechanisms. *PLoS ONE* 2:e1055. DOI:10.1371/journal.pone.0001055.
- FAO. 2009. Comment nourrir le monde en 2050: L'agriculture mondiale à l'horizon 2050. Forum d'Experts de Haut Niveau. Rome FAO.
- FAO. 2014. Mission FAO/PAM d'évaluation de la sécurité alimentaire à Madagascar. FAO/PAM.
- FAOSTAT. 2016. Potatoes production in Madagascar 2003-2014.
- Fegan M, Holoway G, Hayward AC, and Timmis J. 1998a. Development of a Diagnostic Test Based on the Polymerase Chain Reaction (PCR) to Identify Strains of *R. solanacearum* Exhibiting the Biovar 2 Genotype. In: Prior P, Allen C, and Elphinstone J, eds. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 34-43.
- Fegan M, and Prior P. 2005. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. 449-461.
- Fegan M, and Prior P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australasian Plant Pathology* 35:93-101.
- Fegan M, Taghavi M, Sly LI, and Hayward AC. 1998b. Phylogeny, Diversity and Molecular Diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior P, Allen C, and Elphinstone J, eds. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 19-33.
- Feingold J. 1991. Le déséquilibre de liaison.
- Field D, Hughes J, and Moxon ER. 2004. Using the Genome to Understand Pathogenicity. In: Woodford N, and Johnson AP, eds. *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews*. Totowa, NJ. Humana Press, 261-287.
- Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, and ES, and IV B. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology* 54:357-374. DOI:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907.
- Fock I, Collonnier C, Luisetti J, Purwito A, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, and Sihachakr D. 2001. Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:899-908. DOI:10.1016/S0981-9428(01)01307-9.
- Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, and Sihachakr D. 2000. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Science* 160:165-176. DOI:10.1016/S0168-9452(00)00375-7.
- Fock I, Luisetti J, Collonnier C, Vedel F, Ducreux G, Kodja H, Sihachakr D, Allen C, Prior P, and Hayward A. 2005. *Solanum phureja* and *S. stenotomum* are sources of resistance to *Ralstonia solanacearum* for somatic hybrids of potato. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: 253-259.

- Francisco A, Bugalho M, Ramirez M, and Carriço J. 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10:1-15. DOI:10.1186/1471-2105-10-152.
- Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, and Carriço JA. 2012. PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 13:1-10. DOI:10.1186/1471-2105-13-87.
- French ER. 1985. Interaction Between Strains of *Pseudomonas solanacearum*, its Hosts and the Environment. *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific*: 99.
- French E. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes.
- French E, Anguiz R, and Aley P. 1998. The Usefulness of Potato Resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the Integrated Control of Bacterial Wilt. In: Prior P, Allen C, and Elphinstone J, eds. *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg, 381-385.
- Fu Y. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147:915-925.
- Gemayel R, Vinces MD, Legendre M, and Verstrepen KJ. 2010. Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory Sequences. *Annual Review of Genetics* 44:445-477. DOI:10.1146/annurev-genet-072610-155046
- Gillings M, and Fahy P. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex.
- Gilson E, Clement JM, Brutlag D, and Hofnung M. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA-Sequences in *Escherichia-coli*. *Embo Journal* 3:1417-1421.
- Girard J, Nicole J, Cheron J, Gaubiac A, Huvier O, Oudard B, and Suzor H. 1993. Bacterial wilt due to *Pseudomonas solanacearum* in Reunion: general situation and current research. Aciar proceedings. Australian Centre for International Agricultural research. p 343-343.
- Gire S, Goba A, Andersen K, Sealfon R, Park D, Kanneh L, Jalloh S, Momoh M, Fullah M, Dudas G, Wohl S, Moses L, Yozwiak N, Winnicki S, Matranga C, Malboeuf C, Qu J, Gladden A, Schaffner S, Yang X, Jiang P, Nekoui M, Colubri A, Coomber M, Fonnlie M, Moigboi A, Gbakie M, Kamara F, Tucker V, Konuwa E, Saffa S, Sellu J, Jalloh A, Kovoma A, Koninga J, Mustapha I, Kargbo K, Foday M, Yillah M, Kanneh F, Robert W, Massally JLB, Chapman SB, Bochicchio J, Murphy C, Nusbaum C, Young S, Birren B, Grant D, Scheiffelin J, Lander E, Happi C, Gevao S, Gmirke A, Rambaut A, Garry R, Khan S, and Sabeti P. 2014. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 345:1369-1372. DOI:10.1126/science.1259657.
- Glaeser S, and Kämpfer P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology* 38:237-245. DOI:10.1016/j.syapm.2015.03.007
- Goudet J. 2014. Estimation and tests of hierarchical F-statistics.
- Gráda CÓ, and Eiríksson A. 2006. *Ireland's Great Famine: Interdisciplinary Perspectives*. University College Dublin Press.
- Granada G. 1988. Latent infections induced by *Pseudomonas solanacearum* in potato and symptomless plants. Bacterial diseases of the potato Report of the Planning Conference on Bacterial Diseases of Potato. p 93-108.
- Granada G, and Sequeira L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. *Canadian Journal of Microbiology* 29:433-440.
- GRET/CITE. 2000. Diagnostic rapide de la filière de la pomme de terre.

- Grey BE, and Steck TR. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and environmental microbiology* 67:3866-3872.
- Guarisch-Sousa R, Puigvert M, Coll N, Siri MI, Pianzzola M, Valls M, and Setubal J. 2016. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Standards in Genomic Sciences* 11:1-8. DOI:10.1186/s40793-016-0131-4.
- Guidot A, Coupat B, Fall S, Prior P, and Bertolla F. 2009. Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME J* 3:549-562. DOI:10.1038/ismej.2009.14.
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrère S, Genin S, and Boucher C. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* 189. DOI:10.1128/jb.00999-06.
- Guigou G, Cheval J, Cahuzac R, and Brisson S. 2008. MLVA-NET: a standardised web database for bacterial genotyping and surveillance. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 13:717-727.
- Guillot G, Mortier F, and Estoup A. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5:712-715. DOI:10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x.
- Guillot G, Santos F, and Estoup A. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24:1406-1407. DOI:10.1093/bioinformatics/btn136.
- Gutarra L, Kreuze J, Lindqvist-Kreuze H, and De Mendiburu F. 2015. Variation of Resistance to Different Strains of *Ralstonia Solanacearum* in Highland Tropics Adapted Potato Genotypes. *American Journal of Potato Research* 92:258-265. DOI:10.1007/s12230-014-9426-4.
- Habetewold K, Bekelle K, Kasahun S, and Hunduma T. 2015. Prevalence of Bacterial Wilt of Ginger (*Z. Officinale*) Caused by *Ralstonia Solanacearum* (Smith) in Ethiopia. *International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences (IJRSAS)* 1:14-22.
- Hanage W, Fraser C, and Spratt B. 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 361:1917-1927. DOI:10.1098/rstb.2006.1917.
- Hanson P, Wang J, Licardo O, Mah S, Hartman G, Lin Y, and Chen J. 1996. Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. *HortScience* 31:143-146.
- Hartl DL, Clark AG, and Clark AG. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer associates Sunderland.
- Hayward A. 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria.
- Hayward AC. 1991. Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual review of phytopathology* 29:65-87. DOI:10.1146/annurev.py.29.090191.000433.
- Herschleb J, Ananiev G, and Schwartz DC. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protocols* 2:677-684.
- Hill W, and Robertson A. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor Appl Genet* 38:226-231. DOI:10.1007/bf01245622.
- Hong JC, Momol MT, Jones JB, Ji P, Olson SM, Allen C, Perez A, Pradhanang P, and Guven K. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Ponds and Aquatic Weeds Associated with the Ponds in North Florida. *Plant Disease* 92:1674-1682. DOI:10.1094/PDIS-92-12-1674.

- Hulton C, Higgins C, and Sharp P. 1991. Eric Sequences - a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5:825-834. DOI:10.1111/j.1365-2958.1991.tb00755.x.
- Hunter PR, and Gaston MA. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology* 26:2465-2466.
- Huson DH. 1998. SplitsTree:analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14:68-73. DOI:10.1093/bioinformatics/14.1.68.
- Jaunet TX, and Wang J-F. 1999. Variation in Genotype and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Race 1 Isolated from Tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-327. DOI:10.1094/PHYTO.1999.89.4.320.
- Jeong Y, Kim J, Kang Y, Lee S, and Hwang I. 2007. Genetic Diversity and Distribution of Korean Isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 91:1277-1287. DOI:10.1094/PDIS-91-10-1277.
- Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* 96:317-323. DOI:10.1016/S1389-1723(03)90130-7.
- Katawczik M, Tseng H, and Mila AL. 2016. Diversity of *Ralstonia solanacearum* populations affecting tobacco crops in North Carolina. *Tobacco Science*: 1-11. DOI:10.3381/15-047.
- Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, Okuda M, Su H, and Iwanami T. 2011. Differentiation of "Candidatus Liberibacter asiaticus" Isolates by Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 77:1910-1917. DOI:10.1128/aem.01571-10.
- Kelman A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station*.
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
- Kelman A, and Hruschka J. 1973. The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of general microbiology* 76:177-188.
- Kim-Lee H, Moon J, Hong Y, Kim M, and Cho H. 2005. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *American Journal of Potato Research* 82:129-137. DOI:10.1007/bf02853650.
- Kimura M, and Crow J. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- Kimura M, and Ohta T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:2868-2872.
- Kloos J, Fernandez B, Tumapon A, Villanueva L, and Tugog B. 1986. Bacterial wilt research in Mindanao. *CIP Circular* 14:1-7.
- Koeuth T, Versalovic J, and Lupski JR. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5:408-418.
- Kumar S, Stecher G, and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874. DOI:10.1093/molbev/msw054.
- Kunin V, Goldovsky L, Darzentas N, and Ouzounis CA. 2005. The net of life:Reconstructing the microbial phylogenetic network. *Genome Research* 15:954-959. DOI:10.1101/gr.3666505.

- Kushalappa AC, and Eskes AB. 1989. *Coffee Rust: Epidemiology, Resistance, and Management*:Taylor & Francis.
- Laferriere T, Helgeson P, and Allen C. 1999. Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1272-1278. DOI:10.1007/s001220051193.
- Lallmahomed G, and Rakotobe-Rabehevitra E. 1988. Biovars and races of *Pseudomonas solanacearum* in Madagascar: a preliminary study. *FAO Plant Protection Bulletin (FAO)*.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, and Prior P. 2010. Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Phytopathology* 101:154-165. DOI:10.1094/PHYTO-02-10-0048.
- Lebeau A, Gouy M, Daunay M, Wicker E, Chiroleu F, Prior P, Frary A, and Dintinger J. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics* 126:143-158. DOI:10.1007/s00122-012-1969-5.
- Leduc A, Traoré YN, Boyer K, Magne M, Grygiel P, Juhasz CC, Boyer C, Guerin F, Wonni I, Ouedraogo L, Vernière C, Ravigné V, and Pruvost O. 2015. Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso. *Environmental Microbiology* 17:4429-4442. DOI:10.1111/1462-2920.12876.
- Legendre P. 2000. Reticulate Evolution:From Bacteria to Philosopher. *Journal of Classification* 17:153-157. DOI:10.1007/s003570000013.
- Legendre P, and Lapointe F-J. 2005. Congruence entre matrices de distance. *Comptes-rendus des 12ièmes rencontres de la Société Francophone de Classification*. Montréal: 178-181.
- Lemaga B, Kakuhenzire R, Kassa B, Ewell P, Priou S, Allen C, Prior P, and Hayward A. 2005. Integrated control of potato bacterial wilt in Eastern Africa: the experience of African highlands initiative. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: 145-157.
- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. De Boeck Supérieur.
- Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, Yaba P, Delicat A, Paweska JT, Gonzalez J-P, and Swanepoel R. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature* 438:575-576.
- Lewontin RC. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49:49-67.
- Lewontin RC, and Kojima K-i. 1960. The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution* 14:458-472. DOI:10.2307/2405995.
- Lexp.mu. 2004. La pomme de terre malgache arrive. lexpress.mu.
- Li W, Raoult D, and Fournier P. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* 33:892-916. DOI:10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x.
- Librado P, and Rozas J. 2009. DnaSP v5:a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452. DOI:10.1093/bioinformatics/btp187.
- Lieberei R. 2007. South American Leaf Blight of the Rubber Tree (*Hevea* spp.): New Steps in Plant Domestication using Physiological Features and Molecular Markers. *Annals of Botany* 100:1125-1142. DOI:10.1093/aob/mcm133.

- Lin C, Tsai K, Prior P, and Wang J. 2014. Phylogenetic relationships and population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from diverse origins in Taiwan. *Plant pathology* 63:1395-1403. DOI:10.1111/ppa.12209.
- Lindstedt B. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26:2567-2582. DOI:10.1002/elps.200500096.
- Lindstedt B, Torpdahl M, Vergnaud G, Le Hello S, Weill F, Tietze E, Malorny B, Prendergast D, Ni Ghallchoir E, Lista R, Schouls L, Soderlund R, Borjesson S, and Akerstrom S. 2013. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) in eight European countries, 2012. *Euro Surveill* 18:20385.
- Lupski J, and Weinstock G. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology* 174:4525.
- Lynch M, and Crease T. 1990. The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution* 7:377-394.
- Machida-Hirano R. 2015. Diversity of potato genetic resources. *Breeding Science* 65:26-40. DOI:10.1270/jsbbs.65.26
- MAEP-UPDR. 2004a. Filière Pomme de terre. Fiche n° 111. Filières de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche, et Actions du Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage et de la Pêche.
- MAEP-UPDR. 2004b. Filière Tabac - Fiche n°115.
- Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, and Prior P. 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant Disease* 93:1123-1130. DOI:10.1094/PDIS-93-11-1123.
- Maheswaran M. 2004. Molecular Markers: History Features and Applications. *Advanced Biotech August*:17-24.
- Maiden MC. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:561-588. DOI:10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.
- Maiden M, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Russell J, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant D, Feavers I, Achtman M, and Spratt B. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3140-3145.
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer S, Machado M, Toth IAN, Salmond G, and Foster G. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13:614-629. DOI:10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x.
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P, and Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:200-214. DOI:10.1099/ijts.0.65392-0.
- Martin D, and Beiko RG. 2010. Genetic recombination and bacterial population structure. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease*: 61-85.
- Martin D, Murrell B, Golden M, Khoosal A, and Muhire B. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 1. DOI:10.1093/ve/vev003.
- Maynard Smith J, and Smith N. 1998. Detecting recombination from gene trees. *Mol Biol Evol* 15:590-599.
- Mayr E. 2001. *What evolution is*. Basic books.

