

## Abréviations

**ADNr** : acide désoxyribonucléique ribosomique.

**AFLP** : polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism).

**ARNt** : acide ribonucléique de transfert.

**BDB** : Blood Disease Bacterium.

**CIRAD** : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

**CNRS** : Centre National de la Recherche Scientifique.

**cv.** : cultivar.

**DGGE** : électrophorèse en gel à gradient de dénaturation (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

**DO** : Densité Optique.

**egl** : gène codant pour une endoglucanase.

**EPS** : exopolysaccharide.

**HMA** : test de mobilité des hétéroduplex d'ADN (Heteroduplex Mobility Assay).

**HR** : réaction d'hypersensibilité (Hypersensitive Response).

**hrp** : gènes codant pour des fonctions liées au pouvoir pathogène et la réaction d'hypersensibilité (hypersensitive response and pathogenicity).

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique.

**IS** : élément insertionnel (Insertion Sequence).

**kpb** : kilo paires de base.

**LMPCR** : PCR avec ligation (Ligation-Mediated-PCR).

**MPN** : nombre le plus probable (Most Probable Number).

**ORF** : cadre ouvert de lecture (Open Reading Frame).

**P<sub>32</sub>** : protéine 32 du phage T4.

**pb** : paires de bases.

**PCR** : réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction).

**pgl** : gène codant pour une polygalacturonase.

**pv.** : pathovar.

**PVP** : polyvinylpyrrolidone.

**PVPP** : polyvinylpolypyrrolidone.

**RAPD** : polymorphisme de l'ADN par amplification aléatoire (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

**RC-PFGE** : digestion de l'ADN à l'aide d'endonucléase à site de coupe rare et séparation de fragments par électrophorèse sur gel en champ pulsé (Rare Cutting-Pulsed Field Gel Electrophoresis).

**REP** : élément palindromique extragénique répété (Repetitive Extragenic Palindromic element).

**RFLP** : polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism).

**SCAR** : caractérisation de produit d'amplification (Sequence-Characterized-Amplified Region).

**TGGE** : électrophorèse en gel à gradient de température (Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

**ufc** : unité formant colonie.

# Sommaire

Introduction générale	1
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>2</b>
<b>I.1. Le flétrissement bactérien causé par <i>Ralstonia solanacearum</i></b>	<b>2</b>
I.1.1 Le flétrissement bactérien	2
I.1.2. <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
I.1.3. Les méthodes de lutte	11
<b>I.2. Analyse de la diversité génétique des bactéries phytopathogènes</b>	<b>14</b>
I.2.1. Méthodes d'analyse fréquemment utilisées	15
I.2.2. Autres techniques	19
I.2.3. Application des méthodes d'analyse de diversité génétique	19
<b>I.3. L'identification et la détection des bactéries phytopathogènes</b>	<b>20</b>
I.3.1. L'échantillonnage	21
I.3.2. La préparation de l'échantillon	21
I.3.3. L'extraction des bactéries	22
I.3.4. Les méthodes traditionnelles de détection	22
I.3.5. Autres méthodes	24
I.3.6. Les méthodes sérologiques	25
I.3.7. Les méthodes basées sur les propriétés des acides nucléiques	28
<b>II. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS</b>	<b>32</b>
<b>II.1. Le flétrissement bactérien à la Réunion : problématique</b>	<b>32</b>
II.1.1. Le contexte réunionnais	32
II.1.2. Le flétrissement bactérien	33
<b>II.2. Objectifs</b>	<b>35</b>
<b>III. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i></b>	<b>37</b>
<b>III.1. Analyse de la diversité génétique de <i>R. solanacearum</i> à partir d'une collection mondiale</b>	<b>37</b>
III.1.1. Analyse de la diversité existant chez <i>R. solanacearum</i> par RFLP des fragments amplifiés de la région des gènes <i>hrp</i>	37
III.1.2. Identification d'une nouvelle subdivision d'origine africaine au sein de l'espèce <i>R. solanacearum</i>	39
III.1.3. Confirmation d'une subdivision africaine au sein de l'espèce <i>R. solanacearum</i>	40
III.1.4. Discussion générale	41
<b>III.2. Analyse de la structure d'une population naturelle chez <i>R. solanacearum</i></b>	<b>46</b>
III.2.1. Matériels et Méthodes	47
III.2.2. Résultats	48
III.2.3. Discussion	49

<b>IV. DETECTION MOLECULAIRE DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i></b>	<b>53</b>
<b>IV.1. Validation des résultats obtenus par Seal et ses collaborateurs</b>	<b>53</b>
IV.1.1. Matériels et méthodes	53
IV.1.2. Résultats	55
IV.1.3. Discussion	56
<b>IV.2. Recherche d'amorces PCR spécifiques de <i>R. solanacearum</i> au sein des gènes <i>hrp</i></b>	<b>58</b>
IV.2.1. Matériels et méthodes	58
IV.2.2. Résultats et discussion	59
<b>IV.3. Mise au point d'un outil d'identification et de détection spécifique des biovars de <i>R. solanacearum</i> et application au niveau des plantes</b>	<b>63</b>
IV.3.1. Détection moléculaire des biovars de <i>R. solanacearum</i>	63
IV.3.2. Validation de la méthode N-PCR pour la détection de <i>R. solanacearum</i> dans la plante	64
<b>IV.4. Détection moléculaire de <i>R. solanacearum</i> dans l'eau</b>	<b>68</b>
IV.4.1. Matériels et méthodes	68
IV.4.2. Résultats	69
IV.4.3. Discussion	70
<b>IV.5. Détection moléculaire de <i>R. solanacearum</i> dans les semences</b>	<b>72</b>
IV.5.1. Matériel et méthodes	72
IV.5.2. Résultats	73
IV.5.3. Discussion	74
<b>IV.6. Détection moléculaire de <i>R. solanacearum</i> dans le sol</b>	<b>76</b>
IV.6.1. Matériels et méthodes	76
IV.6.2. Résultats	79
IV.6.3. Discussion	84
<b>IV.7. Discussion générale</b>	<b>89</b>
<b>V. BIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i></b>	<b>92</b>
<b>V.1. Rôle de l'eau dans la survie et la dissémination de <i>R. solanacearum</i></b>	<b>92</b>
V.1.1. Matériels et méthodes	92
V.1.2. Résultats	98
V.1.3. Discussion	100
<b>V.2. La semence : une source potentielle d'inoculum ?</b>	<b>104</b>
V.2.1. Matériels et méthodes	105
V.2.2. Résultats	109
V.2.3. Discussion	114
<b>V.3. Influence du type de sol sur la survie de <i>R. solanacearum</i> et sur le développement du flétrissement bactérien</b>	<b>118</b>
V.3.1. Matériels et méthodes	118
V.3.2. Résultats	120
V.3.3. Discussion	123
<b>VI. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>127</b>
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>131</b>
<b>ANNEXES</b>	

## Liste des documents inclus

- 1. 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. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2184-2194.
- 2. Poussier, S. & Luisetti, J. (2000).** Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP. *Eur J Plant Pathol* **106**, 255-265.
- 3. Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. & Trigalet, A. (2000).** 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.
- 4. Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C. & Fegan, M. (2000).** Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. Accepté pour publication dans la revue « Systematic and Applied Microbiology ».

## Liste des planches

- Planche 1.** Symptômes de flétrissement bactérien sur tomate et tabac.
- Planche 2.** Symptômes de flétrissement bactérien sur pomme de terre (tubercule en coupe transversale) et sur bananier (banane en coupe transversale).
- Planche 3.** Colonies de *Ralstonia solanacearum* isolées sur milieu de Kelman (1954).
- Planche 4.** Vue du dispositif expérimental en chambre climatique.
- Planche 5.** Symptômes sur fruits de tomate dus à *Ralstonia solanacearum*.
- Planche 6.** Développement de jeunes plantules de tomate issues de graines contaminées par des concentrations croissantes de la souche A ou C de *Ralstonia solanacearum*.

## Liste des tableaux

Le chiffre romain associé au numéro de tableau correspond au numéro de chapitre du manuscrit.

- Tableau I-1.** Modes de dissémination de *R. solanacearum* répertoriés (d'après Kelman *et al.*, 1994).
- Tableau I-2.** Principaux critères d'identification de l'espèce *R. solanacearum* (d'après Hayward, 1994b).
- Tableau I-3.** Caractéristiques différentielles des biovars de *R. solanacearum* (d'après Hayward, 1964 et He *et al.*, 1983).
- Tableau I-4.** Différenciation du biovar 2 de *R. solanacearum* en sous-phénotypes (d'après Hayward, 1994b).
- Tableau I-5.** Tableau synthétique de la classification subsppécifique de *R. solanacearum* (d'après Gillings et Fahy, 1993a).
- Tableau I-6.** Caractères d'orientation des grands groupes de bactéries phytopathogènes (d'après Gardan et Luisetti, 1982).
- Tableau I-7.** Caractères différentiels de quelques espèces de *Pseudomonas* fluorescents (d'après Schaad, 1988).
- Tableau I-8.** Caractères distinctifs de quelques pathovars de l'espèce *Pseudomonas syringae* (d'après Gardan et Luisetti, 1982).
- Tableau II-1.** Liste des plantes hôtes de *R. solanacearum* à la Réunion (d'après Nicole, 1995).
- Tableau IV-1.** Séquences des amorces développées par Seal et ses collaborateurs et utilisées dans notre étude (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).
- Tableau IV-2.** Conditions d'amplification utilisées pour les amorces développées par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).
- Tableau IV-3.** Programmes d'amplification utilisés pour les amorces développées par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).
- Tableau IV-4.** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.
- Tableau IV-5.** Conditions optimales obtenues pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.
- Tableau IV-6.** Programmes optimisés pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.
- Tableau IV-7.** Comparaison entre l'estimation des populations de *R. solanacearum* dans les échantillons de plante (comptage sur milieu semi-sélectif) et la détection par N-PCR (utilisation de PVPP et de BSA).
- Tableau IV-8.** Comparaison du traitement combiné PVPP et BSA à deux protocoles d'extraction et de purification d'ADN (kit QIAamp et séquence-capture) pour la détection par N-PCR de *R. solanacearum* dans les échantillons de plantes.
- Tableau IV-9.** Influence de la nature de l'eau, de la souche et de sa concentration sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* (souches A et C) par N-PCR.
- Tableau IV-10.** Influence de la méthode de concentration bactérienne et d'extraction d'ADN sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* (souche A) par N-PCR dans une eau d'irrigation.
- Tableau IV-11.** Influence de la méthode d'extraction de l'ADN sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* par PCR dans les macérats et broyats de graines de tomate.
- Tableau IV-12.** Influence du nombre de broyages effectués à l'aide du Waring Blendor sur le niveau des populations bactériennes extraites d'échantillons de terreau ou de sol brun contaminés artificiellement par la souche A dosée à  $10^4$  ou à  $10^6$  ufc/mL.
- Tableau IV-13.** Influence du nombre de broyages effectués à l'aide de l'Ultra-Turrax sur le niveau des populations bactériennes extraites d'échantillons de terreau et de sol brun contaminé artificiellement par la souche A dosée à  $10^4$  ou à  $10^6$  ufc/mL.
- Tableau IV-14.** Influence du volume de tampon Tris et du type de broyeur sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche C dosée à  $10^4$  ufc/mL (premier protocole).

**Tableau IV-15.** Influence du volume de tampon Tris sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par les souches A ou C dosées à  $10^4$  ufc/mL (second protocole).

**Tableau IV-16.** Influence du type de broyeur et d'adjuvant au tampon d'extraction sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche C dosée à  $10^4$  ufc/mL.

**Tableau IV-17.** Influence de centrifugations à basse et à haute vitesse sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche A ou C dosée à  $10^4$  ufc/mL.

**Tableau IV-18.** Influence du temps de centrifugation, utilisé pour séparer les bactéries des particules de sol sur gradient de Nycodenz, sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche A ou C dosée à  $10^4$  ufc/mL.

**Tableau IV-19.** Comparaison de l'efficacité des protocoles d'extraction indirecte d'ADN utilisés pour la détection par PCR de *R. solanacearum*, en fonction du type de sol et de la concentration d'inoculum.

**Tableau V-1.** Evolution du niveau de la population de *R. solanacearum* dans de l'eau maintenue à 20-25 °C, en fonction de la nature de l'eau, de la souche bactérienne et de la concentration initiale de l'inoculum.