- Mazodier P, and Davies J. 1991. Gene Transfer Between Distantly Related Bacteria. *Annual Review of Genetics* 25:147-171. DOI:10.1146/annurev.ge.25.120191.001051.
- McDonald B, and Linde C. 2002a. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica* 124:163-180. DOI:10.1023/a:1015678432355.
- McDonald B, and Linde C. 2002b. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annual review of phytopathology* 40:349-379. DOI:10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443.
- Menier P. 1934. Le tabac (*Nicotiana tabacum*). In: Madagascar Rd, editor. 7. Madagascar.
- Messiha N, van Bruggen A, van Diepeningen A, de Vos O, Termorshuizen A, Tjou-Tam-Sin N, and Janse J. 2007. Potato brown rot incidence and severity under different management and amendment regimes in different soil types. *European Journal of Plant Pathology* 119:367-381. DOI:10.1007/s10658-007-9167-z.
- Michellon R, Rakotondralambo P, and Randrianangaly S. 1999. Appui technique aux plantations de géranium rosat: projet d'appuis à la filière huiles essentielles SYPEAM. Antananarivo, Madagascar. CIRAD. p 80.
- MinAgri. 2015. Rapport final sur l'étude préparatoire du cadre de gestion des pestes et pesticides du projet CASEF. Ministère de l'Agriculture.
- Moffett ML, Wood BA, and Hayward A. 1981. Seed and soil: sources of inoculum for the colonisation of the foliage of solanaceous hosts by *Pseudomonas solanacearum*. *Annals of Applied biology* 98:403-411.
- Mondal B, Bhattacharya I, and Khatua D. 2011. Crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* in West Bengal. *Journal of Crop and Weed* 7:195-199.
- Monnier P. 1946. Le Tabac à Madagascar. Revue internationale de botanique appliquée et d'agriculture tropicale 26:429-434.
- Monty. 2012. Mise en place d'une série de mesures qui aiderait à augmenter le seuil de la sécurité alimentaire de la région. Available at http://commissionoceaindien.org/fileadmin/resources/cabotage_maritime/Rapport_de_Cyril_Monty.pdf (accessed 15 Février 2016).
- Murchan S, Kaufmann M, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, and El Solh N. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *Journal of Clinical Microbiology* 41:1574-1585.
- Muthoni J, Shimelis H, and Melis R. 2012. Management of Bacterial Wilt [*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi *et al.*, 1995] of Potatoes: Opportunity for Host Resistance in Kenya. *Journal of Agricultural Science* 4: p64.
- N'guessan C, Abo K, Fondio L, Chiroleu F, Lebeau A, Poussier S, Wicker E, and Koné D. 2012. So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire in Africa. *Phytopathology* 102:733-740.
- N'Guessan C, Brisse S, Le Roux-Nio A-C, Poussier S, Koné D, and Wicker E. 2013. Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods* 92:366-374. DOI:10.1016/j.mimet.2013.01.012.
- Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70:3321-3323.

- Nei M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann Hum Genet* 41:225-233.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nei M, and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:5269-5273.
- Ninnin M. 1998. Plantes aromatiques à Madagascar. Etats des lieux de la filière Geranium rosat.
- Nishat S, Hamim I, Ibrahim Khalil M, Ali MA, Hossain MA, Bahadur Meah M, and Islam MR. 2015. Genetic diversity of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* using a RAPD marker. *Comptes Rendus - Biologies* 338:757-767. DOI:10.1016/j.crvi.2015.06.009.
- Nortjé P. 2015. Bacterial wilt on potato: the South African Experience. In:SA Pa, editor.
- OEPP/EPPO. 2004. EPPO Standards PM 7/21(1) Diagnostic protocols for regulated pests - *Ralstonia solanacearum*. Bulletin OEPP/EPPO p 173-178.
- PADR E. 2007. GTDR, un instrument de développement rural régional par excellence.
- Paradis E, Claude J, and Strimmer K. 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289-290. DOI:10.1093/bioinformatics/btg412.
- Parkinson N, Bryant R, Bew J, Conyers C, Stones R, Alcock M, and Elphinstone J. 2013. Application of variable-number tandem-repeat typing to discriminate *Ralstonia solanacearum* strains associated with English watercourses and disease outbreaks. *Appl Environ Microbiol* 79:6016-6022. DOI:10.1128/AEM.01219-13.
- Peakall R, and Smouse PE. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539. DOI:10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, and Crandall KA. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 16:38-53. DOI:10.1016/j.meegid.2013.01.009.
- Petit R, El Mousadik A, and Pons O. 1998. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* 12:844-855. DOI:10.1111/j.1523-1739.1998.96489.x.
- PNUD. 2000. L'agriculture biologique à Madagascar, facteur innovant pour le développement dans le contexte de la mondialisation.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253-1256. DOI:10.1093/molbev/msn083.
- Poulin L, Grygiel P, Magne M, Gagnevin L, Rodriguez-R LM, Forero Serna N, Zhao S, El Rafii M, Dao S, Tekete C, Wonni I, Koita O, Pruvost O, Verdier V, Vernière C, and Koebnik R. 2015. New Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Tool for Surveillance and Local Epidemiology of Bacterial Leaf Blight and Bacterial Leaf Streak of Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 81:688-698. DOI:10.1128/aem.02768-14.
- Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward C, and Fegan M. 2000a. Partial Sequencing of the *hrpB* and Endoglucanase Genes Confirms and Expands the Known Diversity within the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Systematic and Applied Microbiology* 23:479-486. DOI:10.1016/S0723-2020(00)80021-1.
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Barthet S, Thoquet P, Arlat M, Trigalet A, Allen C, Prior P, and Hayward A. 2005. Phase reversion from phenotype conversion mutants to wild type may be

- induced in *Ralstonia solanacearum* by a susceptible host plant. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: 351-357.
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, and Trigalet A. 2000b. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679-1692. DOI:10.1099/00221287-146-7-1679.
- Poussier S, Vandewalle P, and Luisetti J. 1999. Genetic diversity of african and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl Environ Microbiol* 65:2184-2194.
- Prasannakumar M, Chandrashekara K, Deepa M, AVani A, and Khan A. 2012. Fingerprinting of *Ralstonia solanacearum* isolates by Rep-PCR and RAPD. *Pest Management in Horticultural Ecosystems* 18:179-187.
- Prior P, Beramis M, Clairon M, Quinquampoix H, Robert M, and Schmit J. 1993. Contribution to integrated control against bacterial wilt in different pedoclimatic situations: Guadeloupe experience. ACIAR Proceedings (Australia) No 45. p 294-304.
- Prior P, and Fegan M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. 695 ed:International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium. p 127-136.
- Priou S, Salas C, De Mendiburu F, Aley P, and Gutarra L. 2001. Assessment of latent infection frequency in progeny tubers of advanced potatoclones resistant to bacterial wilt: A new selection criterion. *Potato research* 44:359-373. DOI:10.1007/bf02358596.
- Pruvost O, Goodarzi T, Boyer K, Soltaninejad H, Escalon A, Alavi S, Javegny S, Boyer C, Cottyn B, Gagnevin L, and Vernière C. 2015. Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*. *Plant pathology* 64:776-784. DOI:10.1111/ppa.12324.
- Pruvost O, Magne M, Boyer K, Leduc A, Tourterel C, Drevet C, Ravigne V, Gagnevin L, Guerin F, Chiroleu F, Koebnik R, Verdier V, and Verniere C. 2014. A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. *PLoS One* 9:e98129. DOI:10.1371/journal.pone.0098129.
- QGIS Development Team. 2013. QGIS geographic information system. *Open Source Geospatial Foundation Project*.
- Rabakoarihanta A, and Rakotondramanana. 1984. Potato Production Status in Madagascar. In: Potato Development and Transfer of Technology. *Tropical Africa*. International Potato Center ed. Nairobi, Kenya. S. Nganga.
- Rahetlah V. 2008. Effets des feuilles de *Symphytum officinale uplandicum* (grande consoude) contre la pourriture brune de la pomme de terre PhD. Université d'Antananarivo.
- Rahetlah VB, Arison F, and Andrianarisoa B. 2008. Prospects for control of bacterial wilt of potato (*Ralstonia solanacearum*) through soil incorporation of aerial part of confrey (*Symphytum officinale uplandicum*). *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development* 8.
- Rakotondramanana. 1984. Le Blé et la pomme de terre à Madagascar: productions et contraintes. Compte-rendu de la Conférence Internationale du 24 au 28 Septembre 1984 à la Chambre de Commerce, d'Industrie et d'Agriculture d'Antsirabe: FIFAMANOR.
- Ramsubhag A, Lawrence D, Cassie D, Fraser R, Umaharan P, Prior P, and Wicker E. 2012. Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant Pathology* 61:844-857. DOI:10.1111/j.1365-3059.2011.02572.x.

- Randriamampianina JA. 1997. Le flétrissement bactérien des Solanacées. In: GTZ/DPV, ed. *Protection intégrée des cultures maraîchères à Madagascar*, p:162-164.
- Randrianangaly J. 2003. Le flétrissement bactérien du Géranium Rosat à Madagascar: Caractérisation de l'agent causal et étude des effets phytosanitaires de la bouse de vache et de sa microflore sur le pathogène. Doctorat. Université d'Antananarivo.
- Rapilly F. 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale. Mycoses aériennes. Éditions Quae.
- Rasolo F, Randrianaivo H, Ratovo A, Andrianorosoa, Andriambahoaka R, Razafindraibe, Rakotondramanana, and Scott. 1987. *La Pomme de Terre pour l'Autosuffisance Alimentaire*: FOFIFA - FIFAMANOR - CIP.
- Rasolofo. 1965. Le flétrissement bactérien à Madagascar. In: Marseille Cdcedid, editor. Congrès de la protection des cultures tropicales.
- Ravelomanantsoa S, Robène I, Chiroleu F, Guérin F, Poussier S, Pruvost O, and Prior P. 2016. A novel multilocus variable number tandem repeat analysis typing scheme for African phylotype III strains of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *PeerJ* 4:e1949.
- R Core Team. 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 3.0.2 ed. Vienna, Austria. R Foundation for Statistical Computing.
- Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A, Salvignol G, Mornico D, Mangenot S, Barbe V, Médigue C, and Prior P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:1-16. DOI:10.1186/1471-2164-11-379.
- Richard G, and Pâques F. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO reports* 1:122-126. DOI:10.1093/embo-reports/kvd031.
- Riehle MM, Bennett AF, and Long AD. 2001. Genetic architecture of thermal adaptation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:525-530. DOI:10.1073/pnas.98.2.525.
- Robinson DA, Falush D, and Feil EJ. 2010. *Bacterial population genetics in infectious disease*: Wiley Online Library.
- Rodriguez-Murillo L, and Salem RM. 2013. Insertion/Deletion Polymorphism. In: Gellman MD, and Turner JR, eds. *Encyclopedia of Behavioral Medicine*. New York, NY. Springer New York, 1076-1076.
- Roumagnac P, Gagnevin L, Pruvost O, and Achtman M. 2006. Insights into Structure and Evolution of Bacterial Species That are Revealed by Molecular Methods. *Encyclopedia of Infectious Diseases*: John Wiley & Sons, Inc., 475-494.
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijl J, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, and Markers ESGoE. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill* 18:20380.
- Saddler G, Allen C, Prior P, and Hayward A. 2005. Management of bacterial wilt disease. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: 121-132.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, and Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. *nov.*, *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. *nov.*, banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. *nov.* and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. *nov.* *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3087-3103. DOI:10.1099/ijsm.0.066712-0.

- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, and Arlat M. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415. DOI:10.1038/415497a.
- Schaad NW, Jones JB, and Chun W. 1988. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS press St. Paul, MN.
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5. DOI:10.1038/nrg1249.
- Schmiediche P. 1990. Resistance de la Pomme de Terre a la Bacteriose Vasculaire Et Sa Tolerance a la Chaleur:International Potato Center.
- Scholz H, and Vergnaud G. 2013. Molecular characterisation of *Brucella* species. *Rev Sci Tech* 32:149-162.
- Schork N, Fallin D, and Lanchbury JS. 2000. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clinical Genetics* 58:250-264. DOI:10.1034/j.1399-0004.2000.580402.x.
- Scorticini M. 2005. The population structure of some plant pathogenic bacteria: An ecological and adaptative perspective. *Journal of Plant Pathology* 87:5-12.
- Seal S, Jackson L, and Daniels M. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Applied and environmental microbiology* 58:3759-3761.
- Sequeira L, and Rowe P. 1969. Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal* 46:451-462. DOI:10.1007/bf02862028.
- Shan X, Zhou H, Zhang J, Zhu B, Xu L, Xu Z, Hu G, Bai A, Shi Y, Jiang B, and Shao Z. 2015. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup C in China. *Epidemiology & Infection* 143:3001-3010. DOI:10.1017/S0950268815000473.
- Shekhawat G, Chakrabarti S, and Gadewar A. 1992. *Potato bacterial wilt in India*. Central Potato Research Institute.
- Shriver M, Jin L, Chakraborty R, and Boerwinkle E. 1993. Vntr Allele Frequency Distributions under the Stepwise Mutation Model: A Computer Simulation Approach. *Genetics* 134:983-993.
- Silveira J, Duarte V, Moraes M, Lopes C, Fernandes JM, Barni V, and Maciel JL. 2007. Epidemiological analysis of clones and cultivars of potato in soil naturally infested with *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Fitopatologia Brasileira* 32:181-188.
- Simpson E. 1949. Measurement of Diversity. *Nature* 163.
- Siri M, Sanabria A, and Pianzzola M. 2011. Genetic Diversity and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Strains Causing Bacterial Wilt of Potato in Uruguay. *Plant Disease* 95:1292-1301. DOI:10.1094/PPD-09-10-0626.
- Skoglund L, Seal S, Elphinstone J, and Berrios D. 1993. Study of Latent Infection of Potato Tubers by *Pseudomonas solanacearum* in Burundi. In: (eds) HGHA, editor. *Bacterial Wilt*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra:ACIAR Proceedings p:106-110.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Smith JM. 1999. The detection and measurement of recombination from sequence data. *Genetics* 153:1021-1027.
- Smith J, Feil E, and Smith N. 2000. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 22:1115-1122. DOI:10.1002/1521-1878(200012)22:12<1115:AID-BIES9>3.0.CO; 2-R.

- Smith J, Smith N, O'Rourke M, and Spratt BG. 1993. How clonal are bacteria? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:4384-4388. DOI:10.1073/pnas.90.10.4384.
- Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98:503-517. DOI:10.1016/S0022-2836(75)80083-0.
- Spraker J, Sanchez L, Lowe T, Dorrestein P, and Keller N. 2016. *Ralstonia solanacearum* lipopeptide induces chlamydospore development in fungi and facilitates bacterial entry into fungal tissues. *ISME J.* DOI:10.1038/ismej.2016.32.
- Stander EIM. 2001. Cultural practices for the control of bacterial wilt of potato. University of Pretoria Pretoria.
- Stern M, Ames G, Smith N, Robinson E, and Higgins C. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences - a major component of the bacterial genome. *Cell* 37:1015-1026. DOI:10.1016/0092-8674(84)90436-7.
- Stone M. 2010. Virulent New Strains of Rust Fungus Endanger World Wheat. *Microbe Magazine* 5:423-428. DOI:10.1128/microbe.5.423.1.
- Struelens MJ. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clinical Microbiology and Infection* 2:2-11. DOI:10.1111/j.1469-0691.1996.tb00193.x.
- Struelens MJ. 1998. Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:581-586.
- Struelens M, Gheldre Y, and Deplano A. 1998. Comparative and Library Epidemiological Typing Systems: Outbreak Investigations Versus Surveillance Systems. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 19:565-569. DOI:10.1086/647874.
- Subedi N, Gilbertson RL, Osei M, Cornelius E, and Miller S. 2013. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* in Ghana, West Africa. *Plant Disease* 98:840-840. DOI:10.1094/PDIS-09-13-0963-PDN.
- Supriadi. 2005. Present status of blood disease in Indonesia. In:Allen C, Prior P, and Hayward A, eds. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*: American Phytopathological Society (APS Press), 395-404.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng L, Lukinmaa S, Kam K, Rolando S, Gutiérrez E, and Binsztein N. 2006. Building PulseNet International: An Interconnected System of Laboratory Networks to Facilitate Timely Public Health Recognition and Response to Foodborne Disease Outbreaks and Emerging Foodborne Diseases. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:36-50. DOI:10.1089/fpd.2006.3.36.
- Swanepoel A. 1992. Survival of south african strains of biovar 2 and biovar 3 of *Pseudomonas solanacearum* in the roots and stems of weeds. *Potato research* 35:329-332. DOI:10.1007/bf02357714.
- Taghavi M, Hayward C, Sly L, and Fegan M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46:10-15.
- Tagu D, and Risler J. 2010. Bio-informatique: Principes d'utilisation des outils. Quae.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678-687.

- Tamura K, and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10.
- Tans-Kersten J, Huang H, and Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of bacteriology* 183:3597-3605.
- Tengku Ab. Malik T, Roff M, Rozeita L, and Maimun T. 2012. Status of distribution, damage and mitigation of banana wilt in Malaysia. International Banana Symposium: Banana Improvement, Health Management, Use Diversification and Adaptation to Climate Change. Kaohsiung, Taiwan.
- Tong Y, Shi W, LiuDi, Qian J, Liang L, Bo X, Liu J, Ren H, Fan H, Ni M, Sun Y, Jin Y, Teng Y, Li Z, Kargbo D, Dafae F, Kanu A, Chen C-C, Lan Z, Jiang H, Luo Y, Lu H, Zhang X, Yang F, Hu Y, Cao Y, Deng Y, Su H, Sun Y, Liu W, Wang Z, Wang C, Bu Z, Guo Z, Zhang L, Nie W, Bai C, Sun C, An X, Xu P, Zhang X, Huang Y, Mi Z, Yu D, Yao H, Feng Y, Xia Z, Zheng X, Yang S, Lu B, Jiang J, Kargbo B, He F, Gao G, Cao W, and The China Mobile Laboratory Testing Team in Sierra L. 2015. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone. *Nature* 524:93-96. DOI:0.1038/nature14490
- Turner KME, and Feil EJ. 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29:129-135. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2006.11.002.
- Tusiime G, Adipala E, Opio F, and Bhagsari A. 1998. Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: implications to development of an integrated control package for bacterial wilt. *Bacterial Wilt Disease*:Springer, 413-419.
- Urwin R, and Maiden MCJ. 2003. Multi-locus sequence typing:a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* 11:479-487. DOI:10.1016/j.tim.2003.08.006.
- USDA/APHIS. 2005. Agricultural Bioterrorism Protection Act of 2002; Possession, Use, and Transfer of Biological Agents and Toxins. In: Register F, editor. 52.
- Väli Ü, Brandström M, Johansson M, and Ellegren H. 2008. Insertion-deletion polymorphisms (indels) as genetic markers in natural populations. *BMC Genetics* 9:1-8. DOI:10.1186/1471-2156-9-8.
- Van Belkum A. 2007. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49:22-27. DOI:10.1111/j.1574-695X.2006.00173.x.
- van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, and Tibayrenc M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 14:547-560. DOI:10.1128/CMR.14.3.547-560.2001.
- van Belkum A, Tassios P, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry N, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, and Struelens M. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 13:1-46. DOI:10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x.
- Van Ert M, Easterday W, Huynh L, Okinaka R, Hugh-Jones M, Ravel J, Zanecki S, Pearson T, Simonson T, U'Ren J, Kachur S, Leadem-Dougherty R, Rhoton S, Zinser G, Farlow J, Coker P, Smith K, Wang B, Kenefic L, Fraser-Liggett C, Wagner D, and Keim P. 2007. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS ONE* 2:e461. DOI:10.1371/journal.pone.0000461.
- Van Walle I. 2013. ECDC starts pilot phase for collection of molecular typing data. *Euro Surveill* 18.
- Vergnaud G, and Pourcel C. 2009. Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis. In:Caugant AD, ed. *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*. Totowa, NJ. Humana Press, 141-158.
- Vernière C, Bui Thi Ngoc L, Jarne P, Ravigné V, Guérin F, Gagnevin L, Le Mai N, Chau NM, and Pruvost O. 2014. Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of

- the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. *Environmental Microbiology* 16:2226-2237. DOI:10.1111/1462-2920.12369.
- Versalovic J, Koeuth T, and Lupski R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Research* 19:6823-6831. DOI:10.1093/nar/19.24.6823.
- Villa JE, Tsuchiya K, Horita M, Natural M, Opina N, and Hyakumachi M. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *Journal of General Plant Pathology* 71:39-46. DOI:10.1007/s10327-004-0156-1.
- Vinuesa P. 2010. Multilocus Sequence Analysis and Bacterial Species Phylogeny. *Molecular phylogeny of microorganisms*: 41.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414. DOI:10.1093/nar/23.21.4407.
- Wang J-F, Hanson P, and Barnes J. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance sources to bacterial wilt in tomato. *Bacterial Wilt Disease*. Springer, 269-275.
- Wang J-F, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, and Grimsley N. 2000. Resistance of Tomato Line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan Is Controlled Mainly by a Major Strain-Specific Locus. *Molecular plant-microbe interactions* 13:6-13. DOI:10.1094/MPMI.2000.13.1.6.
- Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, and Harmsen D. 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research* 38:W326-W331. DOI:10.1093/nar/gkq351.
- Wenneker M, Van Beuningen A, Van Nieuwenhuijze A, and Janse J. 1998. Survival of brown rot and disinfection of surface water. The survival of the brown rot bacteria (*Pseudomonas solanacearum*) in several substrates and the efficiency of several methods for the disinfection of surface water. *Gewasbeschermering* 29:7-11.
- Wenneker M, Verdel M, Groeneveld R, Kempenaar C, Van Beuningen A, and Janse J. 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105:307-315.
- Wicker E, Lefevre P, de Cambiaire J-C, Lemaire C, Poussier S, and Prior P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J* 6:961-974.
- Williams J, Kubelik A, Livak K, Rafalski J, and Tingey S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535. DOI:10.1093/nar/18.22.6531.
- Wright S. 1949. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15:323-354. DOI:10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x.
- Xu J, Pan Z, Prior P, Xu J, Zhang Z, Zhang H, Zhang L, He L, and Feng J. 2009. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641-653. DOI:10.1007/s10658-009-9512-5.
- Xu J, Zheng H, Liu L, Pan Z, Prior P, Tang B, Xu J-s, Zhang H, Tian Q, Zhang L, and Feng J. 2011. Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82. *Journal of bacteriology* 193:4261-4262. DOI:10.1128/jb.05384-11.
- Yahiaoui N. 2016. Diversity and population structure of the *Ralstonia solanacearum* species complex in the South-West Indian Ocean islands.

- Yao J, and Allen C. 2006a. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of bacteriology* 188:3697-3708.
- Yao J, and Allen C. 2006b. The role of bacterial aerotaxis in *Ralstonia solanacearum* interactions with host plants. *Phytopathology* 96.
- Yao J, and Allen C. 2007. The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of bacteriology* 189:6415-6424.
- Yıldırım İ, Yıldırım S, and Koçak N. 2011. Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 1.
- Yuliar, Nion YA, and Toyota K. 2015. Recent Trends in Control Methods for Bacterial Wilt Diseases Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments* 30:1-11. DOI:10.1264/jsme2.ME14144.
- Zaluga J, Stragier P, Van Vaerenbergh J, Maes M, and De Vos P. 2013. Multilocus Variable-Number-Tandem-Repeats Analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium. *BMC Microbiology* 13:1-15. DOI:10.1186/1471-2180-13-126.
- Zehr E. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* in the Philippines as determined by cross-inoculation of hosts at different temperatures. *Philippine Phytopathology* 6:44-54.
- Zhao S, Poulin L, Rodriguez-R L, Serna N, Liu S, Wonni I, Szurek B, Verdier V, Leach J, He Y, Feng J, and Koebnik R. 2012. Development of a Variable Number of Tandem Repeats Typing Scheme for the Bacterial Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* 102:948-956. DOI:10.1094/PHYTO-04-12-0078-R.

ANNEXES



ANNEXE 1 – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

A. Collection de souches de référence phylotype I (n = 42).

Phylotype I : Souches de REFERENCE						
RUNID	Souche ID	Pays	Altitude (m)	Hôtes	Year	Sequençage
RUN0044	ACH92	Australia	-	<i>Zingiber officinale</i>	1966	16 egl
RUN0047	CIP365	Philippines	-	<i>Solanum tuberosum</i>	1989	45 egl
RUN0054	GMI1000	French Guiana	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	1978	18 egl
RUN0069	MAFF21126	Japan	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	15 egl
RUN0085	PSS190	Taiwan	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	1995	15 egl
RUN0090	R288	China	-	<i>Morus alba</i>	-	12 egl
RUN0091	R292	China	-	<i>Morus alba</i>	-	12 egl
RUN0135	CFBP7026	Cameroon	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	44 egl
RUN01389	CMR22	Cameroon	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	18 egl
RUN0155	PSS366	Taiwan	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2003	15 egl
RUN0183	CFBP7046	Cameroon	-	<i>Solanum scabrum</i>	2005	13 egl
RUN0215	CFBP7058	Cameroon	-	<i>Solanum scabrum</i>	2005	13 egl
RUN0257	PSS219	Taiwan	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	1996	12 egl
RUN0258	PSS81	Taiwan	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	14 egl
RUN0304	MAD-001	Madagascar	1321	<i>Solanum lycopersicum</i>	2006	18 egl
RUN0305	MAD-002	Madagascar	1321	<i>Solanum lycopersicum</i>	2006	18 egl
RUN0306	MAD-003	Madagascar	15	<i>Capsicum annuum</i>	2006	18 egl
RUN0309	MAD-006	Madagascar	15	<i>Capsicum annuum</i>	2006	18 egl
RUN0312	MAD-009	Madagascar	21	<i>Solanum melongena</i>	2006	18 egl
RUN0317	MAD-014	Madagascar	30	<i>Solanum scabrum</i>	2006	18 egl
RUN0318	MAD-015	Madagascar	30	<i>Solanum melongena</i>	2006	18 egl
RUN0319	MAD-016	Madagascar	-	<i>Capsicum annuum</i>	2006	46 egl
RUN0320	MAD-017	Madagascar	27	<i>Capsicum annuum</i>	2006	46 egl
RUN0328	MAD-025	Madagascar	15	<i>Capsicum annuum</i>	2006	18 egl
RUN0337	P11	China	-	<i>Arachis hypogaea</i>	-	17 egl
RUN0343	M02	China	-	<i>Morus alba</i>	-	48 egl
RUN0466	JS759	Trinidad	-	<i>Musa.sp.cv.mysore</i>	1968	18 egl
RUN0471	JT519	Reunion	-	<i>Pelargonium asperum</i>	1993	31 egl
RUN0597	GMI8254	Indonesia	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	47 egl
RUN0608	JT523	Reunion	-	<i>Solanum tuberosum</i>	-	13 egl
RUN1528	JT523	Reunion	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2004	14 egl
RUN1798	CIV61	Ivory Coast	-	<i>Solanum melongena</i>	2010	13 egl
RUN1801	CIV64	Ivory Coast	-	<i>Capsicum annuum</i>	2010	31 egl
RUN1833	CIV96	Ivory Coast	-	<i>Solanum melongena</i>	2010	44 egl
RUN1880	CIV124	Ivory Coast	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	46 egl
RUN1919	CIV163	Ivory Coast	-	<i>Capsicum annuum</i>	2011	14 egl
RUN1948	E02PO10	French Guiana	-	<i>Capsicum annuum</i>	2011	17 egl
RUN2177	E'4T3	French Guiana	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2012	47 egl
RUN2231	E'8B13P4	French Guiana	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2012	17 egl
RUN2241	E8B11P7	French Guiana	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2012	14 egl
RUN3647	36MAR	Bénin	-	<i>Solanum macrocarpon</i>	2014	31 egl
RUN5277	-	Reunion	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2015	31 egl