**Tableau V-2.** Evolution du niveau de la population de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction de la température, de la souche et de la concentration initiale de l'inoculum.

**Tableau V-3.** Evolution du pourcentage de germination de graines de tomate après irrigation par une eau contaminée par *R. solanacearum*, en fonction de la souche et de la concentration bactérienne.

**Tableau V-4.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès le semis, par de l'eau contaminée par *R. solanacearum*, en fonction de la souche et de la concentration initiale de l'inoculum.

**Tableau V-5.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, au stade jeune plantule, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum*, en fonction de la concentration initiale de l'inoculum.

**Tableau V-6.** Estimation des populations de *R. solanacearum* dans le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.

**Tableau V-7.** Evolution des populations de *R. solanacearum* extraites des eaux percolées à travers le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.

**Tableau V-8.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après arrosage quotidien par les eaux percolées à travers le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.

**Tableau V-9.** Influence de l'eau de javel sur les populations de *R. solanacearum* (souche A) dans l'eau d'irrigation, en fonction de la concentration bactérienne initiale, de la concentration en eau de javel et de la durée de contact.

**Tableau V-10.** Influence de la filtration sur la présence de *R. solanacearum* (souche A) dans l'eau d'irrigation, en fonction de la concentration initiale d'inoculum.

**Tableau V-11.** Influence de la souche de *R. solanacearum*, de la méthode d'inoculation et du stade de développement du fruit sur le pourcentage de tomates (fruits détachés) présentant des symptômes trois semaines après l'inoculation.

**Tableau V-12.** Fréquence d'isolement de *R. solanacearum* de fruits détachés deux semaines après l'inoculation, selon la souche et la méthode d'inoculation.

**Tableau V-13.** Influence de la dose d'inoculum (souche A de *R. solanacearum*) et du site d'inoculation sur la fréquence de tomates présentant des symptômes, trois semaines après l'inoculation (fruits en place).

**Tableau V-14.** Influence de la dose d'inoculum et du site d'inoculation sur la fréquence d'isolement de *R. solanacearum* de fruits inoculés et présentant ou non des symptômes.

**Tableau V-15.** Estimation des populations de *R. solanacearum* dans des graines issues de fruits en place et inoculés.

**Tableau V-16.** Estimation des populations de *R. solanacearum* dans les graines contaminées à  $5.10^7$  ufc/mL, selon la méthode de prétraitement des graines.

**Tableau V-17.** Estimation des populations de *R. solanacearum* dans les graines contaminées à  $5.10^7$  ufc/mL, selon le temps de contact entre suspension et graines.

**Tableau V-18.** Influence de la température d'inoculation sur l'installation de *R. solanacearum* au niveau des graines d'aubergine ou de tomate.

**Tableau V-19.** Influence de la concentration de l'inoculum et de la souche sur l'installation de *R. solanacearum* au niveau des graines d'aubergine ou de tomate.

**Tableau V-20.** Influence de la souche de *R. solanacearum* et de la concentration de la suspension de trempage sur l'installation et la survie de *R. solanacearum* sur les graines d'aubergine.

**Tableau V-21.** Influence de l'espèce bactérienne, de la concentration de la suspension de trempage et du pelliculage sur l'installation et la survie de *R. solanacearum* sur les graines de tomate.

**Tableau V-22.** Influence du site d'inoculation et de la dose d'inoculum sur les pourcentages de germination des graines de tomate et de plantules viables (première expérience).

**Tableau V-23.** Influence de la dose d'inoculum sur les pourcentages de germination et de plantules viables sur milieu gélosé à partir de graines de tomate issues de fruits inoculés (seconde expérience).

**Tableau V-24.** Variation du pourcentage de germination des graines issues de zones sans symptômes et de zones nécrosées de fruits contaminés par *R. solanacearum*.

**Tableau V-25.** Influence de la souche de *R. solanacearum* et de la dose d'inoculum sur la masse de cinq plantules de tomate (exprimée en g) issues de graines contaminées artificiellement.

**Tableau V-26.** Influence de la méthode de prétraitement des graines d'aubergine sur le pourcentage de germination.

**Tableau V-27.** Caractéristiques comparées des grandes classes de sols de l'île de la Réunion.

**Tableau V-28.** Comparaison de l'évolution du niveau des populations de *R. solanacearum* (souches A et C), inoculées à  $10^6$  ufc/mL, pour chaque combinaison sol-souche.

**Tableau V-29.** Evolution dans le temps du niveau des populations de *R. solanacearum* (souches A et C), inoculées à  $10^6$  ufc/mL dans chaque type de sol et comparaison des combinaisons sol-souche à chaque date d'observation.

**Tableau V-30.** Comparaison par un test de Gstat des pourcentages finaux de flétrissement pour chaque combinaison souche-sol-concentration permettant la distinction de groupe.

**Tableau V-31.** Evolution du niveau des populations de la souche A de *R. solanacearum*, dans un sol portant une plante sensible, en fonction de la dose d'inoculum et du type de sol.

**Tableau V-32.** Evolution du niveau des populations de la souche C de *R. solanacearum*, dans un sol portant une plante sensible, en fonction de la dose d'inoculum et du type de sol.

## Liste des figures

Le chiffre romain associé au numéro de figure correspond au numéro de chapitre du manuscrit.

**Figure I-1.** Organisation de la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum* (d'après Marena *et al.*, 1996; Van Gijsegem *et al.*, 1998 et Brito *et al.*, 1999).

**Figure I-2.** Principe de la révélation du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (d'après Tagu, 1999).

**Figure I-3.** Organisation des ADNr (gènes *rrn*) (d'après Schmidt, 1998).

**Figure I-4.** Organisation d'une séquence d'insertion, IS, (A) et d'un transposon (B) (d'après Chandler, 1998).

**Figure I-5.** Principe de la technique AFLP avec la combinaison *MspI-C* / *SacI-C*.

**Figure I-6.** Principe d'obtention et différence entre anticorps monoclonaux et polyclonaux (d'après Malandrin, 1995).

**Figure I-7.** Méthode de détection ELISA à partir d'un macérat de graines, description des variantes DAS et DIB (d'après Blancho, 1994).

**Figure I-8.** Méthode de détection par immunofluorescence à partir d'un macérat de graines, (d'après Blancho, 1994).

**Figure I-9.** Principe de l'hybridation soustractive (d'après Manceau *et al.*, 2000a).

**Figure II-1.** Carte de la végétation naturelle et des activités agricoles de l'île de la Réunion (d'après Raunet, 1991).

**Figure II-2.** Carte pédologique simplifiée de l'île de la Réunion (d'après Riquier-Zebrowsky modifiée par Cadet).

**Figure II-3.** Répartition des trois biovars de *R. solanacearum* à la Réunion.

**Figure III-1.** Répartition des espèces (nom du cultivar entre parenthèses) cultivées au sein de la parcelle expérimentale "le vallon".

**Figure III-2.** Profils électrophorétiques des huit haplotypes (sous-populations A et B) de *R. solanacearum* mis en évidence au sein de la parcelle "le vallon" par la technique AFLP.

**Figure III-3.** Arbre construit par la méthode du Neighbor-Joining illustrant les relations des différents haplotypes des sous-populations A (haplotypes A1, A2, A3 et A4) et B (haplotypes B1, B2, B3 et B4) mises en évidence au sein de la parcelle expérimentale "le vallon".

**Figure III-4.** Répartition des haplotypes (en gras) mis en évidence au sein de la parcelle expérimentale "le vallon".

**Figure IV-1.** Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec les couples d'amorces PS96H-PS96I (A) et OL11-Y2 (B) définis par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a et 1993).

**Figure IV-2.** Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec les couples d'amorces T3A-T5A défini par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992b).

**Figure IV-3.** Localisation des couples d'amorces sélectionnés sur la base de la séquence des gènes *hrp* de la souche GM1000 de *R. solanacearum*.

**Figure IV-4.** Electrophorèse des produits d'amplification obtenus, après application de la méthode de Cobb et Clarkson (1994), avec les amorces RS90-91 (A), RS100-RS11 (B) et RS500-RS51 (C).

**Figure IV-5.** Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec le couple d'amorces : RS30b-RS31b. Influence de la température d'hybridation des amorces à l'ADN sur la spécificité de l'amplification par PCR : 56°C (A), 60°C (B) et 64°C (C).

**Figure IV-6.** Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec les couples d'amorces définis au sein des gènes *hrp* : A, RS20-RS201; B, RS30-RS31; C, RS50-RS501; D, RS600-RS61; E, RS80-RS81; F, RS90-RS91.

**Figure IV-7.** Southern blots d'ADN digéré par *EcoRI* obtenus avec les sondes correspondant aux produits d'amplification purifiés suivant : A, RS20-RS201; B, RS30-RS31; C, RS50-RS501; D, RS600-RS61; E, RS80-RS81.

**Figure IV-8.** Détection par PCR (amorces OL11-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graine de tomate contaminées, selon les différents tampons de macération et additifs aux mélanges PCR utilisés.

**Figure IV-9.** Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graine d'aubergine contaminées, selon les différents tampons de macération et additifs aux mélanges PCR utilisés.

**Figure IV-10.** Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graines de tomate contaminées, par utilisation de microbilles magnétiques (Dynal) ou du kit QIAamp (Qiagen).

**Figure IV-11.** Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, au niveau de graines d'aubergine contaminées à  $10^8$  ufc/mL, selon le protocole d'Audy *et al.* (1996).

**Figure IV-12.** Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans la suspension de lavage de graines d'aubergine contaminées, selon le protocole d'Audy *et al.* (1996).

**Figure IV-13.** Principe de récupération des cellules bactériennes à partir d'un extrait de sol par utilisation de Nycodenz (d'après Bakken et Lindhal, 1995).

**Figure IV-14.** Influence de l'ajout de BSA ou de  $P_{32}$  (500 ng/ $\mu$ L) sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche A), inoculé à  $10^6$  ufc/mL à un échantillon de sol, après extraction des bactéries sur gradient de Nycodenz.

**Figure IV-15.** Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche C), inoculé à un échantillon de sol brun, après extraction d'ADN selon le protocole du kit QIAamp de Qiagen (A), de Porteous *et al.* (1997) (B) et de Kuske *et al.* (1998) (C).

**Figure IV-16.** Influence de différentes concentrations de BSA et de  $P_{32}$  sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche C), inoculé à un échantillon de sol brun, après extraction d'ADN selon le protocole de Porteous *et al.* (1997).

**Figure IV-17.** Influence de la BSA (500 ng/ $\mu$ L) sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche A) selon la concentration d'inoculum et le type de sol après extraction d'ADN à l'aide des microbilles magnétiques (Jacobsen, 1995).

**Figure IV-18.** Méthodes permettant la détection efficace de *R. solanacearum* (souche A ou C) dans le sol.

**Figure IV-19.** Schéma d'une structure construite de sol (adapté de Bruckert, 1979).

**Figure V-1.** Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau osmosée, en fonction du niveau d'inoculum initial (après modélisation).

**Figure V-2.** Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau de ville, en fonction du niveau d'inoculum initial (après modélisation).

**Figure V-3.** Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction du niveau d'inoculum initial, à 20-25 °C (après modélisation).

**Figure V-4.** Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction du niveau d'inoculum initial, à 28 °C (après modélisation).

**Figure V-5.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès le semis, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

**Figure V-6.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès le semis, par de l'eau contaminée par la souche C de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

**Figure V-7.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, au stade jeune plantule, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

**Figure V-8.** Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées à l'andosol à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

**Figure V-9.** Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au sol brun à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

**Figure V-10.** Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au sol ferrallitique à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

**Figure V-11.** Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au vertisol à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

**Figure V-12.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate en fonction du type de sol et de la dose d'inoculum (souche A) (après modélisation).

**Figure V-13.** Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate en fonction du type de sol et de la dose d'inoculum (souche C) (après modélisation).