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

B. Collection de souches malgaches phylotype I (n = 70).

RUN ID	Strain ID	ZAE	Host	Altitude (m)	Year	Sequevar
RUN3077	MGII081	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3078	MGII082	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3080	MGII076	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3082	MGII083	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3083	MGII086	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3084	MGII088	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3085	MGII089	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3089	MGII094	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3108	MGII0116	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3109	MGII0117	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3110	MGII0118	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3112	MGII0120	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3113	MGII0121	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3114	MGII0122	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3120	MGII0128	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18
RUN3129	MGII0138	ZAE 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	1252	2013	18
RUN3134	MGII0147	ZAE 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	1252	2013	18
RUN3136	MGII0152	ZAE 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	1252	2013	18
RUN3137	MGII0154	ZAE 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	1252	2013	18
RUN3148	MGII0166	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	58
RUN3149	MGII0168	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	58
RUN3151	MGII0171	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	58
RUN3159	MGII0186	ZAE 6	<i>Solanum lycopersicum</i>	1266	2013	18
RUN3162	MGII0189	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1266	2013	18
RUN3163	MGII0190	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1266	2013	18
RUN3164	MGII0191	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1266	2013	18
RUN3171	MGII0209	ZAE 6	<i>Solanum nigrum</i>	1266	2013	18
RUN3180	MGII0218	ZAE 7	<i>Solanum tuberosum</i>	1477	2013	18
RUN3208	MGII0248	ZAE 7	<i>Solanum tuberosum</i>	1433	2013	18
RUN3210	MGII0250	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	18
RUN3211	MGII0251	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	58
RUN3213	MGII0253	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	18
RUN3214	MGII0254	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	18
RUN3216	MGII0257	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	58
RUN3219	MGII0260	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	18
RUN3222	MGII0263	ZAE 8	<i>Solanum lycopersicum</i>	1176	2013	18
RUN3243	MGII0292	ZAE 8	<i>Capsicum annuum</i>	1194	2013	18
RUN3247	MGII0298	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3256	MGII0336	ZAE 9	<i>Solanum tuberosum</i>	1377	2013	18
RUN3257	MGII0337	ZAE 9	<i>Solanum tuberosum</i>	1377	2013	18
RUN3264	MGII0347	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3275	MGII0366	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3277	MGII0368	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3278	MGII0369	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3279	MGII0370	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3280	MGII0371	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3281	MGII0372	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3284	MGII0375	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3285	MGII0376	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3286	MGII0377	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	18
RUN3288	MGII0382	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	18
RUN3289	MGII0383	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	18
RUN3290	MGII0384	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	18
RUN3291	MGII0385	ZAE 6	<i>Solanum tuberosum</i>	1251	2013	18
RUN3458	MGII0302	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3459	MGII0303	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3460	MGII0304	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3461	MGII0305	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3462	MGII0306	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3464	MGII0308	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3466	MGII0310	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3467	MGII0311	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3468	MGII0312	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3469	MGII0313	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3470	MGII0314	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3471	MGII0315	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3472	MGII0316	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1256	2013	18
RUN3480	MGII0348	ZAE 9	<i>Solanum gilo</i>	1230	2013	18
RUN3507	MGII091	ZAE 7	<i>Solanum lycopersicum</i>	1340	2013	18

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

C. Collection de souches de référence phytotype II (n = 36).

Phytotype II : Souches de REFERENCE

RUNID	Souche ID	Pays	Hôte	Année d'isolement	Sequenar	MT	RS2BL21						RS2A01	RS2BL22	RS2BL24	RS2BL25	L563	Génotypage	Collection
							RS2BL21	L504	RS2A01	L539	L540	RS2BL22							
RUN0001	IPO1609	Netherlands	<i>Solanum tuberosum</i>	1995	1	MTII-6	11	12	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0016	CFBP6784	Martinique	<i>Anthurium andeanum</i>	1999	4NPB	MTII-50	3	3	2	2	2	7	4	3	7	MLVA	-		
RUN0040	CIP10	Peru	<i>Solanum tuberosum</i>	1979	25	MTII-48	10	2	4	2	3	5	15	1	8	MLVA	-		
RUN0041	CIP117	Nigeria	<i>Solanum tuberosum</i>	1968	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0074	MOLK2	Philippines	<i>Musa sp.</i>	1991	3	MTII-52	5	4	4	2	15	4	10	7	2	MLVA	-		
RUN0081	NCPPB3987	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>	-	28	MTII-49	3	2	4	1	6	4	5	3	6	MLVA	-		
RUN0147	CFBP7029	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	1	MTII-47	12	8	4	0	13	6	10	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0160	JT516	Reunion	<i>Solanum tuberosum</i>	1993	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0256	PSS525	Taiwan	<i>Solanum tuberosum</i>	2000	1	MTII-44	11	9	4	6	13	4	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0262	UW170	Colombia	<i>Heliconia rostrata</i>	1961	4	MTII-51	3	3	2	2	2	8	2	3	7	MLVA	-		
RUN0299	IBSBF1712	Brazil	<i>Pelargonium asperum</i>	2002	27	MTII-53	7	6	4	2	2	10	15	4	6	MLVA	-		
RUN0336	PO41	China	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-26	11	5	4	5	8	6	9	4	6	MLVA	CREF-II		
RUN0371	DGBBC1181	Belgium	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-34	11	8	4	5	13	5	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0372	M07/02	Mali	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-19	12	8	4	5	13	5	9	4	9	MLVA	CREF-II		
RUN0374	RTG5	Guinea	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0439	RM	Uruguay	<i>Solanum tuberosum</i>	2003	1	MTII-42	11	8	4	7	12	6	9	4	8	MLVA	CREF-II		
RUN0449	UW551	Kenya	<i>Pelargonium asperum</i>	2003	1	MTII-29	11	8	4	0	13	6	9	4	8	MLVA	CREF-II		
RUN0469	JT572	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>	1998	1	MTII-35	11	8	4	5	13	6	10	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0470	JT573	Rwanda	<i>Solanum tuberosum</i>	1998	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0573	LMG2300	Israel	<i>Solanum tuberosum</i>	1954	1	MTII-8	11	8	4	4	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0575	LMG17139	Cyprus	<i>Solanum tuberosum</i>	1963	1	MTII-18	12	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0576	LMG6973	Uganda	<i>Solanum tuberosum</i>	1985	1	MTII-27	11	7	4	5	13	7	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0621	PD441	Sweden	<i>Solanum tuberosum</i>	1984	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0630	CFBP3863	Maroco	<i>Solanum tuberosum</i>	1995	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0631	CFBP3583	Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>	1995	1	MTII-22	11	10	4	4	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0632	CFBP4788	France	<i>Solanum lycopersicum</i>	1995	1	MTII-8	11	8	4	4	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0633	CFBP4787	Portugal	<i>Solanum tuberosum</i>	1995	1	MTII-36	11	8	4	5	13	6	2	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0652	LNPV27.43	Guadeloupe	<i>Anthurium andeanum</i>	2003	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0680	CFBP1417	Australia	<i>Solanum tuberosum</i>	1965	1	MTII-39	11	8	4	5	14	6	9	4	8	MLVA	CREF-II		
RUN0682	CFBP1810	Reunion	<i>Solanum tuberosum</i>	1976	1	MTII-33	11	8	4	5	13	4	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0704	CFBP7101	Spain	<i>Solanum tuberosum</i>	1996	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0867	CFBP4585	Turkey	<i>Solanum tuberosum</i>	1995	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0870	CFBP4588	United Kingdom	<i>Solanum tuberosum</i>	1996	1	MTII-9	11	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0891	CFBP4609	Slovenia	<i>Solanum tuberosum</i>	1997	1	MTII-43	11	8	5	7	13	6	10	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0903	JS925	Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-18	12	8	4	5	13	6	9	4	7	MLVA	CREF-II		
RUN0906	JS926	India	<i>Solanum tuberosum</i>	-	1	MTII-30	11	8	4	4	13	5	9	4	7	MLVA	CREF-II		

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

D. Collection de souches malgaches phylotype II (n = 285).

Phylotype II : Souches malgaches

RUNID	Strain ID	ZAE	PARCELLE	Hôte	Prospection	Année	Altitude (m)	SEQUVAR	MT	Profil MLVA										Génotypage	Collection
										RS2BL25	L539	RS2BL22	L540	RS2BL21	RS2AL01	RS2BL24	L563	L504			
RUN2243	P1M-M1-3	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2244	P1M-M1-4	ZAE1	S46	<i>Rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2246	P1M-M1-6	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2247	P1M-M1-7	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2248	P1M-M1-8	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2249	P1M-M1-9	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2250	P1M-M1-10	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2251	P1M-M1-11	ZAE1	S46	<i>Rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	MTII-14	4	5	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II	
RUN2252	P1M-M1-12	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2253	P1M-M1-13	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2254	P2MD1	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2255	P2MD2-1	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2256	P2MD2-2	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2256	P2MD2-2	ZAE1	S46	<i>Rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2257	P2MD2-3	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2258	P2MD2-4	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2259	P2MD2-4	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2260	P2MD2-6	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2261	P2MD2-7	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2262	P2MD2-8	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2263	P2MD2-9	ZAE1	S46	<i>Rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	MTII-5	4	7	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2264	P2MD2-10	ZAE1	S46	<i>rhizosphere</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2266	TG3B	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1605	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2267	TG5C	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1650	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2268	TG6B	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1650	1	MTII-13	4	6	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2269	TG7C	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1650	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2270	TB6A	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1650	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2271	TB5B	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Octobre	2012	1650	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN2272	TB6B	ZAE1	S41	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2012	1650	1	MTII-13	4	6	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2275	MG-201	ZAE2	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2012	1609	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II	
RUN2284	MG-017	ZAE1	S44	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1665	1	MTII-7	1	5	6	13	11	1	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2300	MG-034	ZAE1	S43	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1657	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II	
RUN2307	MG-202	ZAE1	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1609	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2314	MG-049	ZAE1	S14	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1678	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II	
RUN2316	MG-051	ZAE1	S14	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1678	1	MTII-11	4	5	6	14	11	4	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II	
RUN2325	MG-060	ZAE1	S18	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1660	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2338	MG-076	ZAE1	S18	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1660	1	MTII-13	4	6	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2351	MG-089	ZAE1	S17	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1663	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II	
RUN2360	MG-099	ZAE1	S17	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1663	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2365	MG-105	ZAE1	S15	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1659	1	MTII-31	4	4	6	13	11	4	9	8	8	MLVA	CMG-II	
RUN2382	MG-123	ZAE1	S15	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1659	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II	
RUN2391	MG-134	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2392	MG-135	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2393	MG-136	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2394	MG-137	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2395	MG-138	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II	
RUN2396	MG-140	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2397	MG-141	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2398	MG-142	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-2	4	5	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2399	MG-143	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2400	MG-144	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2401	MG-145	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2402	MG-146	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2403	MG-147	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2404	MG-148	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2405	MG-149	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2406	MG-150	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II	
RUN2407	MG-151	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2408	MG-153	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2409	MG-154	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2410	MG-155	ZAE2	S67	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1611	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2411	MG-156	ZAE2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II	
RUN2412	MG-157	ZAE2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-7	1	5	6	13	11	1	9					

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

D. suite

Phylotype II : Souches malgaches (suite)

RUNID	Strain ID	ZAE	PARCELLE	Hôte	Prospection	Année	Altitude (m)	SEQUVAR	MT	Profil MLVA							Génotypage	Collection		
										RS2BL25	L539	RS2BL22	L540	RS2BL21	RS2AL01	RS2BL24	L563	L504		
RUN2420	MG-165	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2421	MG-166	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-10	4	5	6	13	11	4	9	8	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2422	MG-167	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-20	1	6	6	11	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2423	MG-168	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2424	MG-169	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-2	4	5	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2425	MG-170	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2426	MG-171	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2427	MG-172	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2428	MG-173	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2429	MG-174	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2430	MG-175	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2431	MG-176	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2432	MG-177	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2433	MG-178	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1629	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2456	MG-001	ZAE 1	S16	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1665	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2457	MG-003	ZAE 1	S16	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1665	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2477	MG-233	ZAE 2	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1604	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2529	MG-405	ZAE 4	S52	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1593	1	MTII-12	4	6	6	13	11	4	10	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2534	MG-410	ZAE 4	S52	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1593	1	MTII-12	4	6	6	13	11	4	10	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2539	MG-415	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2540	MG-416	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2541	MG-417	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2542	MG-418	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2543	MG-419	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2544	MG-420	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2545	MG-421	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2546	MG-422	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2547	MG-423	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2548	MG-424	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2549	MG-425	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2550	MG-426	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2551	MG-427	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2552	MG-428	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-13	4	6	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2553	MG-429	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2554	MG-430	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2555	MG-431	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2556	MG-432	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2557	MG-433	ZAE 4	S53	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1594	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2573	MG-455	ZAE 4	S55	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1596	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2588	MG-475	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2589	MG-476	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2590	MG-477	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2591	MG-478	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2593	MG-480	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2595	MG-482	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2596	MG-483	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2597	MG-484	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2598	MG-486	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2599	MG-487	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2600	MG-488	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2601	MG-489	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2602	MG-490	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2603	MG-491	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2604	MG-492	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2605	MG-493	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2606	MG-494	ZAE 4	S56	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2607	MG-495	ZAE 4	S56	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2608	MG-497	ZAE 4	S56	<i>Solanum lycopersicum</i>	Avril	2013	1573	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2646	MG-338	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2647	MG-339	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2648	MG-340	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-2	4	5									

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

D. suite

Phylotype II : Souches malgaches (suite)

RUNID	Strain ID	ZAE	PARCELLE	Hôte	Prospection	Année	Altitude (m)	SEQUENVAR	MT	Profil MLVA								Génotypage	Collection	
										RS2BL25	L539	RS2BL22	L540	RS2BL21	RS2AL01	RS2BL24	L563	L504		
RUN2658	MG-350	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2659	MG-351	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2660	MG-352	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2661	MG-353	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2662	MG-356	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2663	MG-357	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-45	4	3	6	13	12	1	9	7	10	egi, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2664	MG-358	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2665	MG-359	ZAE 2	S64	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1521	1	MTII-16	4	3	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2677	MG-392	ZAE 4	S54	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1591	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2730	MG-559	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-7	1	5	6	13	11	1	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2731	MG-560	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2732	MG-561	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2733	MG-562	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2734	MG-563	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2735	MG-564	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2736	MG-565	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2737	MG-566	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2738	MG-567	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2739	MG-568	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egi, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2740	MG-569	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2741	MG-570	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2742	MG-570	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2743	MG-571	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2744	MG-572	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2745	MG-573	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2746	MG-574	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2747	MG-575	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-32	4	5	2	10	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2748	MG-576	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2749	MG-577	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-11	4	5	6	14	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2750	MG-578	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2751	MG-579	ZAE 3	S65	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1947	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2756	MG-585	ZAE 3	S11	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1941	1	MTII-38	4	5	6	13	11	4	9	6	8	MLVA	CMG-II
RUN2852	MG-697	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2853	MG-699	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2854	MG-700	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2856	MG-702	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2857	MG-703	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2858	MG-704	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2859	MG-706	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2860	MG-707	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2861	MG-708	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2862	MG-709	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2863	MG-710	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2864	MG-711	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2865	MG-712	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-7	1	5	6	13	11	1	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2866	MG-713	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2867	MG-714	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egi, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2868	MG-715	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2869	MG-716	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2870	MG-717	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2871	MG-718	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLSA, MLVA	CMG-II
RUN2872	MG-719	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	egi, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN2873	MG-720	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-17	4	6	6	13	12	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2874	MG-721	ZAE 1	S48	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1730	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2875	MG-722	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2876	MG-723	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2877	MG-724	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2878	MG-725	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2879	MG-726	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2880	MG-727	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-1	1	6	6	13	11	1	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2881	MG-728	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-8	4	4	6	13	11	4	9	7	8	egi, 630/63	

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

D. suite

Phylotype II : Souches malgaches (suite)

RUNID	Strain ID	ZAE	PARCELLE	Hôte	Prospection	Année	Altitude (m)	SEQUVAR	MT	Profil MLVA						Génotypage	Collection			
										RS2BL2.5	L539	RS2BL2.2	L540	RS2BL2.1	RS2AL01	RS2BL2.4	L563	L504		
RUN2892	MG-739	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2893	MG-740	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-6	4	5	6	13	11	4	9	7	12	MLVA	CMG-II
RUN2894	MG-741	ZAE 1	S49	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1725	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2915	MG-763	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2916	MG-764	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-24	4	6	6	14	11	4	9	8	10	MLVA	CMG-II
RUN2917	MG-766	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2918	MG-767	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-4	4	6	6	14	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2919	MG-768	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2920	MG-770	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2921	MG-772	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-4	4	6	6	14	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2923	MG-774	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2924	MG-776	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2927	MG-782	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-15	4	6	6	13	11	4	9	7	9	MLVA	CMG-II
RUN2928	MG-783	ZAE 1	S47	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1392	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	MLVA	CMG-II
RUN2945	MG-813	ZAE 1	S45	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1364	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2955	MG-823	ZAE 1	S45	<i>Solanum tuberosum</i>	Avril	2013	1364	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2980	MG-182	ZAE 1	S42	eau d'irrigation	Avril	2013	na	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN2982	MG-184	ZAE 1	S42	eau d'irrigation	Avril	2013	na	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3032	MAD-038	ZAE 5	S57	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1313	1	MTII-4	4	6	6	14	11	4	9	7	10	MILSA, MLVA	CMG-II
RUN3035	MAD-041	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3036	MAD-042	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3037	MAD-043	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-6	4	5	6	13	11	4	9	7	12	MLVA	CMG-II
RUN3039	MAD-044	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3040	MAD-045	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MILSA, MLVA	CMG-II
RUN3041	MAD-048	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3042	MAD-050	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3043	MAD-051	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-3	4	6	6	13	11	4	9	7	10	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3044	MAD-052	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-6	4	5	6	13	11	4	9	7	12	MLVA	CMG-II
RUN3045	MAD-053	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3046	MAD-046	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3047	MAD-047	ZAE 7	S62	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1347	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3123	MAD-133	ZAE 7	S63	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1340	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3132	MG-143	ZAE 4	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN3152	MAD-159	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-25	4	6	6	13	11	4	9	7	12	MLVA	CMG-II
RUN3153	MAD-160	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3154	MAD-161	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-37	3	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3155	MAD-162	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3156	MAD-163	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3157	MAD-164	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3158	MAD-165	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-28	4	5	6	14	11	1	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3160	MAD-167	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3161	MAD-168	ZAE 6	S51	<i>Solanum lycopersicum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3166	MAD-173	ZAE 6	S51	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3167	MAD-174	ZAE 6	S51	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MILSA, MLVA	CMG-II
RUN3169	MAD-176	ZAE 6	S51	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1266	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3170	MAD-178	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3178	MAD-216	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN3181	MAD-219	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN3183	MAD-221	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN3186	MAD-224	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	egl, 630/631	-	
RUN3187	MAD-227	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3189	MAD-230	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1477	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3194	MAD-232	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1433	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3199	MAD-207	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1433	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3207	MAD-215	ZAE 7	S61	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1433	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MILSA, MLVA	CMG-II
RUN3229	MAD-235	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3232	MAD-238	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MILSA, MLVA	CMG-II
RUN3233	MAD-239	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3234	MAD-240	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3238	MAD-244	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-41	4	5	6	3	11	4	9	7	8	MLVA	CMG-II
RUN3240	MAD-246	ZAE 8	S2	<i>Solanum tuberosum</i>	Décembre	2013	1176	1	MTII-9	4	5	6	13	11	4	9	7	8	egl, 630/631, MLVA	CMG-II
RUN3350																				

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

E. Collection de souches de référence phylotype III (n = 65).

Phylotype III : Souches malgaches

RUNID	Strain ID	ZAE	altitude	Parcille	Sequenar	Host	Year	CC MLVA	Profil MLST											Profil MLVA																																										
									CLIII	ST	gdhA							MT	RS31.27				RS31.28				RS31.29				RS31.30				RS31.31				RS31.32				RS31.33				RS31.34				RS31.35				RS31.36				RS31.37			
											clIII-9	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-129	7	3	2	12	5	7	2	2	21	7	3	5	6	3	5	13	7	3	2	10	4	6	2	2	26	9	3	5	6	3	3	12										
RUN2276	MG006	ZAE 1	1665	S16	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-9	STIII-39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-64	7	3	2	10	4	6	2	2	26	9	3	5	6	3	3	12																										
RUN2278	MG008	ZAE 1	1665	S16	-	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-11	CLIII-9	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-64	7	3	2	10	4	6	2	2	26	9	3	5	6	3	3	12																												
RUN2279	MG009	ZAE 1	1665	S16	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-11	CLIII-9	STIII-34	25	22	13	11	26	64	74	MTIII-87	8	3	2	8	11	9	2	2	12	9	3	7	6	4	5	12																												
RUN2280	MG011	ZAE 1	1665	S16	56	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-9	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2285	MG018	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2288	MG021	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-59	7	3	2	12	5	7	2	2	19	7	3	5	6	3	5	13																												
RUN2290	MG024	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-49	7	3	2	8	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2291	MG025	ZAE 1	1657	S21	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-2	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-133	7	3	2	12	5	7	2	2	19	7	3	5	5	3	5	13																												
RUN2292	MG026	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-59	7	3	2	12	5	7	2	2	19	7	3	5	6	3	5	13																												
RUN2293	MG027	ZAE 1	1657	S21	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-2	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-127	7	3	2	12	5	8	2	2	19	7	3	5	6	3	5	13																												
RUN2294	MG028	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-59	7	3	2	12	5	7	2	2	19	7	3	5	6	3	5	13																												
RUN2296	MG030	ZAE 1	1657	S21	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-49	7	3	2	8	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2298	MG032	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-49	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2301	MG035	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2304	MG038	ZAE 1	1657	S21	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2305	MG039	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-104	7	3	2	9	4	7	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2306	MG040	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2308	MG042	ZAE 1	1657	S21	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-2	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2309	MG043	ZAE 1	1657	S21	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-103	7	3	2	9	4	7	2	2	23	9	3	5	6	4	3	13																												
RUN2310	MG044	ZAE 1	1657	S21	57	<i>Phaselis vulgaris</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2311	MG045	ZAE 1	1678	S14	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-8	STIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2312	MG047	ZAE 1	1678	S14	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-8	STIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2318	MG053	ZAE 1	1660	S18	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-7	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-130	7	3	2	12	5	7	2	2	21	6	3	5	6	3	5	13																												
RUN2320	MG055	ZAE 1	1660	S18	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-7	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-60	7	3	2	12	5	7	2	2	19	7	3	5	6	3	5	13																												
RUN2322	MG057	ZAE 1	1660	S18	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-109	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	4	3	13																												
RUN2327	MG062	ZAE 1	1660	S18	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-49	7	3	2	8	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2329	MG064	ZAE 1	1660	S18	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2330	MG065	ZAE 1	1660	S18	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2334	MG069	ZAE 1	1660	S18	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-7	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-128	7	3	2	12	5	7	2	2	22	7	3	5	6	3	5	14																												
RUN2345	MG083	ZAE 1	1663	S17	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-7	STIII-33	24	22	13	11	6	65	72	MTIII-63	9	3	2	9	7	4	2	2	13	9	3	5	5	4	6	12																												
RUN2347	MG085	ZAE 1	1663	S17	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-7	STIII-7	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-63	9	3	2	9	7	4	2	2	13	9	3	5	5	4	6	12																												
RUN2349	MG087	ZAE 1	1663	S17	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-7	STIII-7	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-63	9	3	2	9	7	4	2	2	13	9	3	5	5	4	6	12																												
RUN2352	MG090	ZAE 1	1663	S17	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-49	7	3	2	8	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2355	MG093	ZAE 1	1663	S17	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-7	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13																												
RUN2357	MG095	ZAE 1	1663	S17	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII																																																					