**INTRODUCTION  
GENERALE**

## Introduction générale

Bien que ne représentant qu'une infime partie du monde bactérien, les bactéries phytopathogènes sont chaque année à l'origine de dégâts importants au niveau des cultures. Parmi elles, *Ralstonia solanacearum*, agent responsable du flétrissement bactérien, fait partie des plus connues et des plus étudiées dans le monde. En effet, depuis la première description de la bactérie sous le nom de *Bacterium solanacearum* par Erwin F. Smith, il y a un peu plus d'un siècle, plus de 4000 articles scientifiques ont été publiés sur cette bactérie (Kelman, 1998). *R. solanacearum* constitue un des principaux modèles retenus pour l'étude génétique et moléculaire du pouvoir pathogène et des interactions plante-microorganisme.

Le flétrissement bactérien, de par sa très large distribution géographique, sa très large gamme d'hôtes et son impact économique, peut être considéré comme la phyto bactériose la plus importante au monde (Kelman, 1998). En effet, cette maladie est présente sur tous les continents mais principalement dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes. Elle atteint au moins 200 espèces végétales dont certaines d'intérêt économique majeur : des cultures vivrières essentielles comme celles de la pomme de terre, la tomate ou l'aubergine et aussi d'importantes cultures d'exportation comme celles de la banane, l'arachide ou le tabac.

Malgré les nombreuses études entreprises depuis longtemps, le flétrissement bactérien demeure une maladie très destructrice et les moyens de lutte restent très insuffisants. L'extrême diversité (pathologique, écologique, biochimique, génétique,...) des isolats de *R. solanacearum* rend en effet le contrôle de cette maladie très difficile. Seule une stratégie de lutte intégrée, combinant différentes méthodes, peut s'avérer efficace mais pour la renforcer un approfondissement des connaissances en terme d'interaction pathogène-plante, de mécanisme de résistance des plantes, de variabilité génétique de l'agent pathogène mais également d'épidémiologie de la maladie est indispensable.

L'objectif du programme de recherche développé par le laboratoire de phytopathologie du CIRAD-Réunion, au sein duquel s'est inscrit mon travail de thèse, est de promouvoir la lutte contre le flétrissement bactérien par la mise en oeuvre de mesures prophylactiques efficaces pouvant venir en appui d'une sélection pertinente au niveau variétal. La première partie du travail présenté dans ce mémoire a donc tout d'abord consisté en la caractérisation au niveau génétique, à l'aide de divers outils moléculaires, des différentes populations de *R. solanacearum* existant de par le monde en portant une attention particulière aux populations africaines (y compris réunionnaises) qui n'avaient jamais, ou très rarement, fait l'objet d'étude auparavant. Nous nous sommes également intéressés à la diversité d'une population de *R. solanacearum* présente naturellement dans une parcelle. La seconde partie du travail effectué a conduit, sur la base de l'analyse génétique, à la mise en point d'un outil de détection spécifique de chaque population réunionnaise du pathogène. Puis nous nous sommes attachés à appliquer cet outil de manière à pouvoir détecter la bactérie dans les divers milieux (sol, plante, eau, semence) dans lesquels elle est susceptible de se conserver. La dernière partie du travail réalisé nous a permis de contribuer à l'amélioration des connaissances des caractéristiques biologiques et épidémiologiques de la bactérie (réservoirs d'inoculum et modes de dissémination).

**I. SYNTHÈSE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## I.1. Le flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum*

### I.1.1. Le flétrissement bactérien

#### I.1.1.1. Répartition géographique

Le flétrissement bactérien est une maladie très largement répandue dans le monde puisqu'elle a en effet été signalée sur les cinq continents et dans presque toutes les zones tropicales, subtropicales et tempérées chaudes (Hayward, 1991). Cette maladie bien adaptée aux climats chauds et humides a été observée également sous des climats plus frais rencontrés notamment en Europe ou au niveau des hauts plateaux d'Amérique du Sud et d'Afrique. En Europe, la maladie a été détectée de manière sporadique en Suède (Olsson, 1976) et plus récemment en Grande Bretagne, en Espagne, au Portugal, en Italie en Belgique, aux Pays-Bas et en France (Janse, 1996; Stead *et al.*, 1996).

#### I.1.1.2. Spectre d'hôtes

Une autre caractéristique majeure du flétrissement bactérien est son très large spectre d'hôtes, vraisemblablement le plus large pour une phyto bactériose. En 1953, 33 familles botaniques touchées par la maladie ont été recensées (Kelman, 1953). Depuis, de nouvelles plantes-hôtes, dont des adventices, ont été identifiées s'ajoutant à une liste qui ne cesse de s'élargir. En 1994, plus de 50 familles botaniques regroupant plus de 200 espèces végétales ont été signalées touchées par le flétrissement bactérien (Hayward, 1994a).

La majorité des plantes-hôtes sont des dicotylédones, quelques monocotylédones sont aussi affectées. Certaines espèces sensibles présentent un grand intérêt économique car ce sont des cultures industrielles (banane, tabac, arachide, ...) ou vivrières (pomme de terre, tomate, aubergine, poivron,...).

#### I.1.1.3. Processus infectieux et symptomatologie

##### I.1.1.3.1. Processus infectieux

La majorité des recherches réalisées pour appréhender les mécanismes mis en jeu lors de l'infection d'une plante-hôte par *R. solanacearum* ont pris pour modèle d'étude la tomate. Digat et Caffier (1996) ont suggéré que des exsudats racinaires émis par la plante-hôte provoqueraient un chimiotactisme des bactéries présentes dans le sol vers les racines de la plante conduisant ainsi à une colonisation racinaire par les bactéries.

La pénétration de la bactérie peut s'effectuer au niveau de blessures naturelles telles que l'aisselle ou la pointe d'émergence des racines secondaires (Kelman & Sequeira, 1965; Schmit, 1978) ainsi que l'apex des racines (Vasse *et al.*, 1995). Elle peut aussi s'effectuer au niveau de blessures artificielles du système racinaire induites par l'homme lors des repiquages des plantes ou bien par des nématodes (*Meloidogyne* spp.); ces nématodes sont également connus pour favoriser l'infection par *R. solanacearum* du fait de la néoformation de galles au niveau racinaire, ce qui augmente le stress de la plante (Pitcher, 1963; Jatala *et al.*, 1975; Napière, 1980; Martin & Nydegger, 1982; Hébert, 1985; Cadet *et al.*, 1989; Deberdt, 1999).

L'étude par microscopie optique et électronique a permis de révéler que la pénétration se déroule en deux étapes successives. Tout d'abord, une étape d'infection des espaces intercellulaires du cortex interne, puis une étape de vascularisation par colonisation des vaisseaux du xylème (Vasse *et al.*, 1995). Les tissus adjacents aux vaisseaux du xylème colonisés par les bactéries réagissent en émettant des expansions vésiculeuses appelées thylles qui vont ensuite s'invaginer dans le xylème puis se rompre pour libérer les bactéries dans le xylème (Wallis & Truter, 1978; Grimault *et al.*, 1994).

Les EPS (pour exopolysaccharides) produits par la bactérie, en particulier l'EPS1, seraient indispensables à cette phase de pénétration (Saile *et al.*, 1997; Araud-Razou *et al.*, 1998). La synthèse de l'EPS et des enzymes intervenant dans la pathogenèse serait activée durant la colonisation de la plante suite à une conversion phénotypique des bactéries (Denny *et al.*, 1994). Après avoir pénétré dans les vaisseaux du xylème, les bactéries vont se multiplier activement et se propager rapidement dans toute la plante. L'accumulation des bactéries et des EPS produits en grande quantité par les bactéries de même que les thylles formés par la plante seraient à l'origine de l'obstruction des vaisseaux du xylème et du flétrissement de la plante (Wallis & Truter, 1978). En revanche, dans un cultivar résistant, la multiplication des bactéries, leur propagation de même que la production de l'EPS reste limitée aux seuls vaisseaux infectés (Grimault *et al.*, 1994; McGarvey *et al.*, 1999).

#### I.1.1.3.2. Symptomatologie (planches 1 et 2)

Chez la plupart des plantes, le symptôme caractéristique de la maladie est le flétrissement irréversible de l'appareil végétatif aérien de la plante (Buddenhagen & Kelman, 1964). Cependant, l'intensité des manifestations pathologiques et leur vitesse d'apparition dépendent de l'hôte (âge, espèce et cultivar), du potentiel d'inoculum (qualité, quantité) et des conditions environnementales (température, humidité, type de sol,...).

Chez la tomate, les premiers symptômes se caractérisent souvent par l'épinastie de certaines feuilles ou folioles. Sur les tiges, des bourrelets et des racines adventives, manifestation d'une accumulation d'acide indole acétique à l'intérieur des cellules végétales, peuvent se former (Buddenhagen & Kelman, 1964). Quand l'infection est importante, les bactéries envahissent tout le système vasculaire. Une coupe transversale de la tige laisse alors apparaître des exsudats bactériens blanchâtres sortant des vaisseaux du xylème (Digat & Caffier, 1996). La plante meurt ensuite en quelques jours.

Dans le cas de la pomme de terre, on observe d'abord un léger jaunissement des feuilles les plus basses. Quelques folioles flétrissent aux heures les plus chaudes de la journée. Puis la plante finit par flétrir totalement. En cas de forte infection, les vaisseaux du tubercule brunissent et un exsudat blanchâtre s'échappe des « yeux » (OEPP/EPPO, 1990). Le tubercule finit par se décomposer, d'où le nom de « pourriture brune » que donnent les producteurs de pomme de terre à la maladie.

Chez le bananier, la maladie se manifeste généralement par un jaunissement des feuilles qui se dessèchent et par un arrêt prématuré de la croissance des mains de bananes. Les fruits noircissent et tombent. Parfois, un jaunissement précoce et un rabougrissement des fruits peut s'observer (Nicole, 1995). Néanmoins, dans beaucoup de cas les faciès de la maladie peuvent varier et les plus jeunes feuilles peuvent flétrir brutalement alors que le développement des fruits ne semble pas altéré extérieurement. Une section des fruits permet alors d'observer le brunissement caractéristique des tissus conducteurs (Prior, communication personnelle).



Planche I. Symptômes de flétrissement bactérien sur tomate et tabac.



Planche 2. Symptômes de flétrissement bactérien sur pomme de terre (tubercule en coupe transversale) et sur bananier (bananes en coupe transversale).

Dans le cas du tabac, la manifestation de la maladie se limite généralement à un jaunissement puis un dessèchement des feuilles basses. Parfois, un flétrissement de la plante entière est observé mais uniquement dans le cas de jeunes plants (Luisetti, communication personnelle).

Dans le cas des jeunes plants d'arachide, les feuilles et quelquefois les tiges entières deviennent molles, s'affaissent, se dessèchent et noircissent (Nicole, 1995). Les fruits sont en général plus petits (Luisetti, communication personnelle).

Les plants de piment manifestent rarement le symptôme de flétrissement, mais progressivement les feuilles tombent et la plante se dessèche.

#### 1.1.1.4. Conservation et dissémination

##### 1.1.1.4.1. Modes de conservation

*R. solanacearum*, considéré comme un germe tellurique, peut survivre à l'état libre dans un sol mais sa capacité de survie dans un sol nu reste très discutée. Le temps de survie est dépendant du type de sol, du biovar et des conditions environnementales (Nicole, 1995).

Lors d'expérimentations avec des mélanges sol-sable, le temps de survie n'excède pas 24 semaines (Granada & Sequeira, 1983a). Selon d'autres auteurs (Okabe, 1971; Graham & Lloyd, 1979), la bactérie peut survivre pendant des périodes assez longues dans les couches profondes de certains sols. D'après Sequeira (1993), *R. solanacearum* ne peut pas survivre dans un sol durant des périodes prolongées car ce n'est pas un concurrent efficace par rapport à la microflore du sol. En fait, il semblerait que la bactérie ne survive pas dans le sol lui-même mais dans les racines de plantes-hôtes ou dans la rhizosphère des plantes non-hôtes (Granada & Sequeira, 1983a).

De nombreux types de sol peuvent être contaminés par *R. solanacearum*. Certains peuvent être réceptifs au flétrissement bactérien, d'autres en revanche peuvent être suppresseurs de par leurs caractéristiques physico-chimiques (Hayward, 1991). Cependant, peu de tentatives de caractérisation des relations entre la bactérie et les constituants du sol ont été réalisées. En outre, les résultats portant sur la relation type de sol/flétrissement bactérien sont souvent contradictoires. Par exemple, Abdullah *et al.* (1983) ont montré que le sol argileux conserve la bactérie plus longtemps que le sol sablonneux mais He (1990) a observé le contraire. Néanmoins, il semble admis que les sols ferrallitiques soient très favorables au développement de l'infection et que les vertisols ne le soient pas (Béreau & Messiaen, 1975; Prior *et al.*, 1993; Ramesh & Bandyopadhyay, 1993). Les argiles présentes dans ces sols joueraient un rôle essentiel. Sous l'action de la dessiccation, la fermeture du réseau poreux des argiles entraînerait un effet stérique légal pour les bactéries (Schmit & Robert, 1984; Schmit *et al.*, 1990).