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

E. Collection de souches malgaches de phylotype III (n = 215).

Phylotype III : Souches malgaches

RUNID	Strain ID	ZAE	altitude	Parcelle	Sequevar	Host	Year	CC MLVA	Profil MLST										Profil MLVA																	
									CLIII					ST	gdhA					STII-35					MT					RS31.27						
									CLIII-9	CLIII-10	CLIII-11	CLIII-12	CLIII-13		eyB	mpB	leuS	adk	mutS	egI	MTIII-64	MTIII-65	MTIII-66	MTIII-67	MTIII-68	MTIII-69	MTIII-70	MTIII-71	MTIII-72	MTIII-73	MTIII-74	MTIII-75	MTIII-76	MTIII-77	MTIII-78	MTIII-79
RUN2278	MG008	ZAE 1	1665	S16	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-11	CLIII-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-64	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN3387	MAD429	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3389	MAD430	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN3390	MAD431	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-62	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3391	MAD432	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3401	MAD441	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3241	MAD247	ZAE 7	1194	S3	na	<i>Capsicum annuum</i>	2013	-	CLIII-11	STII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-115	7	3	2	7	4	18	2	2	27	7	3	5	5	3	4	8		
RUN3242	MAD248	ZAE 7	1194	S3	na	<i>Capsicum annuum</i>	2013	-	CLIII-11	STII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-115	7	3	2	7	4	15	2	2	28	7	3	5	5	4	5	9		
RUN3244	MAD250	ZAE 7	1194	S3	na	<i>Capsicum annuum</i>	2013	-	CLIII-11	STII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-146	6	3	2	7	4	17	2	2	28	7	3	5	5	3	5	9		
RUN2979	MG181	ZAE 1	na	S23	na	<i>Water of irrigation</i>	2013	-	CLIII-7	STII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-54	7	3	2	13	4	11	2	2	21	9	3	5	6	4	18	10		
RUN2981	MG183	ZAE 1	na	S23	na	<i>Water of irrigation</i>	2013	-	CLIII-7	STII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-54	7	3	2	13	4	11	2	2	21	9	3	5	6	4	18	10		
RUN2983	MG185	ZAE 1	na	S23	na	<i>Water of irrigation</i>	2013	-	CLIII-7	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-54	7	3	2	13	4	11	2	2	21	9	3	5	6	4	18	10			
RUN2984	MG186	ZAE 1	na	S23	na	<i>Water of irrigation</i>	2013	-	CLIII-7	STII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-54	7	3	2	13	4	11	2	2	21	9	3	5	6	4	18	10		
RUN2985	MG188	ZAE 1	na	S23	na	<i>Water of irrigation</i>	2013	-	CLIII-7	STII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-122	7	3	2	13	4	11	2	2	21	9	3	5	6	5	17	10		
RUN3362	MAD404	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-66	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3363	MAD405	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3364	MAD406	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-145	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	2	13		
RUN3365	MAD407	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-140	7	3	2	10	4	7	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3366	MAD408	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-144	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	4	3	13		
RUN3367	MAD409	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-66	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3368	MAD410	ZAE 10	1641	S37	na	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-66	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3324	MAD362	ZAE 10	1725	S29	na	<i>Physalis sp.</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-6	STII-37	25	22	15	11	23	7	73	MTIII-69	7	3	3	13	5	3	2	2	25	9	3	7	6	4	13			
RUN2310	MG044	ZAE 1	1657	S21	na	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-2	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3430	MAD453	ZAE 7	1390	S5	na	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2013	-	CLIII-4	STII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-160	11	3	2	14	5	26	2	2	57	9	3	5	7	3	17	14		
RUN3336	MAD375	ZAE 10	1642	S33	na	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13			
RUN2922	MG773	ZAE 1	1392	S25	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-3	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3380	MAD423	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-70	7	3	2	10	4	6	2	2	22	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3381	MAD424	ZAE 11	1338	S38	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-70	7	3	2	10	4	6	2	2	22	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3392	MAD433	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3393	MAD434	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-70	7	3	2	10	4	6	2	2	22	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3402	MAD442	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-62	7	3	2	10	4	6	2	2	27	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3403	MAD443	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-142	7	3	2	10	4	6	2	2	28	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3404	MAD444	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-147	6	3	2	11	5	7	2	2	27	9	3	5	6	3	3	13		
RUN3405	MAD445	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-62	7	3	2	10	4	6	2	2	27	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3407	MAD447	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-61	7	3	2	11	4	6	2	2	27	9	3	5	6	3	3	13			
RUN3409	MAD449	ZAE 11	1351	S39	na	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-51	7	3	2	10	4														

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

E. Suite

Phylotype III : Souches malgaches (suite)

RUNID	Strain ID	ZAE	altitude	Parcelle	Sequevar	Host	Year	CC MLVA	Profil MLST										Profil MLVA															
									CLIII	ST	gdhA	gyrB	mpB	leuS	adk	mutS	regI	MT	RS31.27	RS31.28	RS31.29	RS31.32	RS31.33	RS31.34	RS31.35	RS31.36	RS31.10	RS31.37	RS31.12					
RUN2706	MG533	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-10	CLIII-8	STIII-40	3	22	12	11	25	7	11	MTIII-84	9	3	2	8	14	3	2	3	15	9	3	7	4	3	3	15
RUN2709	MG537	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-55	7	3	2	12	5	7	2	2	21	7	3	5	6	3	5	14
RUN2712	MG540	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-121	7	3	2	13	5	7	2	2	21	7	3	5	6	3	5	14
RUN2713	MG542	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-137	7	3	2	11	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	13
RUN2714	MG543	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-97	8	3	2	11	5	7	2	2	20	6	3	5	6	3	5	13
RUN2715	MG544	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-135	7	3	2	12	5	6	2	2	21	7	3	5	6	3	5	14
RUN2716	MG545	ZAE 3	1950	S13	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-41	3	22	13	11	23	7	73	MTIII-153	12	3	2	9	8	5	2	2	34	7	3	5	11	4	5	6
RUN2717	MG546	ZAE 3	1950	S13	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	STIII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-52	7	3	2	7	4	22	2	2	30	7	3	5	5	3	5	9
RUN2718	MG547	ZAE 3	1950	S13	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-8	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-107	7	3	2	8	4	6	2	2	24	9	3	5	6	4	3	13
RUN2719	MG548	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-123	7	3	2	12	6	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2720	MG549	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-56	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2721	MG550	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-120	7	3	2	13	5	8	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2722	MG551	ZAE 3	1950	S13	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-41	3	22	13	11	23	7	73	MTIII-149	13	3	2	13	7	4	2	2	34	7	3	5	11	4	5	9
RUN2725	MG554	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-56	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2726	MG555	ZAE 3	1950	S13	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-52	7	3	2	7	4	22	2	2	30	7	3	5	5	3	5	9	
RUN2727	MG556	ZAE 3	1950	S13	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-60	7	3	2	12	5	7	2	2	19	6	3	5	6	3	5	13
RUN2753	MG603	ZAE 3	1937	S10	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	STIII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-111	7	3	2	7	4	23	2	2	30	7	3	5	5	3	5	9
RUN2757	MG587	ZAE 3	1941	S11	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-58	7	3	2	12	5	7	2	2	20	6	3	5	6	3	5	13	
RUN2758	MG588	ZAE 3	1941	S11	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	STIII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-114	7	3	2	7	4	19	2	2	30	7	3	5	5	3	5	9
RUN2759	MG589	ZAE 3	1941	S11	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-56	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14	
RUN2760	MG590	ZAE 3	1941	S11	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-56	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2761	MG591	ZAE 3	1941	S11	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-56	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14	
RUN2762	MG592	ZAE 3	1941	S11	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-131	7	3	2	12	5	7	2	2	20	7	3	5	6	4	5	14
RUN2763	MG593	ZAE 3	1941	S11	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-10	CLIII-8	STIII-40	3	22	12	11	25	7	11	MTIII-83	9	3	2	8	14	3	2	3	16	9	3	7	4	3	3	15
RUN2767	MG597	ZAE 3	1941	S11	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-125	7	3	2	12	5	9	2	2	20	6	3	5	6	3	5	14
RUN2770	MG604	ZAE 3	1937	S10	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	STIII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-110	7	3	2	7	4	23	2	2	31	7	3	5	5	3	5	9
RUN2771	MG605	ZAE 3	1937	S10	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-119	7	3	2	14	5	7	2	2	20	6	3	5	6	3	4	13
RUN2774	MG608	ZAE 3	1937	S10	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-58	7	3	2	12	5	7	2	2	20	6	3	5	6	3	5	13	
RUN2776	MG610	ZAE 3	1937	S10	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	STIII-44	3	27	11	11	24	7	73	MTIII-113	7	3	2	7	4	21	2	2	31	8	3	5	5	3	5	9
RUN2784	MG618	ZAE 3	1937	S10	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-53	7	3	2	13	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14	
RUN2785	MG620	ZAE 3	1937	S10	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-5	CLIII-8	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-112	7	3	2	7	4	22	2	2	30	8	3	5	5	3	5	9	
RUN2786	MG621	ZAE 3	1937	S10	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-8	STIII-42	3	22	13	11	23	7	11	MTIII-154	11	3	3	7	6	6	2	2	19	9	3	5	13	4	8	12
RUN2897	MG744	ZAE 1	1797	S22	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-7	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-53	7	3	2	13	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2910	MG758	ZAE 1	1797	S23	19	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-7	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-53	7	3	2	13	5	7	2	2	20	7	3	5	6	3	5	14
RUN2922	MG773	ZAE 1	1392	S25	57	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-3	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-51	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN2925	MG778	ZAE 1	1392	S25	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	-	CLIII-3	STIII-42	3	22	13	11	23	7	11	MTIII-155	11	3	3	6	3	3	2	2	18	9	3	5	12	4	9	13
RUN2963	MG831	ZAE 1	1357	S24	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-3	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-50	7	3	2	8	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	4	13
RUN2967	MG835	ZAE 1	1357	S24	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-8	CLIII-3	STIII-39	3	13	11	11	24	7	11	MTIII-152	10	3	2	10	5	15	2	2	45	9	3	5	6	3	14	16
RUN2976	MG845	ZAE 1	1357	S24	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-3	STIII-35																								

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

E. Suite

Phylotype III : Souches malgaches (suite)

RUNID	Strain ID	ZAE	altitude	Parcelle	Sequevar	Host	Year	CC MLVA	Profil MLST										Profil MLVA															
									CLIII	ST	gdpA	eyrB	tpIB	leuS	adk	mutS	egI	MT	RS31.27	RS31.28	RS31.29	RS31.7	RS31.19	RS31.30	RS31.31	RS31.32	RS31.33	RS31.34	RS31.35	RS31.36	RS31.10	RS31.37	RS31.12	
RUN3317	MAD355	ZAE 10	1725	S29	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-2	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-58	7	3	2	12	5	7	2	2	20	6	3	5	6	3	5	13
RUN3321	MAD359	ZAE 10	1725	S29	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-100	7	3	3	13	5	3	2	2	26	9	3	7	5	4	4	13
RUN3324	MAD362	ZAE 10	1725	S29	57	<i>Physalis sp.</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-69	7	3	3	13	5	3	2	2	25	9	3	7	6	4	4	13
RUN3325	MAD363	ZAE 10	1634	S31	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-80	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	4	3	13	
RUN3326	MAD364	ZAE 10	1637	S32	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3327	MAD365	ZAE 10	1637	S32	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3328	MAD366	ZAE 10	1637	S32	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3329	MAD367	ZAE 10	1637	S32	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3330	MAD369	ZAE 10	1637	S32	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN3331	MAD370	ZAE 10	1637	S32	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-80	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	4	3	13
RUN3334	MAD373	ZAE 10	1642	S33	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-79	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	12
RUN3335	MAD374	ZAE 10	1642	S33	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN3336	MAD375	ZAE 10	1642	S33	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-82	7	3	2	9	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3339	MAD377	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3340	MAD378	ZAE 10	1629	S35	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-71	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13
RUN3341	MAD379	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-79	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	12	
RUN3342	MAD380	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-76	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	4	3	13	
RUN3343	MAD381	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3344	MAD382	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-76	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	4	3	13	
RUN3345	MAD383	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3346	MAD384	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-35	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-71	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13
RUN3347	MAD385	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3348	MAD386	ZAE 10	1629	S35	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-105	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	14
RUN3349	MAD387	ZAE 10	1629	S35	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-78	7	3	2	9	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3355	MAD394	ZAE 10	1579	S36	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-71	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13	
RUN3356	MAD397	ZAE 10	1579	S36	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-73	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13
RUN3358	MAD400	ZAE 10	1579	S36	-	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-73	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13	
RUN3360	MAD402	ZAE 10	1579	S36	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-6	CLIII-5	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-71	7	3	3	13	5	3	2	2	24	9	3	7	6	4	4	13
RUN3361	MAD403	ZAE 10	1579	S36	57	<i>Solanum tuberosum</i>	2013	CC MTIII-11	CLIII-10	STIII-37	25	22	25	11	23	7	73	MTIII-101	7	3	3	13	5	3	2	2	23	9	3	7	6	4	4	13
RUN3362	MAD404	ZAE 10	1641	S37	57	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-66	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13
RUN3363	MAD405	ZAE 10	1641	S37	-	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3364	MAD406	ZAE 10	1641	S37	57	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-145	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	7	6	4	3	13
RUN3365	MAD407	ZAE 10	1641	S37	57	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-140	7	3	2	10	4	7	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13
RUN3366	MAD408	ZAE 10	1641	S37	57	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-144	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	4	3	13
RUN3367	MAD409	ZAE 10	1641	S37	-	<i>Pelargonium</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-5	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-62	7	3	2	10	4	6	2	2	24	9	3	5	6	3	3	13
RUN3368	MAD410	ZAE 10	1641	S37	57	<i>Bidens pilosa</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	-	-	-	-	-	-	-	MTIII-68	7	3	2	10	4	6	2	2	23	9	3	5	6	3	3	13	
RUN3369	MAD411	ZAE 11	1338	S38	-	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-62	7	3	2	10	4	6	2	2	27	9	3	5	6	3	3	13
RUN3381	MAD424	ZAE 11	1338	S38	57	<i>Solanum lycopersicum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-70	7	3	2	10	4	6	2	2	22	9	3	5	6	3	3	13
RUN3383	MAD426	ZAE 11	1338	S38	57	<i>Solanum nigrum</i>	2013	CC MTIII-1	CLIII-10	STIII-35	25	22	13	11	6	64	73	MTIII-61	7	3	2	11	4	6	2	2	27	9	3					

ANNEXE 1 (suite) – Caractéristiques des souches utilisées dans cette étude.

F. Collection de souches de référence phylotype IV (n = 9).

Phylotype IV : Souches de REFERENCE						
RUNID	Souche ID	Pays	Hôte	Year	Sequevar	Génotypepage
RUN0014	ACH732	Australia	<i>Solanum lycopersicum</i>	1978	11	egl
RUN0062	R229	Indonesia	<i>Banana</i>	1988	10	egl
RUN0070	MAFF30155	Japan	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	8	egl
RUN0083	PSI07	Indonesia	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	10	egl
RUN0088	R24	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	-	9B	egl
RUN0089	R28	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	-	9	egl
RUN0703	CFBP6728	Indonesia	<i>Solanum tuberosum</i>	1992	10	egl
RUN1360	R001	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	1990	9A	egl
RUN1361	UW522	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	1985	11	egl

ANNEXE 2 – Description des loci TR, amorces, combinaisons multiplexes, et conditions PCR utilisés dans cette étude.