Par ailleurs, l'humidité du sol est un facteur permettant une meilleure diffusion de la bactérie dans le sol et favorisant la survie de *R. solanacearum* (McCarter *et al.*, 1969; Nesmith & Jenkins, 1985). La bactérie survit mieux dans un sol humide et bien drainé que dans un sol sec ou inondé (Kelman, 1953; Buddenhagen & Kelman, 1964).

La température est également un facteur affectant la survie de la bactérie mais aussi l'interaction hôte-pathogène (Hayward, 1991). A des températures inférieures à 0 °C, la bactérie ne se maintient pas (Olsson, 1976). Entre 0 et 10 °C, la bactérie peut être présente mais la maladie ne se manifeste pas (Kelman, 1954). L'optimum de température se situe entre 30 et 35 °C sauf pour les souches race 3 (biovar 2) pour lesquelles l'optimum est voisin de 23 °C

Tableau I-1. Modes de dissémination de *R. solanacearum* répertoriés (d'après Kelman *et al.*, 1994).

Origine de la contamination	Autres informations	Référence
Matériel végétal plante	Tubercules de pomme de terre contaminés	Hayward (1991)
Semences vraies	Arachide (Chine) Arachide (Indonésie)	Zhang <i>et al.</i> (1993) Machmund et Middleton (1990) Sharma (1993) Devi et Menon (1980), Hayward (1991)
Boutures de tomate	Graines de tomate (de l'Inde au Népal) Graines de tomate (autres lieux) Du Sud-Est des Etats-Unis vers les états du Nord et du Canada	Vaughan (1944), Layne et McKean (1967), Citatis <i>et al.</i> (1992) Hsu (1991)
Plantes de fraisier	A partir d'inflorescences de bananiers atteintes de la maladie de Moko vers des inflorescences saines	Buddenhagen et Elsasser (1962)
Transmission par un insecte	Transmission mécanique par pincement	McCart et Jaworski (1969)
Transmission aérienne par dispersion des populations épiphytes lors de pluies	Transmission mécanique par élagage par l'équipement de récolte par blessure des racines lors des pratiques culturales	Kelman (1953), Lucas <i>et al.</i> (1955), Ficher (1963), Johnson et Powell (1969), Napière (1980)
Blessures dues aux nématodes	Divers hôtes	Kelman et Sequera (1965)
Transmission de racine à racine	Relargage des bactéries dans le sol à partir de racines infestées et contamination des racines voisines	Hara et Ono (1985), Ono (1983)
Transmission aérienne par dispersion des populations épiphytes lors de pluies	Sur tomate (Géorgie et Floride, Etats-Unis) Sur bananiers (Amérique Centrale) Sur <i>Perrilla crispata</i> (Taiwan) Général	Kelman (1953), Lucas <i>et al.</i> (1955), Ficher (1963), Johnson et Powell (1969), Napière (1980)

(Buddenhagen et Kelman, 1964). Cette adaptation thermique des souches de race 3 explique leur présence sous des latitudes élevées dans le monde et aux altitudes élevées sous les tropiques (Thurston, 1963). A 43 °C, *R. solanacearum* est incapable de survivre dans un sol (Seneviratne, 1988).

Les plantes flétries en décomposition, les débris organiques de même que tout matériel végétal (plants, tubercules de pomme de terre, pieds de banane, rhizomes de gingembre ou d'*heliconia*) ne manifestant pas de symptômes sont considérés comme des réservoirs de l'inoculum car porteurs d'infections latentes (Graham *et al.*, 1979; Ciampi *et al.*, 1980; Nyangeri *et al.*, 1984; Prior *et al.*, 1990; Hayward, 1991; Skoglund *et al.*, 1993). Les nombreuses plantes adventices hôtes, telles que la morelle noire et la morelle douce-amère, constituent également une source potentielle d'inoculum (Amat *et al.*, 1978; Hayward, 1991; Caudron *et al.*, 1992; Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Elphinstone *et al.*, 1998; Tusiime *et al.*, 1998).

De plus, l'eau d'irrigation peut être aussi considérée comme un milieu potentiel de conservation de la bactérie même si très peu d'études ont abordé ce sujet (Janse, 1996; Sunaina *et al.*, 1998; Farag *et al.*, 1999).

Enfin, sous certaines conditions d'humidité relative, *R. solanacearum* pourrait avoir une aptitude à la survie épiphyte (Moffett *et al.*, 1981).

#### I.1.1.4.2. Modes de dissémination

Il existe de nombreuses voies potentielles de transmission du flétrissement bactérien (tableau I-1). L'homme en est certainement le principal responsable aussi bien localement qu'au niveau international. La dissémination peut s'effectuer par utilisation de matériel végétal porteur d'infections latentes (Hayward, 1991). Il est quasi certain que l'importation de tubercules de pomme de terre infectés à l'état latent, destinés à la consommation ou à la transformation industrielle, soit à l'origine des foyers de flétrissement bactérien déclarés en Europe (Digat & Caffier, 1996; Janse, 1996; Stead *et al.*, 1996). L'homme peut également contribuer à la dispersion de la maladie par ses interventions culturales notamment lors de la taille et de la récolte (Kelman *et al.*, 1994).

Un autre facteur de dissémination très important est l'eau, l'eau de ruissellement mais aussi l'eau d'irrigation (Olsson, 1976; Hayward, 1991; Elphinstone *et al.*, 1998; Farag *et al.*, 1999).

La transmission de la maladie par les semences vraies (ce qui exclut les tubercules de pomme de terre) reste discutée mais très peu d'études portent sur ce sujet. Néanmoins, il a été montré que la transmission est possible dans le cas de l'arachide même si elle peut être évitée par séchage des graines (Machmud & Middleton, 1991; Zhang *et al.*, 1993). Par ailleurs, les travaux de Shakyia sur semences de tomate (1993) ont permis d'envisager leur rôle dans la transmission de *R. solanacearum*.

Enfin, dans le cas de la maladie de Moko sur bananier, causée par la race 2 de *R. solanacearum*, les insectes sont connus comme vecteurs de la maladie (Buddenhagen & Elsasser, 1962).

Tableau I-2. Principaux critères d'identification de l'espèce *R. solanacearum* (d'après Hayward, 1994b).

Caractère toujours présent	Inclusions de poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Métabolisme oxydatif des sucres Solubilité dans du KOH à 3 % Cytochrome c oxydase Catalase Croissance dans un milieu nutritionnel à 1 % en NaCl Utilisation du citrate de Simmons
Caractère jamais présent	Pigment fluorescent Arginine dihydrolase Hydrolyse de la gélatine Hydrolyse de l'amidon Hydrolyse de l'esculine Croissance dans un milieu nutritionnel à 2 % en NaCl Production de levane

Tableau I-3. Caractéristiques différentielles des biovars de *R. solanacearum* (d'après Hayward, 1964 et He *et al.*, 1983).

	Biovar 1	Biovar 2	Biovar 3	Biovar 4	Biovar 5
Cellulose	-	+	+	-	+
Lactose	-	+	+	-	+
Maltose	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	+	+	-
Sorbitol	-	-	+	+	-

+ : utilisation du sucre ou du sucre alcool; - : pas d'utilisation.

## 1.1.2. *Ralstonia solanacearum*

### 1.1.2.1. Caractéristiques de l'espèce et position taxonomique

L'agent responsable du flétrissement bactérien a longtemps été connu sous le nom de *Pseudomonas solanacearum*, E. F. Smith en fit la première description il y a un peu plus d'un siècle. L'essor des techniques de biologie moléculaire est en partie à l'origine de l'évolution de la nomenclature. En 1984, Palleroni a montré que les espèces du genre *Pseudomonas* se répartissent en cinq groupes sur la base d'homologie ARNr (pour ARNr ribosomique)/ADN et ADN/ADN, les espèces phytopathogènes étant classées dans les groupes I et II. *P. solanacearum* appartient au groupe II car cette bactérie accumule des réserves énergétiques sous la forme de granules lipidiques (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate) et ne synthétise pas de pigments fluorescents. En 1992, une nouvelle nomenclature étant acceptée, les sept espèces du groupe II ont été transférées dans le genre *Burkholderia* (Yabuuchi *et al.*, 1992). Cette modification est basée sur l'analyse des lipides cellulaires et des acides gras, sur des caractères phénotypiques, sur les homologies ADN/ADN ainsi que sur l'analyse phylogénétique de séquences nucléotidiques de l'ADNr 16S. Enfin, les mêmes auteurs (Yabuuchi *et al.*, 1995) ont proposé, sur la base des mêmes critères, de transférer *B. solanacearum* ainsi que *B. pickettii* et *Alcaligenes eutrophus* au sein d'un nouveau genre *Ralstonia*. Cette proposition étant validée, l'agent du flétrissement bactérien est désormais désigné sous le nom de *Ralstonia solanacearum*.

*R. solanacearum* est une espèce bactérienne appartenant à la famille des Pseudomonadacées. Elle est caractérisée par une forme cellulaire en bâtonnet, de 0,5  $\mu\text{m}$  de large pour 1,5  $\mu\text{m}$  de long en moyenne, et peut être mobile avec un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif et à métabolisme oxydatif (Palleroni, 1984). Les principaux critères d'identification de l'espèce *R. solanacearum* sont présentés dans le tableau 1-2.

Sur milieu de culture LPGA (annexe 1) les colonies de *R. solanacearum* apparaissent muqueuses, brillantes de couleur blanc-beige après trois jours à 28 °C. Sur un milieu de culture contenant du chlorure de triphényltétrazolium (Kelman, 1954), deux types de colonies se distinguent (planche 3). Les colonies de couleur blanc-rosé qui produisent une grande quantité d'exopolysaccharides (EPS) sont dites muqueuses et sont virulentes. Les colonies plus petites, de couleur rouge vif et qui ne produisent que peu ou pas d'EPS, sont dites rugueuses et sont avirulentes. La conversion phénotypique de la forme muqueuse en la forme rugueuse est très fréquente et est observable aussi bien en culture que dans la plante (Buddenhagen & Kelman, 1964). Cette conversion s'accompagne d'autres modifications. En effet, les mutants avirulents sont plus mobiles, produisent plus de polygalacturonases mais sont affectés dans la production d'endoglucanase et de lipopolysaccharides (LPS) (Brumbley & Denny, 1990; Denny *et al.*, 1994).

### 1.1.2.2. Classification infra-spécifique

*R. solanacearum* est une espèce bactérienne qui présente une très grande variabilité. Actuellement, seules les subdivisions en races et en biovars sont couramment utilisées pour caractériser les souches de *R. solanacearum*, et elles le sont en général conjointement.

La subdivision de l'espèce en races est basée sur le spectre d'hôtes des souches. Buddenhagen *et al.*, en 1962, distinguent initialement trois races. La race 1 possède la gamme d'hôtes la plus large. Elle regroupe des souches pathogènes de nombreuses Solanacées (telles que

Tableau I-4. Différenciation du biovar 2 de *R. solanacearum* en sous-phénotypes (d'après Hayward, 1994b).

Biovar 2 A		Biovar 2 A		Biovar N2 ou 2T (isolats des Andes) (isolats tropicaux)	
Distribution géographique					
Propriétés phénotypiques :					
Transformation du nitrate en nitrite					
+ - - - + - (5/8)					
Utilisation du thraïose					
- - - - + -					
Utilisation de l'inositol					
+ - - - + -					
Utilisation du D-ribose					
- - - - + -					
Activité pectinolytique					
+ - - - + -					
Génotype :					
Groupes RFLP (Cook <i>et al.</i> , 1991)					
26 A, 26 B		27 A, 27 B, 27 C		29, 30, 31, 32, 33	
tous les continents		Chili, Colombie		Brésil, Pérou	

Tableau I-5. Tableau synthétique de la classification subsécutive de *R. solanacearum* (d'après Gillings et Fahy, 1993a).

Espèce														
<i>Ralstonia solanacearum</i>														
« Sous-espèce »						« Sous-espèce »								
Division 1 (« Asiaticum »)			Division 2 (« Americanum »)			3			4			5		
Biovar		3		4		N2		1		2				
Groupe RFLP		8		9		10		11		12				
Race		13		14		15		16		17				
		18		19		20		21		22				
		23		24		25		26		27				
		28		29		30		31		32				
		33		34		35		36		37				
		38		39		40		41		42				

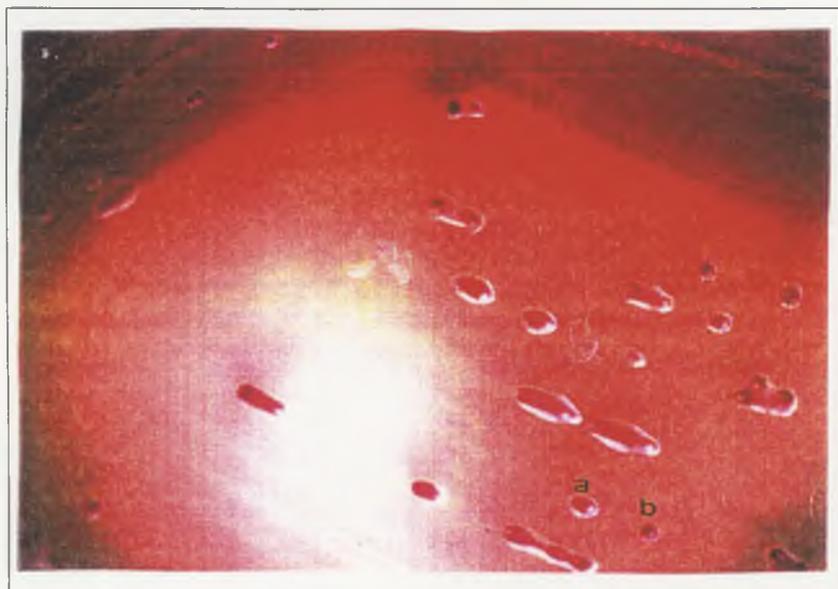


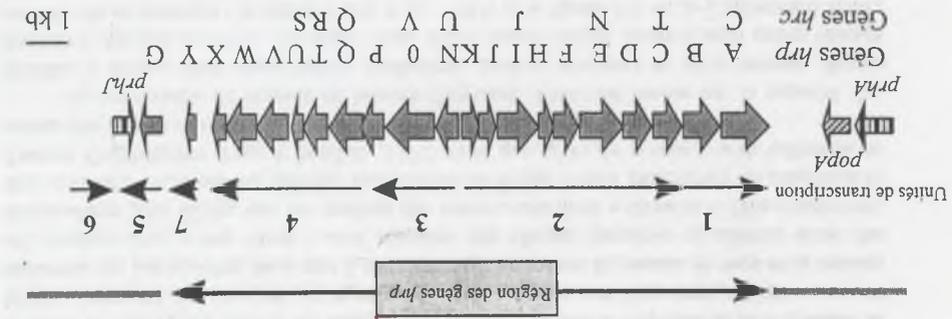
Planche 3. Colonies de *Ralstonia solanacearum* isolées sur milieu de Kelman (1954).  
- a : colonie muqueuse et virulente.  
- b : colonie rugueuse et avirulente.

le tabac, la tomate, la pomme de terre, l'aubergine, le poivron,...), des bananiers diploïdes et d'autres plantes appartenant à des familles très diverses. La race 2 responsable de la maladie de Moko comprend des souches au spectre d'hôtes restreint aux bananiers triploïdes et aux *Heliconia sp.* Les souches de la race 3 affectent essentiellement la pomme de terre et la tomate; ces souches dites « race froide » sont adaptées aux climats tempérés et tolèrent donc des températures plus faibles que les souches des autres races dites « chaudes ». Plus récemment, deux nouvelles races ont été définies. Les souches de la race 4 sont pathogènes du gingembre et d'autres Zingibéracées (Pegg & Moffett, 1971) alors que celles de la race 5 sont inféodées au mûrier (He *et al.*, 1983).

La subdivision de l'espèce en biovars (Hayward, 1964) est fondée sur la capacité des souches à utiliser trois disaccharides (cellobiose, lactose, maltose) et trois hexoses alcools (mannitol, dulcitol, sorbitol). Hayward a ainsi défini quatre biovars. Depuis, deux autres biovars ont été mis en évidence : le biovar 5 (He *et al.*, 1983) et le biovar N2 ou 2-T (Hayward *et al.*, 1990; Hayward *et al.*, 1992; French, 1994) (tableaux I-3 et I-4). Ce dernier se distingue du biovar 2 par une gamme d'hôtes plus large et une activité métabolique légèrement différente.

Les deux systèmes de classification, en races et en biovars, ne se recoupent pas à l'exception de la race 5 qui correspond exactement au biovar 5 et des souches de la race 3 qui tombent toutes dans le biovar 2 (tableau I-5). Cette absence de concordance n'est pas très surprenante dans la mesure où la classification en races est établie sur des critères écologiques alors que la classification en biovars est basée sur des caractères phénotypiques (Gillings & Fahy, 1994).

L'utilisation récente de techniques de biologie moléculaire a fait apparaître une certaine diversité au sein de ces deux systèmes de classification. Ainsi les analyses RFLP (pour Restriction Fragment Length Polymorphism) (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991; Cook & Sequeira, 1994) de 164 souches ont mis en évidence 46 groupes RFLP répartis au sein de deux divisions génétiquement distinctes. Ces divisions sont bien corrélées (à quelques exceptions près), d'une part à l'origine géographique des souches, et d'autre part à leur classification en biovars. La division 1 dite « Asiaticum » regroupe les souches de biovars 3, 4 et 5 originaires d'Asie et d'Australie alors que la division 2 nommée « Americanum » comprend les souches de biovars 1, 2 et N2 originaires des Amériques. L'existence de ces deux divisions a été confirmée par les comparaisons de séquences du fragment 16S de l'ADNr (Li *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996), de la région comprise entre les fragments 16S et 23S de l'ADNr et des gènes codant pour la polygalacturonase et l'endoglucanase (Fegan *et al.*, 1998a). De plus, ces comparaisons de séquences ont révélé l'existence d'une subdivision, incluant uniquement des souches indonésiennes, au sein de la division 2. Enfin, et c'est l'un des résultats majeurs des travaux présentés dans ce mémoire, l'analyse de la diversité existant chez *R. solanacearum* par PCR-RFLP des gènes *hrp*, par AFLP (pour Amplified Fragment Length Polymorphism), et par une comparaison plus complète de séquences du fragment 16S de l'ADNr (cf. chapitre III.1.2.), a conduit à la mise en évidence d'une autre subdivision constituée uniquement de souches originaires du Sud de l'Afrique.



**Figure I-1. Organisation de la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum* (d'après Marendza *et al.*, 1996; Van Gijsegem *et al.*, 1998 et Brito *et al.*, 1999).**  
 Les flèches fines représentent les unités de transcription et les flèches épaisses symbolisent les gènes.  
 Le sens des flèches indique le sens de transcription.

### 1.1.2.3. Déterminants du pouvoir pathogène

Les progrès observés ces dernières années en génétique bactérienne et en biologie moléculaire ont permis d'accroître considérablement les connaissances liées aux interactions plantes-microorganismes (Boucher *et al.*, 1992). Plusieurs laboratoires travaillent actuellement sur les interactions plantes-*R. solanacearum*; leurs études font figure de modèle dans le domaine.

Le pouvoir pathogène est la résultante de deux composantes : la virulence et l'agressivité. La virulence est définie comme la capacité d'un agent pathogène à provoquer la maladie sur un cultivar alors que l'agressivité représente une mesure quantitative du degré d'attaque de la plante par l'agent pathogène.

Deux approches ont permis de caractériser plusieurs déterminants du pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. La première approche a consisté en la recherche par mutagenèse aléatoire et la caractérisation de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène. La seconde approche a consisté en l'isolement et la caractérisation de molécules excrétées par la bactérie et ayant *a priori* un rôle dans le pouvoir pathogène (exoenzymes, exopolysaccharides).

#### 1.1.2.3.1. Les gènes *hrp* et *dsp*

Une mutagenèse aléatoire à l'aide du transposon Tn5 sur le génome de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* a permis l'isolement de deux types de mutants affectés dans leur pouvoir pathogène (Boucher *et al.*, 1985).

Certains mutants ont perdu leur aptitude à provoquer la maladie sur plante-hôte sensible mais ont conservé leur capacité à induire une réaction d'hypersensibilité (HR) sur plante-hôte résistante ou plante non-hôte. Une HR se caractérise par la nécrose rapide et localisée de la zone foliaire infiltrée par des bactéries. Les gènes correspondants nommés *dsp* (*d*isease *s*pecific), sont présents dans au moins trois régions du génome dont une s'étend sur environ 15 kpb (Arlat & Boucher, 1991).

D'autres mutants, qui ont fait l'objet de bien plus nombreuses études et publications, ne sont plus capables de provoquer la maladie sur plante-hôte ou d'induire une HR sur plante-hôte résistante ou plante non-hôte. Les gènes correspondants ont été désignés *hrp* (*h*ypersensitive *r*esponse and *p*athogenicity) pour être en accord avec la nomenclature proposée pour les gènes de *P. syringae* pv. *phaseolicola* dont la mutation conduit au même phénotype (Lindgren *et al.*, 1986).

#### • Caractérisation des gènes *hrp*

Chez la souche GMI1000, les gènes *hrp* sont organisés au sein d'un cluster qui s'étend sur une seule région d'environ 23 kpb localisée sur un mégaplasmide de plus de 1000 kpb (Boucher *et al.*, 1986; Boucher *et al.*, 1987; Arlat *et al.*, 1992). Cette région *hrp* (figure 1-1) comprend sept unités transcriptionnelles, numérotées de 1 à 7, et 20 cadres ouverts de lecture (ORF pour Open Reading Frame) ont été identifiés (Genin *et al.*, 1992; Gough *et al.*, 1992; Van Gijsegem *et al.*, 1995; Marendia *et al.*, 1996).

Par ailleurs, une autre région *hrp* a été localisée chez la souche K60 de *R. solanacearum* (Huang *et al.*, 1990). Cette région constituée de deux unités transcriptionnelles de 1,3 et 0,7 kpb espacées de 2 kpb n'a révélé aucune homologie avec la région *hrp* de la souche GMI1000. Les mutants correspondants sont affectés dans leur aptitude à provoquer la maladie sur pomme de terre et induisent une HR partielle ou retardée sur tabac.

- Régulation de la région *hrp*

Les conditions de culture de même que le gène *hrpB* ont un effet régulateur sur la transcription des gènes *hrp* de la souche GMI1000. En effet, la transcription des unités 1 à 4 et 7 et aussi d'une région de 10 kpb adjacente à l'extrémité gauche de la région *hrp* est induite en milieu minimum et *in planta* alors qu'elle est réprimée en milieu riche (Arlat *et al.*, 1992; Genin *et al.*, 1992). De plus, l'expression des gènes en milieu minimum est variable en fonction de la source de carbone utilisée (Arlat *et al.*, 1992). La transcription des unités 1 à 4 et 7 et aussi de la région de 10 kpb est également activée par la protéine *hrpB* issue du gène *hrpB* lorsque celui-ci est fonctionnel. La séquence de la protéine *hrpB* possède des homologies avec celle d'activateurs transcriptionnels décrits chez d'autres procaryotes (Genin *et al.*, 1992). En revanche, les unités de transcription 5 et 6 ne sont pas régulées de la même manière puisque la transcription de ces unités est identique en milieu riche ou minimum, que le gène *hrpB* soit fonctionnel ou pas.

En présence de cellules végétales, l'expression des gènes *hrp* est très fortement et spécifiquement induite et serait contrôlée par le gène *prhA* qui code pour une protéine permettant la perception de signaux de plantes (Marenda *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 1999). Les gènes *prhJ* et *hrpG* (correspondant à l'unité de transcription 5) interviendraient dans la cascade de transduction du signal plante, le gène *hrpG* contrôlant directement le gène *hrpB* (Van Gijsegem *et al.*, 1998; Brito *et al.*, 1999) (figure I-1).