Official nomenclature ^a	Locus genomic position (strain) ^b	Location (coding sequence) ^b	Tandem repeat sequence ^b	Oligonucleotide primer (5' to 3')	Dye Labeled ^c	Multiplex primer mix	Primer concentration (nM)	Note and Reference
RS3-MLVA16								
<u>Chromosome</u>								
RS3L27_ch622_8bp_240bp_10u	622140-622218 (CMR15)	intergenic	CGGCTCAG	F: GATCCGGCCCTCATCAAGCG R: CACCCGTGAGCTGATCGACC	VIC	mix1	2	this study
RS3L28_ch1093_11bp_273bp_4u	1093103-1093136 (CMR15)	intergenic	GGCCCCGATTT	F: GGATT CGCCCT AGGT CT GCC R: AT GT CGAT GAT CT CGGGGC	VIC	mix4	2	this study
RS3L29_ch1169_9bp_150bp_3u	1169503-1169531 (CMR15)	CDS (putative hemagglutinin-related autotransporter protein)	CAGCCCGAT	F: CGAAATCCGCAGCCTCGCC R: GCGGACAAACAGGGGCGAAGA	PET	mix3	2	this study
RS3L17_ch1269_6bp_299bp_9u	1269368-1269423 (CMR15)	intergenic	CGCAGC	F: CGCTGCACAT CGCCT CCTGACACTCG R: TGCCGGGAAGTTGCTCGCCCGTT	PET	mix1	2	CMR026 (N'Guessan et al., 2013)
RS3L19_ch2111_9bp_245bp_7u	2111048-2111107 (CMR15)	CDS (protein of unknown function)	TGCTTGAAG	F: GCTCGCTCTCGCCT GTTCCGCC R: ACATCCAGGTCCGCACGCCGC	VIC	mix2	2	CMR2699 (N'Guessan et al., 2013)
RS3L30_ch2610_5bp_115bp_12u	2610379-2610437 (CMR15)	CDS (putative F pilus assembly protein TraF)	GCCGA	F: ATCCGAATCTTTGTCGGAT R: GCGAACGCCACCCACC	6FAM	mix1	4	this study
RS3L31_ch2618_6bp_13bp_6u	2618421-2618454 (CMR15)	intergenic	CTTGAC	F: AGCAAAACAAAGAGCAATACCAAGCC R: TCGTGTTCAGGTGCGTATCCA	6FAM	mix3	2	this study
RS3L32_ch2852_10bp_292bp_3u	2852333-2852362 (CMR15)	intergenic	ACGCACACGC	F: GTTTCAAGAACGACTACAAGCAG R: AGGCTTCGATTCCCTTCTGATG	NED	mix3	4	this study
<u>Megaplasmid</u>								
RS3L33_mp131_6bp_128bp_12u	131842-131911 (CMR15)	intergenic	TGCGGA	F: GTGCCTGCCGATCTCAACG R: GGTGGGCCGTGTGACCATTTG	6FAM	mix2	4	this study
RS3L34_mp233_6bp_276bp_9u	233468-233517 (CMR15)	CDS (putative secreted protein popf1)	GCCGGA	F: CGTTCCAGGTACGTGCGCTG R: CGGGTTCCGCTGTCTTCCA	NED	mix2	2	this study
RS1L05_mp444_18bp_194bp_3u	444568-444620 (CMR15)	CDS (Conserved exported protein of unknown function; putative lipoprotein)	GCGTACCCGATTCTGCGG	F: GCGCGGCATCGTGTGTGGGATT R: GCTGGGGGGTCGGTTCGAGCGT	NED	mix4	2	ch127 (N'Guessan et al., 2013)
RS3L35_mp741_9bp_275bp_5u	741526-741568 (CMR15)	CDS (flgD)	CACGACCAG	F: GT CGCGCTCGTACCAAGGCC R: AGCTGCGAGTTGTCCATCGGG	VIC	mix3	4	this study
RS3L36_mp922_12bp_355bp_6u	922063-922134 (CMR15)	CDS (conserved membrane protein of unknown function, putative DnaJ-class chaperone)	CAGCAGGACGAG	F: CGTGGGGGGTGTGAACATC R: CGTGGGGAGTAGTCGGCGA	PET	mix4	4	this study
RS1L10_mp1076_9bp_375bp_4u	1076440-1076464 (CMR15)	CDS (atpH:ATP synthase, F1 sector, delta subunit)	GGCGATGAG	F: CGGCGGTTGAGACCGGGGAGAGGG R: GCTGCGCCAGGGCTACGAGGCG	6FAM	mix4	2	ch827 (N'Guessan et al., 2013)
RS3L37_mp1438_6bp_211bp_15u	1438487-1438533 (CMR15)	intergenic	CTGGCA	F: CTCAACGGGCCACGAAACC R: ATTGTTCAGGGGTGCGATGC	NED	mix1	4	this study
RS1L12_mp1774_6bp_196bp_12u	1774159-1774225 (CMR15)	intergenic	GCGGCT	F: GGACCGGGGACGCATGGAAACGAACGA R: ATGGGGGACCCGCTTCCAAGCTACTGC	PET	mix2	2	ch1459 (N'Guessan et al., 2013)

ANNEXE 2 (suite) – Description des loci TR, amores, combinaisons multiplexes, et conditions PCR utilisés dans cette étude.

RS2-MLVA9								
<u>Chromosome</u>								
RS2BL25_ch5321_11bp_218bp_5u	5321171--5321226 (Molk2)	intergene	GGCCGGCTGAG	F: CGGTGCGGAT GT GT TGGT GGACGGCT R: CCT GAT CCT GGT CGAGGGGGCGAT G	VIC	mix5	2	(N'Guessan et al. 2013)
L539_ch424_15bp_561bp_5u	424668-424742 (UW551)	CDS (Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B)	TTGCTGCCCTGCGCA	F: GCGCAACGCCCATATCAT T CGC R: CGAGGCCACAGCCGAT GCT GAT G	PET	mix6	2	(Parkinson et al. 2013)
RS2BL22_ch4134_6bp_282bp_7u	4134101-4134138 (IPO1609)	CDS (Luminibactin biosynthesis. Probable bifunctional enzyme salicyl-AMP ligase and salicylate synthetase)	GTAGCC	F: TGCGCGAGGCGAGACCCAGCG R: GCCT T CGT GCGGT GGCAAGCCG	NED	mix6	2	(N'Guessan et al. 2013)
L540_ch1275_8bp_550bp_13u	1275591- 1275689(UW551)	intergene	GGTGAGTC	F: GTT GT CCAT GGCAGT CCT GGT GAGAT C R: ACCAT CGACCT GGAGCAGCAGTC	NED	mix5	2	(Parkinson et al. 2013)
RS2BL21_ch100_7bp_193bp_11u	100720-100796 (IPO1609)	intergene	GTAGCC	F: CGGCAT GGAGGGT CGGGCT T GAGGT G R: GGCACCT GGCCGGAAGAGAGAGAGCGT	NED	mix7	2	(N'Guessan et al. 2013)
RS2AL01_ch386_9bp_305bp_7u	386992-387049 (CFBP2957)	CDS (conserved exported protein of unknown function)	GGCCGCATT	F: CGGGGT GCCACT GGGGCACGT AGA R: CCGCTT GACCCCAT CCCCCT T CCT G	PET	mix5	2	(N'Guessan et al. 2013)
RS2BL24_ch1936_6bp_374bp_10u	1936756-1936813 (Molk2)	CDS (putative peptidase, M50 family)	AACATG	F: CGGGCGAAGGCT CGCAGGCCA R: GGCGGACGATACAT GCCACCGCT CAC	FAM	mix5	2	(N'Guessan et al. 2013)
L563_ch3300_7bp_408bp_8u	3300703-3300759 (UW551)	intergene	CCTCTAG	ACGTT CGCGT AGGC GT GGACAAAG R: TACACGGCGCGAT GT GCT GAC	VIC	mix7	2	(Parkinson et al. 2013)
L504_ch3773_7bp_502bp_9u	3773859-3773920 (UW551)	CDS (putative 6-phosphofructokinase - fragment)	CAAGTGG	F: GGCGGACCAAGGCT CCACAAAG R: CGGACGGTT T GAT GGT CAT CAACAT GA	FAM	mix7	2	(Parkinson et al. 2013)

^a La nomenclature des loci TR est le suivant : nom du marqueur_replicon (*ch* : *chromosome*, *mp*: *megaplasmide*)_position physique sur le réplicon exprimée en kilobases_taille du motif (bp)_taille de l'amplicon (bp)_nombre de copies (unité) (exemple : RS1L12_1774_6bp_196bp_12u) (Le Fleche *et al.* 2002 ; Nguessan *et al.* 2013).

^b Localisation dans le génome de la souche CMR15 pour les loci TR RS3-MLVA16 ; les loci TR RS2-MLVA9 sont localisés le génome de chaque souche d'origine (Molk2 / UW551 / IPO1609 / CFBP2957).

^c Les amores sens sont marqués par un fluorophore (NED / PET / VIC / 6-FAM) en position 5'.

ANNEXE 3 – Description des sept loci MLSA/MLST, amorces et conditions PCR utilisés dans cette étude.

Rank ^a	Gene alias	Reference gene name	Gene size ^b (bp)	Locus genomic position ^b	Oligonucleotide primer (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	Product size ^b (bp)	Size of sequence analyzed ^b (bp)	Start sequence	End sequence	Reference
Chromosome: housekeeping genes											
1	<i>gdhA</i>	glutamate dehydrogenase, NADP-specific, oxidoreductase protein	1302	403357-403995	F: GAGAAATCCTGCACCCACTCGAA. R: GCGGGACGTGAACACCAAC	55	639	603	CGAAAT or CGAACT	GCGCGT	(Wicker et al., 2007)
2	<i>gyrB</i>	DNA gyrase, subunit B (type II topoisomerase)	2529	922967-923426	F: ATCCACGTCACCATCCACAC R: GGATGCGCTTGGAGAGGAT	68	460	393	ATTCGG or ATCCCG	CTCTCC	this study
3	<i>rplB</i>	50S ribosomal subunit protein L2	831	1336662-1337427	F: CCGCTCGATGGTGAAGGTCGT R: CATGCTGGTCGTGCGCTTGTG	62	766	654	GTCAAT or GTCAAC	GGTGAA	(Wicker et al., 2007)
4	<i>leuS</i>	Leucyl-tRNA synthetase (Leucine--tRNA ligase)	2652	1628678-1629470	F: GGTGAAACAGCAGGCGCAGCAA R: GGCGCAGAAGGTACGCCCA	68	793	723	GATGCC or GCAGCC	ACGCGT or ACGCGC	(Wicker et al., 2007)
5	<i>adk</i>	Adenylate kinase (ATP-AMP transphosphorylase)	669	1816118-1816662	F: CCCAGCCGGAGTAGTAGTCC R: TCTGTTGGCGCACCCGGC	62	545	468	GGACAG	CGTACC	(Castillo & Greenberg, 2007)
6	<i>mutS</i>	methyl-directed DNA mismatch repair protein	2649	3267373-3268130	F: GCTGATCACCGGGCCGAACAT R: ACAGGCCTTGAGCCGGTACA	67	758	681	GGGGTC or CGGGTC	ACCGCC	(Prior & Fegan, 2005)
Megaplasmid: virulence-associated genes											
7	<i>egl</i>	Endoglucanase precursor (Endo-1,4-beta-glucanase) (Cellulase)	1317	500466-501308	F: ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC R: GCGTTGCCGGCACGAACACC	70	844	702/708	GGCGAT or CGCGAT	CAGTGG	(Fegan & Prior, 2005)

^a Ordre selon la position physique de chaque portion de gène dans le génome de la souche CMR15 (phylotype III).

Numéro d'accession : chromosome (FP885895) et mégaplasmide (FP885896).

^b déterminé sur le génome de la souche CMR15.

F: amorce sens ; R: Amorce antisens

ANNEXE 4 – Liste préliminaire des numéros d'accessions GenBank des séquences partielles de gènes MLSA/MLST. Les numéros en gras constituent les nouvelles séquences générées dans cette étude.