- Fonctions et rôle présumés des gènes *hrp*

Les gènes *hrp* sont indispensables dans l'établissement de la relation de parasitisme avec la plante puisque les mutants *hrp* sont non pathogènes et n'induisent pas de HR (Boucher *et al.*, 1992). Ces gènes n'interviennent pas dans le processus d'infection puisque les mutants sont toujours capables d'infecter et coloniser les plantes (Trigalet & Demery, 1986).

Les gènes *hrp* ont également été identifiés chez plusieurs espèces d'*Erwinia* (Beer *et al.*, 1991; Bauer *et al.*, 1994; Nizan *et al.*, 1997), chez plusieurs pathovars de *P. syringae* (Lindgren *et al.*, 1986; Lindgren *et al.*, 1988; Collmer, 1998), ainsi que chez *X. vesicatoria* (Bonas *et al.*, 1991) et plusieurs pathovars de *X. campestris* (Boucher *et al.*, 1987). Des homologies de séquence au sein de ces clusters de gènes *hrp* ont été montrées entre ces différentes espèces bactériennes (Alfano & Collmer, 1997; Boucher *et al.*, 1992), ce qui leur suggère des fonctions communes essentielles pour l'établissement de la relation de parasitisme avec la plante. Ces gènes *hrp* renommés *hrc* (HR and conserved) sont à la base d'un système de sécrétion/injection dit de type III (Bogdanove *et al.*, 1996); les protéines transitant via ce système ne sont pas modifiées et sont probablement sécrétées en une seule étape du cytoplasme vers le milieu extérieur. Cet appareil de sécrétion/injection est conservé non seulement chez la plupart des bactéries phytopathogènes mais aussi chez de nombreuses bactéries pathogènes d'animaux telles que *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp. (Gough *et al.*, 1992). Les protéines issues de ces gènes peuvent être aussi impliquées dans la biosynthèse de flagelles (Van Gijsegem *et al.*, 1995) mais leur rôle n'est pas encore bien connu (Van Gijsegem *et al.*, 1998). Chez *Yersinia*, ce système de sécrétion permet d'injecter des protéines (Yop pour *Yersinia* outer protein), impliquées dans le pouvoir pathogène de la bactérie, directement dans la cellule eucaryote sans passage par le milieu extracellulaire (Collmer, 1998). Ces protéines, baptisées harpines, ont été identifiées chez *P. syringae* pv. *syringae* et *E. amylovora* (Wei *et al.*, 1992; He *et al.*, 1993). Chez *R. solanacearum*, une protéine candidate, PopA1 (*Pseudomonas* outer protein), dont la sécrétion

dépend de l'expression du gène *hrpB*, a été mise en évidence dans le surnageant de culture de la souche GMI1000 (Arlat *et al.*, 1994). PopA1 est codée par le gène *popA* situé à environ 4 kpb de l'extrémité gauche du cluster *hrp* (figure I-1). L'infiltration de la protéine PopA1 dans des feuilles de tabac résistant provoque une HR, mais les mutants *popA-* restent toujours pathogènes de toute plante-hôte sensible ce qui suggère l'existence d'autres protéines transitant par le système de type III impliquées dans les interactions avec les plantes (Arlat *et al.*, 1994). Récemment, deux nouvelles protéines sécrétées par la voie *hrp*, PopB et PopC, issues des gènes *popB* et *popC* ont été identifiées (Guénéron *et al.*, 2000). Les trois gènes, *popA*, *popB* et *popC* régulés par le gène *hrpB* appartiennent au même opéron. De plus, les protéines PopB et PopC présentent des caractéristiques normalement inféodées aux protéines d'origine eucaryote, ce qui laisse supposer qu'elles pourraient être, après injection, actives à l'intérieur des cellules végétales (Guénéron *et al.*, 2000).

#### I.1.2.3.2. Les exoenzymes

*R. solanacearum* produit des enzymes hydrolytiques extracellulaires (endoglucanase, polygalacturonases) responsables de la dégradation des tissus de la plante infectée (Husain & Kelman, 1958).

Chez les souches AW et K60 de *R. solanacearum*, une endoglucanase, codée par le gène *eglA* (pour endoglucanase), a été décrite (Roberts *et al.*, 1988) de même qu'une endopolygalacturonase, codée par le gène *pglA* (pour polygalacturonase) ou *pehA* et deux exopolygalacturonases, codées par *pglB* (ou *pehB*) et *pglC* (ou *pehC*) (Schell *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1991; Schell *et al.*, 1994). L'ensemble de ces enzymes participe au pouvoir pathogène de la bactérie mais aucune d'entre elles ne lui est, à elle seule, indispensable pour provoquer la maladie. En effet, les mutants affectés dans la production d'une seule exoenzyme sont toujours aptes à induire la maladie et ont généralement une agressivité faiblement diminuée (Roberts *et al.*, 1988; Schell *et al.*, 1994; Schell, 1996). Néanmoins, un mutant *eep* (pour export of extracellular proteins), altéré dans la sécrétion de plusieurs exoenzymes, présente un pouvoir pathogène nettement réduit par rapport à celui de la souche sauvage (Kang *et al.*, 1994).

#### I.1.2.3.3. Les exopolysaccharides

Seules les souches virulentes de *R. solanacearum* produisent des polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides (EPS) aussi bien *in vitro* qu'*in planta*. Quatre sous-fractions polysaccharidiques très hétérogènes, EPS1, EPS2, EPS3 et EPS4 ont été isolées, EPS1 étant le composé majoritaire et un facteur essentiel du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* (Denny & Baek, 1991; Orgambide *et al.*, 1991; Trigalet-Demery *et al.*, 1993). La synthèse des EPS est contrôlée par les gènes *eps* et *ops* (pour outer membrane polysaccharide) (Cook & Sequeira, 1991a; Kao & Sequeira, 1991; Schell *et al.*, 1993; Schell, 1996). Les gènes *ops* seraient également impliqués dans la production de lipopolysaccharides (LPS) qui pourraient avoir un rôle dans le pouvoir pathogène de la bactérie (Duvick & Sequeira, 1984; Kao & Sequeira, 1991).

Le rôle des EPS dans l'apparition des symptômes de flétrissement chez les plantes colonisées par *R. solanacearum* a été suggéré depuis longtemps (Husain & Kelman, 1958; Wallis & Truter, 1978). Les EPS s'accumuleraient dans les vaisseaux du xylème conduisant à un ralentissement voire un blocage de la circulation d'eau et des sels minéraux dans la plante. Ce rôle

a été démontré en révélant qu'un mutant *eps* apparaissait beaucoup moins agressif que la souche sauvage (Denny *et al.*, 1990; Denny & Baek, 1991). Cependant, ce mutant reste capable de pénétrer dans la plante. En outre, ces EPS pourraient faciliter la circulation de *R. solanacearum* dans la plante en la protégeant contre les phénomènes d'agglutination et/ou de fixation dus aux agglutinines végétales (Duvick & Sequeira, 1984; Young *et al.*, 1985; Young & Sequeira, 1986). Des études histologiques ont révélé que la fraction EPS1 est nécessaire à l'infection des espaces intercellulaires du cortex interne des racines et à la colonisation des vaisseaux du xylème (Vasse *et al.*, 1995; Saile *et al.*, 1997; Araud-Razou *et al.*, 1998) mais n'est pas suffisante pour conduire au flétrissement et donc à la mort de la plante (Denny *et al.*, 1990; Denny & Baek, 1991; Kang *et al.*, 1994). De plus, il a été observé récemment que la production d'EPS1 par les populations bactériennes est plus importante chez un cultivar sensible que chez un cultivar résistant (McGarvey *et al.*, 1999).

#### I.1.2.3.4. Les gènes régulateurs à effet pléiotrope

Sur milieu de Kelman (Kelman, 1954), les colonies sauvages à l'aspect muqueux et de couleur blanc-rosé sont distinguables des autres colonies à l'aspect rugueux et de couleur rouge. Ces dernières résulteraient de mutations spontanées, très fréquentes, intervenant au sein d'un gène régulateur global, le gène *phcA* (Brumbley & Denny, 1990; Brumbley *et al.*, 1993). Des travaux très récents menés sur le gène *phcA* ont révélé que le changement de phase peut être fixé, dans le cas d'une mutation ponctuelle, ou réversible dans le cas de réarrangements génomiques comme une transposition via une séquence d'insertion ou une duplication interne du gène (Thoquet & Trigalet, 2000). Les mutants nommés PC (pour Phenotypic Conversion) sont de nature pléiotrope car ils sont affectés dans leur pouvoir pathogène mais aussi dans la production d'EPS et d'endoglucanase; en revanche, ils produisent plus de polygalacturonases et sont très mobiles par rapport à la souche sauvage (Boucher *et al.*, 1992). Selon Denny *et al.* (1994), *R. solanacearum* serait sous forme PC au niveau du sol et lors de l'infection d'une plante-hôte, la densité bactérienne augmentant, le gène *phcB*, coderait pour un inducteur volatil (Clough & Denny, 1990) qui activerait la transcription des gènes responsables de la synthèse des EPS et d'endoglucanase. D'autres gènes contrôlant la production conjointe des EPS et des exoenzymes ont par ailleurs été caractérisés (Huang *et al.*, 1993; Schell *et al.*, 1993; Kao *et al.*, 1994; McWilliams *et al.*, 1995; Allen *et al.*, 1997; Chapman & Kao, 1998). Ces résultats suggèrent que les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* peuvent être régulés selon les conditions environnementales et permettent d'appréhender la très grande capacité d'adaptation de *R. solanacearum* à des milieux aussi variés que le sol, la rhizosphère et la plante (Schell, 1996; Allen *et al.*, 1998).

### I.1.3. Les méthodes de lutte

Le flétrissement bactérien demeure l'une des maladies les plus préoccupantes pour de nombreuses cultures, en particulier celle des Solanacées. Il s'avère en effet que les moyens de lutte contre cette bactériose, exclusivement préventifs, sont le plus souvent difficilement applicables et restent d'une efficacité limitée. Le facteur limitant est que les mesures de lutte sont généralement spécifiques d'un site géographique ou d'une espèce cultivée et aucune solution universelle n'existe (Hayward, 1991). Ainsi, il est couramment recommandé d'adopter une lutte intégrée associant différentes techniques de lutte pour parvenir à réduire l'impact du flétrissement bactérien (Akiew *et al.*, 1993; Elphinstone & Aley, 1993; Prior *et al.*, 1993; Fortnum & Martin, 1998; French *et al.*, 1998; Mariano *et al.*, 1998).

### I.1.3.1. La lutte prophylactique

La lutte prophylactique repose sur un ensemble de mesures, souvent les plus accessibles, visant à réduire le potentiel d'inoculum et à limiter les voies de pénétration. L'élimination des plantes malades par arrachage est fréquemment la première mesure conseillée. Limiter les sources d'inoculum passe également par l'utilisation de matériel sain. Ainsi il est important de n'utiliser que des semences (graines et tubercules) et des plants sains. La culture doit se faire dans un environnement sain (sol ou substrat non contaminé) et les pratiques culturales doivent être réalisées avec un équipement (pour la greffe, l'arrachage, le travail du sol,...) et des intrants désinfectés (eaux d'irrigation, fertilisants) (Kelman *et al.*, 1994). Des contrôles sanitaires aux frontières, nécessitant l'emploi d'outils de diagnostic performants, sont indispensables pour éviter l'introduction de l'agent pathogène et la dissémination de la maladie.

Les rotations culturales avec des plantes non-hôtes de *R. solanacearum* (par exemple le riz, le soja, le bringellier) peuvent permettre de limiter le renouvellement de l'inoculum et donc réduire l'incidence du flétrissement bactérien mais l'expérience montre que les résultats sont plus ou moins satisfaisants selon la race de *R. solanacearum* considérée (Wang *et al.*, 1983; Melton & Powell, 1991; Elphinstone & Aley, 1993; Girard *et al.*, 1993; Machmud, 1993; Fortnum & Martin, 1998; Mariano *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les amendements organiques (boue de station d'épuration, bagasse de canne à sucre, urée, farine de soja,...) ont été rapportés pour être efficaces en favorisant la résistance des plantes aux agressions parasitaires (Béreau & Messiaen, 1975; Rat, 1978; Clairon, 1984; Prior & Béramis, 1990; Elphinstone & Aley, 1993; Hartman *et al.*, 1993; Michel *et al.*, 1997; Michel & Mew, 1998).

De même, une gestion raisonnée de l'irrigation peut assurer la conservation des propriétés suppressives naturelles de certains sols, en particulier des vertisols (Prior *et al.*, 1993).

### I.1.3.2. La lutte génétique

L'utilisation de cultivars résistants est potentiellement la méthode de lutte la plus efficace contre le flétrissement bactérien (Hayward, 1991). Les programmes de sélection variétale (pomme de terre, tomate, tabac, aubergine, arachide,...) sont effectués dans de nombreux pays mais principalement au CIP (Centre International de la Pomme de terre) au Pérou et à l'AVRDC (Asian Vegetable Research and Development Center) à Taïwan. Cette stratégie faisant appel aux cultivars résistants a connu certains succès dans le cas de l'arachide et du tabac (Kelman, 1953; Thurston, 1976; Schmiediche, 1988). Chez la pomme de terre, les cultivars résistants ne sont le plus souvent que tolérants puisqu'ils peuvent héberger des infections latentes (Schmiediche, 1986). *Solanum phureja* est la source majeure de résistance utilisée dans les programmes de sélection de la pomme de terre (Sequeira & Rowe, 1969; Rowe *et al.*, 1972). Cependant, l'utilisation récente de *S. commersonii* (Laferrière *et al.*, 1998) et de *S. stenotomum* (Fock, 2000) comme sources de résistance s'est révélée très fructueuse. Deux sources de résistance au flétrissement bactérien sont rapportées chez la tomate (Prior *et al.*, 1994) : la première repérée chez CRA66 héritée du génotype sauvage *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* et utilisée en particulier pour l'obtention de variétés telles que Caraïbo ou Calinago, la seconde trouvée dans Hawaïi 7996 héritée de *L. pimpinellifolium*.

Mais la résistance variétale dans laquelle beaucoup d'espoirs ont été placés est encore loin de donner entière satisfaction, bien que les variétés résistantes disponibles actuellement rendent déjà de grands services. En effet, dans bien des cas, la résistance se révèle instable, dans le temps et dans l'espace, en raison de la grande variabilité de virulence et d'agressivité des souches de *R. solanacearum* ainsi que des différences de conditions agro-pédo-climatiques influençant le développement de la maladie (Prior *et al.*, 1994; Hanson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998a). De plus, les variétés résistantes ne présentent que très rarement des propriétés agronomiques adaptées à la situation. En outre, les cultivars, même les plus résistants, peuvent héberger des populations bactériennes en concentrations élevées sans que celles-ci n'induisent de symptômes (Ciampi *et al.*, 1980; Prior *et al.*, 1990; Deberdt, 1999). L'utilisation de ces variétés porteuses d'infections latentes doit être réalisée avec précaution car elles sont susceptibles d'être une source importante de dissémination de la maladie.

La résistance au flétrissement bactérien n'est pas liée à un mécanisme de résistance à la pénétration bactérienne du système racinaire mais bien à la limitation de la colonisation bactérienne des tissus conducteurs notamment par la production de thylles (Grimault & Prior, 1993; Grimault *et al.*, 1994).

L'étude du déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez la tomate a été entreprise et a montré que la résistance est de nature polygénique; plusieurs QTL (pour Quantitative Trait Loci) ont été localisés sur différents chromosomes de la tomate (Danesh *et al.*, 1994; Thoquet *et al.*, 1996a; Thoquet *et al.*, 1996b; Wang *et al.*, 1998b). Par ailleurs, le gène *rrs1* conférant la résistance d'un écotype d'*Arabidopsis thaliana* à certaines souches de *R. solanacearum* a été identifié (Deslandes *et al.*, 1998).

Il a également été montré que la résistance au flétrissement bactérien chez la tomate est mise en échec suite à l'infestation par des nématodes à galles, la plante n'étant plus capable de gérer simultanément les mécanismes de résistance pour contrôler efficacement la colonisation bactérienne et les changements physiologiques imposées par la néoformation de galles au niveau du système racinaire. L'introgression par rétrocroisement du gène *Mi*, conférant la résistance aux nématodes à galles, s'accompagne de la baisse du niveau de résistance au flétrissement bactérien (Deberdt, 1999).

Par ailleurs, le greffage de variétés sensibles de tomate ou d'aubergine sur des porte-greffes résistants est une méthode de lutte qui peut s'appliquer avec succès contre le flétrissement bactérien mais n'est pas envisageable à grande échelle (coût et main d'oeuvre trop élevé) (Beyries & Bérarnis, 1986; Peregrine & Ahmad, 1982; Girard *et al.*, 1993).

### 1.1.3.3. La lutte chimique

La lutte chimique demeure quasi inexistante car les traitements de sols à l'aide de fumigants (bromure de méthyle, chloropicrine) sont très onéreux, très polluants et souvent d'une efficacité limitée dans le temps surtout si la source d'inoculum est importante (Enfinger *et al.*, 1979; Fortnum & Martin, 1998). En revanche, la fumigation associée à la solarisation peut réduire l'impact du flétrissement bactérien (Chellemi *et al.*, 1993). La solarisation consiste à recouvrir le sol nu de plastique en saison chaude, le réchauffement du sol ainsi provoqué jusqu'à une vingtaine de centimètres de profondeur permet de réduire la pullulation de nombreux pathogènes telluriques : champignons, nématodes et bactéries. Dans le cas de cultures hors-sol, la désinfection du substrat et des solutions nutritives est possible par utilisation d'hypochlorite de sodium. En outre, l'application d'herbicides (pour éliminer les adventices-hôtes de la bactérie) et de nématicides, peut avoir une efficacité significative (Jatala *et al.*, 1975; Jackson & Gonzalez, 1981; Hébert, 1985; Machmud, 1993; Weingartner *et al.*, 1993; Tusiime *et al.*, 1998).

#### I.1.3.4. La lutte biologique

La lutte biologique repose sur l'utilisation de bactéries antagonistes de *R. solanacearum* ou de souches avirulentes de *R. solanacearum* (naturelles ou construites génétiquement).

Ainsi des souches de *P. fluorescens*, *P. gladioli*, *P. glumae*, *B. cepacia*, *Bacillus sp.*, *Erwinia sp.* ont été décrites comme capables d'inhiber la croissance de *R. solanacearum* et donc de réduire l'incidence du flétrissement bactérien (Aspiras & Cruz, 1986; Hartman *et al.*, 1993; Shekhawat *et al.*, 1993; Sunaina *et al.*, 1997). Néanmoins, ces souches n'ont pas forcément une bonne capacité de colonisation de la rhizosphère et d'adaptation à la même niche écologique que *R. solanacearum*. En revanche, la plupart des mutants non pathogènes de *R. solanacearum* présentent ces aptitudes (Cook, 1985). Les mutants spontanés (mutants PC pour Phenotypic Conversion) peuvent agir par antibiose contre les souches de *R. solanacearum* ou en induisant une résistance de la plante mais là encore une faible capacité de colonisation est fréquemment observée (McLaughlin & Sequeira, 1988; McLaughlin *et al.*, 1990). Certains mutants avirulents construits génétiquement (*hrp-*) peuvent montrer une bonne aptitude à la colonisation du système racinaire et vasculaire de la plante associé à une bonne protection de la plante contre une surinfection par une souche sauvage virulente (Trigalet & Demery, 1986; Trigalet & Trigalet-Demery, 1990; Frey *et al.*, 1994; Etchebar *et al.*, 1998). La colonisation de la plante, de même que la résistance induite, sont des facteurs clés pour la protection (Trigalet *et al.*, 1998).

L'efficacité de la lutte biologique semble être réelle en conditions contrôlées mais est encore largement mise en échec en conditions naturelles.

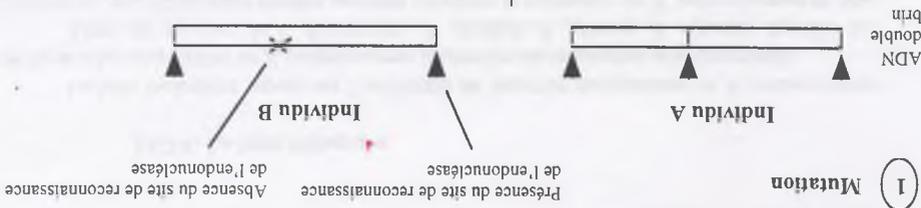
## I.2. Analyse de la diversité génétique des bactéries phytopathogènes

La diversité est un fait communément observé dans le monde vivant, y compris chez les agents phytopathogènes. La connaissance de cette diversité est à la base du développement d'une stratégie de lutte adaptée, intégrant notamment la sélection et le déploiement de variétés résistantes, et la mise au point d'outils de diagnostic performants.

La diversité des bactéries phytopathogènes a, pendant longtemps, été estimée sur la base du pouvoir pathogène, de critères physiologiques et biochimiques, de profils d'utilisation de sources de carbone, de résistance aux antibiotiques ou à des bactériophages, de profils d'acides gras, de profils de protéines ou d'iso-enzymes, de caractéristiques sérologiques,... Actuellement, les méthodes analysant la variabilité du génome sont de plus en plus développées et employées car elles présentent de nombreux avantages, notamment la capacité à fournir de nombreux marqueurs polymorphes (variables entre individus), discriminants (différenciant des individus très proches), indépendants du milieu (stables quelles que soient les conditions expérimentales), neutres ou liés à une fonction particulière, et reproductibles (d'une expérience à une autre).

Au sein du génome, différents phénomènes plus ou moins complexes sont responsables du polymorphisme : des mutations dues à un remplacement d'une ou plusieurs bases par d'autres sans changement dans la longueur de l'ADN, des insertions ou des délétions correspondant respectivement à l'ajout ou à la disparition de bases dans la séquence de l'ADN, des réarrangements génomiques dus à des séquences d'ADN transposables capables de s'insérer ou s'exciser de manière autonome à n'importe quel site dans le génome.

1 Mutation



Migration sur gel des produits de restriction, transfert sur membrane et hybridation avec une sonde



2 Réarrangement chromosomique



Migration sur gel des produits de restriction, transfert sur membrane et hybridation avec une sonde

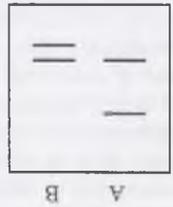


Figure 1-2. Principe de la révélation du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (d'après Tagu, 1999).

La comparaison des séquences nucléotidiques est la seule méthode exhaustive de recherche de polymorphisme dans un fragment d'ADN. Mais en dépit des progrès de l'automatisation du séquençage, l'utilisation en routine de cette technique reste peu développée car elle est trop lourde à mettre en oeuvre surtout si l'on s'intéresse à un grand nombre de loci. Le recours à des méthodes indirectes, non exhaustives mais beaucoup plus rapides est donc le plus souvent pratiqué. Ces méthodes sont fondées principalement sur la détection de différences de sites de restriction et/ou de sites d'hybridation d'amorces oligonucléotidiques. Elles visent à révéler du polymorphisme au sein ou au voisinage d'une séquence ciblée du génome, répétée ou non, ou bien sur l'ensemble du génome.

## 1.2.1. Méthodes d'analyse fréquemment utilisées

### 1.2.1.1. La RFLP

La technique RFLP (pour Restriction Fragment Length Polymorphism) implique de digérer l'ADN total bactérien par une ou plusieurs enzymes de restriction puis de séparer les fragments résultants par électrophorèse. Les fragments sont ensuite transférés et fixés sur une membrane de nylon et une hybridation est réalisée avec une sonde marquée afin de mettre en évidence les fragments possédant une homologie de séquence avec l'ADN sonde. La comparaison des profils d'hybridation constitue donc un moyen de déterminer l'existence ou non d'un polymorphisme (figure I-2).

La technique RFLP est très employée même si elle se révèle lourde à mettre en oeuvre. L'utilisation de plusieurs combinaisons sondes/enzymes peut permettre d'étudier le polymorphisme sur une partie importante du génome, dans des régions codantes ou non codantes selon l'origine de la sonde. Ces sondes correspondent soit à des séquences uniques soit à des séquences répétées du génome.