RUN ID	Strain ID	gyrB	rplB	leuS	adk	mutS	gdhA	egl
RUN0039	CFBP3059	JF702514	JF702124	JF702607	JF702217	AY756766	JF702421	KU255917
RUN0046	CIP358	KU255962	KU256166	KU256115	KU256063	KU255860	KU256064	KU255918
RUN0053	CFBP7022	KU255963	KU256167	KU256116	KU256062	KU255861	KU256065	EF439758
RUN0056	J25	JF702523	JF702133	JF702616	JF702226	AY756810	JF702430	KU255919
RUN0060	JT525	JF702524	JF702134	JF702617	JF702227	KU255862	JF702431	KU255920
RUN0061	JT528	KU255964	KU256168	KU256117	KU256061	KU255863	KU256066	KU255921
RUN0075	NCPPB0332	JF702530	JF702140	JF702623	JF702233	KU255864	JF702437	KU255922
RUN0076	NCPPB0342	JF702531	JF702141	JF702624	JF702234	AY756815	JF702438	KU255923
RUN0098	K179	JF702537	JF702147	JF702630	JF702240	AY756763	JF702444	KU255924
RUN0133	CMR15	JF702588	JF702198	JF702681	JF702291	JF702729	JF702495	KU255925
RUN0137	CMR20	KU255965	KU256169	KU256118	KU256060	KU255865	KU256067	GU295006
RUN0143	CFBP7028	KU255966	KU256170	KU256119	KU256059	KU255866	KU256068	EF439748
RUN0145	CFBP6942	JF702538	JF702148	JF702631	JF702241	EF439773	JF702445	EF439749
RUN0146	CMR33	KU255967	KU256171	KU256120	KU256058	KU255867	KU256069	GU295007
RUN0149	CFBP7031	KU255968	KU256172	KU256121	KU256057	KU255868	KU256070	EF439752
RUN0151	CFBP7033	KU255969	KU256173	KU256122	KU256056	KU255869	KU256071	EF439753
RUN0164	CFBP7036	KU255970	KU256174	KU256123	KU256055	KU255870	KU256072	EF439759
RUN0165	CFBP7037	KU255971	KU256175	KU256124	KU256054	KU255871	KU256073	EF439763
RUN0166	CFBP7038	JF702546	JF702156	JF702639	JF702249	EF439783	JF702453	EF439729
RUN0171	CFBP7040	KU255972	KU256176	KU256125	KU256053	KU255872	KU256074	EF439762
RUN0172	CFBP7041	KU255973	KU256177	KU256126	KU256052	KU255873	KU256075	EF439763
RUN0173	CMR77	KU255974	KU256178	KU256127	KU256051	KU255874	KU256076	KU255926
RUN0174	CFBP7042	KU255975	KU256179	KU256128	KU256050	KU255875	KU256077	EF439764
RUN0175	CMR79	KU255976	KU256180	KU256129	KU256049	KU255876	KU256078	KU255927
RUN0232	CFBP7060	KU255977	KU256181	KU256130	KU256048	KU255877	KU256079	EF439755
RUN0233	CFBP7061	KU255978	KU256182	KU256131	KU256047	KU255878	KU256080	EF439756
RUN0234	CFBP7062	KU255979	KU256183	KU256132	KU256046	KU255879	KU256081	EF439757
RUN0235	CMR53	KU255980	KU256184	KU256133	KU256045	KU255880	KU256082	KU255928
RUN0332	MAD029	JF702558	JF702168	JF702651	JF702261	KU255881	JF702465	GU295041
RUN0361	DGBBC1139	KU255981	KU256185	KU256134	KU256044	KU255882	KU256083	KU255929
RUN0362	DGBBC1138	JF702562	JF702172	JF702655	JF702265	KU255883	JF702469	GU295009
RUN0364	DGBBC1227	JF702563	JF702173	JF702656	JF702266	KU255884	JF702470	GU295011
RUN0365	DGBBC1136	KU255982	KU256186	KU256135	KU256043	KU255885	KU256084	KU255930
RUN0366	DGBBC1222	KU255983	KU256187	KU256136	KU256042	KU255886	KU256085	KU255931
RUN0367	DGBBC1223	KU255984	KU256188	KU256137	KU256041	KU255887	KU256086	KU255932
RUN0368	DGBBC1259	KU255985	KU256189	KU256138	KU256040	KU255888	KU256087	KU255933
RUN0369	DGBBC1125	JF702564	JF702174	JF702657	JF702267	KU255889	JF702471	GU295008
RUN0477	CFBP734	KU255986	KU256190	KU256139	KU256039	KU255890	KU256088	KU255934
RUN0478	NCPPB0283	KU255987	KU256191	KU256140	KU256038	KU255891	KU256089	KU255935
RUN0479	NCPPB1018	JF702570	JF702180	JF702663	JF702273	AY756772	JF702477	KU255936
RUN0480	NCPPB0505	KU255988	KU256192	KU256141	KU256037	KU255892	KU256090	KU255937
RUN0657	CFBP2146	KU255989	KU256193	KU256142	KU256036	KU255893	KU256091	KU255938
RUN0842	CFBP4809	KU255990	KU256194	KU256143	KU256035	KU255894	KU256092	KU255939
RUN1238	CFBP4963	KU255991	KU256195	KU256144	KU256034	KU255895	KU256093	KU255940
RUN1298	JS949	KU255992	KU256196	KU256145	KU256033	KU255896	KU256094	KU255941
RUN1793	CIV56	KU255993	KU256197	KU256146	KU256032	KU255897	KU256095	KU255942
RUN1794	CIV57	KU255994	KU256198	KU256147	KU256031	KU255898	KU256096	KU255943
RUN1796	CIV59	KU255995	KU256199	KU256148	KU256030	KU255899	KU256097	KU255944
RUN3592	TM-T1-CM01A	KU255996	KU256200	KU256149	KU256029	KU255900	KU256098	KU255945
RUN3593	TM-T1-CM01B	KU255997	KU256201	KU256150	KU256028	KU255901	KU256099	KU255946
RUN3594	TM-T1-CM02A	KU255998	KU256202	KU256151	KU256027	KU255902	KU256100	KU255947
RUN3595	TM-T1-CM02B	KU255999	KU256203	KU256152	KU256026	KU255903	KU256101	KU255948
RUN3596	TM-T1-CM06A	KU256000	KU256204	KU256153	KU256025	KU255904	KU256102	KU255949
RUN3597	TM-T1-CM06B	KU256001	KU256205	KU256154	KU256024	KU255905	KU256103	KU255950
RUN3598	TM-T1-CM11A	KU256002	KU256206	KU256155	KU256023	KU255906	KU256104	KU255951
RUN3599	TM-T1-CM11B	KU256003	KU256207	KU256156	KU256022	KU255907	KU256105	KU255952
RUN3600	TM-T1-CM20	KU256004	KU256208	KU256157	KU256021	KU255908	KU256106	KU255953
RUN3601	TM-T1-CM21	KU256005	KU256209	KU256158	KU256020	KU255909	KU256107	KU255954
RUN3602	TM-T2-CM06	KU256006	KU256210	KU256159	KU256019	KU255910	KU256108	KU255955
RUN3603	TM-T2-CM07A	KU256007	KU256211	KU256160	KU256018	KU255911	KU256109	KU255956
RUN3604	TM-T2-CM07B	KU256008	KU256212	KU256161	KU256017	KU255912	KU256110	KU255957
RUN3605	TM-T2-CM16	KU256009	KU256213	KU256162	KU256016	KU255913	KU256111	KU255958
RUN3606	TM-T2-CM17	KU256010	KU256214	KU256163	KU256015	KU255914	KU256112	KU255959
RUN3607	TM-T2-CM18A	KU256011	KU256215	KU256164	KU256014	KU255915	KU256113	KU255960
RUN3608	TM-T2-CM18B	KU256012	KU256216	KU256165	KU256013	KU255916	KU256114	KU255961

ANNEXE 5 – Modèle de la fiche d'enquête épidémiologique

FICHE D'INFORMATION		N°	
Date :	1. Site de prélèvement		
	Type : <input type="checkbox"/> Tanety <input type="checkbox"/> parcelle irriguée <input type="checkbox"/> rizière <input type="checkbox"/> baiboho		
Nom du collecteur :	Village :		
<input type="checkbox"/> Phil. <input type="checkbox"/> Isa. <input type="checkbox"/> Gil. <input type="checkbox"/> Sasa.	Fokontany :		
Nom du paysan :	Commune :		
	District :		
	Coordonnées GPS : E	S	T°
2. Hôte	3. Etat sanitaire		
<input type="checkbox"/> pomme de terre nom variété :	Surface parcelle :		
	Incidence :	%	! Nb de plants infectés:
	Sévérité :		
	Distribution :	<input type="checkbox"/> ponctuel <input type="checkbox"/> dispersé <input type="checkbox"/> très répandu	
Stade de végétation :	Matériel prélevé :	4. Historique de la parcelle	
<input type="checkbox"/> Elongation <input type="checkbox"/> Floraison <input type="checkbox"/> Maturisation <input type="checkbox"/> Récolte		<input type="checkbox"/> Tige <input type="checkbox"/> Tuberclue	
<input type="checkbox"/> autre hôte :	Matériel prélevé :	Précédent cultural : Antécédent % au BW : Ampleur de la maladie 2013 :	
5. Données sur la parcelle			
Culture sur parcelles voisines :		Ampleur % années précédentes :	
E :			
W:		6. Semences	
S :		Origine : <input type="checkbox"/> marché <input type="checkbox"/> FIFAMANOR <input type="checkbox"/> own <input type="checkbox"/> CMS <input type="checkbox"/> FERT <input type="checkbox"/> autre :	
O :		Nom variétés cultivées (diversité) et résistance respective au BW : 1. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T 4. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T 2. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T 5. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T 3. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T 6. <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> T	
Adventices présentes :		7. Pratique culturelle	
1. 2. 3. 4.		Semence : <input type="checkbox"/> entier <input type="checkbox"/> tranchée Technique : <input type="checkbox"/> poquet <input type="checkbox"/> billon	
Type de sol :		Fertilisation (date) : <input type="checkbox"/> fumier <input type="checkbox"/> compost <input type="checkbox"/> NPK <input type="checkbox"/> Dolomie	
Fertilité du sol : <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> MO moyen <input type="checkbox"/> MO		<input type="checkbox"/> Buttage <input type="checkbox"/> sarclage <input type="checkbox"/> Défanage traitements chimiques: <input type="checkbox"/> dithane <input type="checkbox"/> Autres	
Alimentation en eau :		<input type="checkbox"/> irrigation <input type="checkbox"/> pluie <input type="checkbox"/> eau de capillarité <input type="checkbox"/> monoculture <input type="checkbox"/> rotation	
8. ITINERAIRE CULTURAL (cycles sur 5 ans)			
1:	12:	13:	14:
6:	17:	18:	19:
9. INFO SUPPLEMENTAIRES			
• Depuis quand le BW a été observée dans la parcelle/village? (moment exact d'apparition de la maladie) • A quel moment (stade de végétation, conditions climatiques, saison, pratique culturelle/agronomique) le flétrissement bactérien commence-t-il à être visible, est-il le plus important? • Pratiques culturelles pour contrôler le BW? Efficacité de contrôle? • Si rotation, est-ce que le BW réapparaît? • Après une rotation, reprenez-vous la même variété de pomme de terre? • Effets de la maladie (% de pertes) / évaluation des impacts socioéconomiques • Effets du BW sur les cultures qui suivent dans le cadre des rotations? • Dynamique spatiale et temporelle du BW, appreciation des paysans par rapport au temps, espace (évolution) • Autres maladies dans la parcelle? (mildiou? Synergie?) + Données météorologiques (10 dernières années) : Pluviométrie, nombre de jour pluvieux, températures (min, mean, max)			



**Biologie des populations du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*
appliquée à l'épidémiologie du flétrissement bactérien de la pomme de terre à Madagascar.**

Nous avons exploré la diversité génétique du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ceRs) pour caractériser et comprendre les graves épidémies de flétrissement bactérien qui sévissent à Madagascar. Une large collection de souches ($n = 1224$; 75 sites) est constituée. Les souches sont assignées aux phylotypes I, III, et la grande majorité associée à l'épidémie appartient au groupe IIB-1 ('Brown rot' des anglo-saxons) signalé pour la première fois à Madagascar. L'approche MLVA (RS2-MLVA9) a révélé leur apparenté aux souches IIB-1 distribuées mondialement, suggérant ainsi une introduction malheureuse à Madagascar. Trois populations clonales se propagent par des tubercules infectées. Cette étude a également permis de définir pour la première fois la structure des populations des souches du phylotype III. Le génotypage des souches malgaches du phylotype III, avec le schéma hautement résolutif RS3-MLVA16 que nous avons développé, a révélé une forte diversité génétique structurée géographiquement en onze populations clonales bien différenciées. Cette structure reflète un caractère endémique des populations suggérant l'absence de transmission par tubercules. Les souches malgaches sont différentes de celles d'Afrique continentale. Les souches IIB-1 et III présentent deux modèles épidémiologiques différents. Les variétés de pomme de terre cultivées à Madagascar n'ont montré aucune résistance génétique vis-à-vis du panel de souches malgaches. Cependant, dans nos conditions expérimentales les accessions du CIP 720118 et 800934 sont résistantes aux souches I-31 non détectées pour l'instant à Madagascar, mais prévalentes dans l'Océan Indien. Nous disposons ainsi d'un outil robuste pouvant être appliqué à l'étude du phylotype III, d'une vue globale de la structure des populations et d'épidémiologie du ceRs.

**Population biology of the species complex *Ralstonia solanacearum*
to unravel major traits in potato bacterial wilt epidemiology in the highlands of Madagascar.**

This thesis is exploring genetic diversity, population structure and molecular epidemiology of the *Ralstonia solanacearum* species complex (Rssc) causing potato bacterial wilt outbreaks in Madagascar. We characterized a large collection of strains ($n = 1224$; 75 sites) collected from potato production areas. Surprisingly, the large outbreaks were associated with IIB-1 strains (Brown rot) while a few were associated with phylotypes I and III. This is the first report of phylotype IIB-1 in Madagascar. The IIB-1 strains were genotyped based on MLVA (RS2-MLVA9). And Malagasy phylotype IIB-1 clustered with worldwide distributed strains. Fine scale genetic investigation suggested three clonal populations that were introduced and spread through latently infected tuber-seeds. This survey also allowed the first study about the population structure of phylotype III strains. Malagasy phylotype III strains were genotyped with the highly discriminatory RS3-MLVA16 scheme we developed. Genetic population analyses revealed a high genetic diversity within phylotype III strains that geographically structured into eleven clonal populations. This supports the endemic character of the phylotype III population in Madagascar and suggests no transmission with potato tubers. Malagasy strains were distinct from continental African strains. A clear-cut epidemiological profile is shown between IIB-1 and III strains. Genetically, no bacterial wilt resistance properties were shown for the most popular Malagasy potato cultivars, except two cultivars: 720118 and 800934 that showed strong resistance to phylotype I-31 strain that are predominantly distributed in the Indian Ocean. This study offered tool to genotype phylotype III strains and gives an insights into population structure and epidemiology of the Rssc.