Parmi les séquences uniques, les gènes *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) impliqués dans le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes ont été utilisés. Les travaux effectués sur plusieurs espèces de *Xanthomonas* et sur *P. syringae* ont montré que la structure de ces gènes est bien conservée chez un même pathovar (Legard *et al.*, 1993; Leite *et al.*, 1994a; Scholz *et al.*, 1994; Gagnevin *et al.*, 1997). L'étude de ces gènes a permis de scinder l'espèce *R. solanacearum* en deux divisions corrélées à l'origine géographique des souches et révélée de la diversité au sein des biovars et races de cette espèce (Cook *et al.*, 1989). Les gènes impliqués dans la synthèse du tryptophane, d'exopolysaccharides, ou de la  $\beta$ -glucosidase ont aussi été utilisés afin de compléter les données obtenues par d'autres sondes (Cook *et al.*, 1989; Hendson *et al.*, 1992).

Parmi les séquences répétées, les ADN ribosomiques sont très souvent utilisés. Les ADN<sub>r</sub> sont présents au sein du génome organisés en opérons (*rrn*) (figure I-3) dont le nombre varie d'un micro-organisme à l'autre (entre 1 à 13 copies) (Barry *et al.*, 1990; Schmidt, 1998). Le fragment 16S de l'ADN<sub>r</sub> codé par le gène *rrs* est même devenu une région cible pour toutes analyses de relations phylogénétiques entre taxons, même éloignés, en raison de sa structure très conservée et de sa distribution universelle (Woese, 1987). Les ITS (pour Internal Transcribed Spacer) sont plus variables, car moins soumis à sélection, et révèlent fréquemment un polymorphisme au niveau infra-spécifique (Barry *et al.*, 1991). Le ribotypage a permis de mettre en évidence de la diversité au sein d'*E. chrysanthemi* corrélée à l'origine géographique (Nassar *et al.*, 1994) et au sein de plusieurs espèces de *Xanthomonas* (Bragard *et al.*, 1995) et de différencier par exemple les deux pathovars, *cassavae* et *manihotis*, de *X. axonopodis* pathogènes du manioc

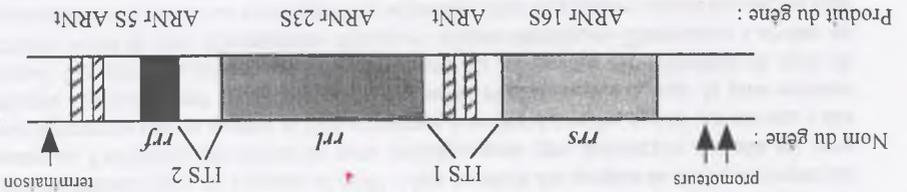


Figure I-3. Organisation des ADN<sup>r</sup> (gènes *rrn*) (d'après Schmidt, 1998).

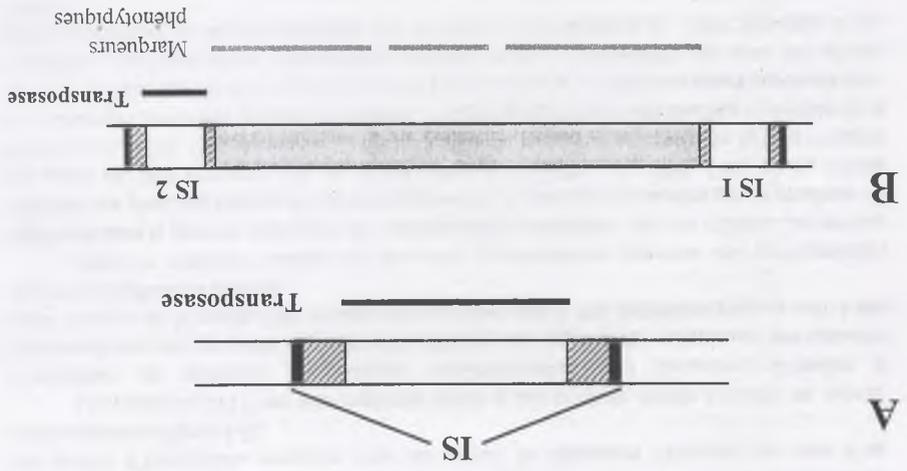


Figure I-4. Organisation d'une séquence d'insertion, IS, (A) et d'un transposon (B) (d'après Chandler, 1998).  
 A : schéma d'un IS montrant les séquences dupliquées (zones noires) et les séquences inversées et répétées (zones rayées) encadrant une région codante pour une transposase.  
 B : schéma d'un transposon composé de deux IS (IS 1 et IS 2) encadrant une région centrale codante pour plusieurs marqueurs phénotypiques. Ici seul l'IS 2 code pour une transposase.

(Verdier *et al.*, 1993; Verdier *et al.*, 1994). La variabilité existant dans cet opéron est aussi souvent exploitée dans un but d'identification ou de détection des bactéries phytopathogènes (Seal *et al.*, 1993; Li & De Boer, 1995; Maes *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998a; Wullings *et al.*, 1998; Boudazin *et al.*, 1999).

Les gènes *avr* (pour avirulence) sont moins répandus chez les bactéries et ils sont généralement présents en plusieurs copies dans le génome. Le gène *avrXa10* a permis de révéler du polymorphisme au sein de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Adhikari *et al.*, 1995) et de *X. pv. mangiferaeindicae* (Gagnevin *et al.*, 1997), corrélié à l'origine géographique et parfois à l'hôte. Le gène *pthB* de la famille des gènes *avr-pth* a révélé une grande variabilité chez *X. axonopodis* pv. *manihotis* corréliée à l'origine géographique des isolats (Restrepo & Verdier, 1997).

Les éléments mobiles, IS (pour Insertion Sequence) et transposons, considérés comme sélectivement neutres, peuvent être également une cible pour analyser la diversité génétique des bactéries. Le nombre de copies d'IS dans un génome est très variable (de une à plusieurs centaines) de même que leur taille (de 768 pb à 7,1 kpb, mais généralement entre 1 et 1,5 kpb) (Chandler, 1998). Les IS (figure I-4), situés au niveau du chromosome ou de plasmides, sont caractérisés par des séquences répétées inversées à leurs extrémités (de 9 à 41 pb) encadrant une région comprenant un ou plusieurs gènes codant pour une transposase qui est à l'origine du caractère mobile de ces éléments. Par ailleurs, une duplication de la séquence cible d'insertion (moins de 10 pb) est fréquemment observée. Les transposons sont des plus grandes séquences constituées ou non de deux IS similaires voire identiques encadrant une région portant un ou plusieurs gènes impliqués généralement dans la résistance aux antibiotiques (Chandler, 1998). Les IS ont été mis en évidence chez les bactéries phytopathogènes du genre *Pseudomonas* (Hanekamp *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1998; Hasebe *et al.*, 1998), ou *Agrobacterium* (Simon *et al.*, 1991), chez *R. solanacearum* (Thoquet & Trigalet, 2000) mais leur utilisation pour des analyses de diversité n'a été effectuée que pour les *Xanthomonas* : *X. oryzae* pv. *oryzae* (Nelson *et al.*, 1994; Adhikari *et al.*, 1995; Ardales *et al.*, 1996; Vera Cruz *et al.*, 1996; George *et al.*, 1997), *X. pv. mangiferaeindicae* (Gagnevin *et al.*, 1997), *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Berthier *et al.*, 1994). Cette diversité, souvent corréliée à l'origine géographique et à l'hôte, peut-être exploitée à des fins d'identification et d'épidémiologie (Berthier *et al.*, 1994; Ardales *et al.*, 1996; Vera Cruz *et al.*, 1996) notamment par la synthèse d'amorces PCR spécifiques d'IS permettant l'amplification des régions localisées entre deux IS (technique IS-PCR) (George *et al.*, 1997). Une variante de l'IS-PCR, la LMPCR (pour Ligase-Mediated PCR), reposant sur la digestion de l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction entre deux IS puis sur l'amplification des séquences flanquant des IS grâce à la ligature d'adaptateurs spécifiques, a permis de révéler l'existence de migrations régionales des souches de *X. oryzae* pv. *oryzae* (George *et al.*, 1997).

Il existe une variante de la technique RFLP, la PCR-RFLP, qui consiste à digérer un fragment amplifié par PCR à l'aide d'une ou plusieurs enzymes de restriction. Cette technique révèle plus ou moins de polymorphisme (au niveau de l'espèce ou au niveau du pathovar ou du biovar) selon la région amplifiée (*hrp*, ADNr 16S, ITS, IS, gène codant pour une polygalacturonase) (Gillings *et al.*, 1993; Leite *et al.*, 1994b; Nesme *et al.*, 1995a; Ito *et al.*, 1996; George *et al.*, 1997; Manceau & Horvais, 1997; Tsuchiya & Horita, 1998).

### I.2.1.2. La RAPD

Basée sur le principe de la PCR, la technique RAPD (pour Random Amplified Polymorphic DNA) consiste à amplifier, de manière aléatoire sur l'ensemble du génome, l'ADN à l'aide d'amorces courtes (environ 10 pb) dans des conditions souvent peu stringentes (hybridation à basse température) (Williams *et al.*, 1990). Une seule amorce permet l'amplification de plusieurs fragments (dépassant rarement la dizaine) d'ADN. L'utilisation de plusieurs amorces permet la plupart du temps de détecter un grand nombre de marqueurs polymorphes neutres.

La RAPD est une technique simple, rapide, ne nécessitant pas d'analyse préalable du génome, mais présente une grande sensibilité aux conditions expérimentales. Dès lors, seules des conditions de préparation des échantillons et des cycles PCR bien optimisés peuvent assurer l'obtention de profils reproductibles (Meunier & Grimont, 1993).

La RAPD a permis de mettre en évidence une diversité infra-spécifique chez *X. albilineans* (Permaul *et al.*, 1996) et *X. fragariae* (Pooler *et al.*, 1996), de différencier les sous-espèces *atroseptica* et *carotovora* de *E. carotovora* (Parent *et al.*, 1996), de discriminer les pathovars *maculicola* et *tomato* de *P. syringae* (Clerc *et al.*, 1998). La RAPD a été utilisée pour estimer la diversité existant au sein des populations de *R. solanacearum* présentes dans une zone géographique restreinte à des fins épidémiologiques (Ito *et al.*, 1996; Jaunet & Wang, 1998; Jaunet & Wang, 1999) et les relations génétiques entre souches de *R. solanacearum* inféodées à *Musa* sp. (Thwaites *et al.*, 1999).

### I.2.1.3. La rep-PCR

La méthode rep-PCR repose sur l'utilisation de petites séquences répétées dans le génome bactérien, les éléments REP (pour Repetitive Extragenic Palindromic, 35-40 pb) ERIC (pour Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, 124-127 pb) et BOX (composés des sous-unités boxA, 59 pb; boxB, 45 pb et boxC, 50 pb) (Versalovic *et al.*, 1991; Versalovic & Lupski, 1998; Versalovic *et al.*, 1994). Les éléments REP et ERIC, situés en positions intergéniques, auraient un rôle dans la régulation et la stabilité des ARN messagers, les éléments BOX sont moins connus. Des amorces correspondant aux extrémités de ces séquences répétées sont utilisées afin d'amplifier par PCR les fragments situés entre ces séquences répétées, dans la limite d'une distance compatible avec les capacités d'amplification par PCR (5 kpb environ). Le polymorphisme est principalement dû à une différence de localisation des séquences REP, ERIC et BOX (Versalovic & Lupski, 1998).

La rep-PCR est fréquemment citée comme une méthode reproductible, discriminante surtout par l'utilisation des éléments REP et ERIC; les éléments BOX étant plus conservés, utilisable à des fins d'identification et d'épidémiologie, et permettant une bonne estimation des distances génétiques entre diverses unités taxonomiques (Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1995; De Bruijn *et al.*, 1996; Pooler *et al.*, 1996; Vera Cruz *et al.*, 1996; Darrasse *et al.*, 1998; Horita & Tsuchiya, 1998; Louws *et al.*, 1998). Plusieurs espèces ou pathovars des genres *Pseudomonas* et *Xanthomonas* ont pu être différenciés sur la base des profils générés par la rep-PCR (Louws *et al.*, 1994). Au niveau d'un pathovar, la diversité est plus ou moins grande (Louws *et al.*, 1995; Vera Cruz *et al.*, 1996). Cette technique s'est également avérée très utile pour estimer la diversité des souches de *R. solanacearum* présentes au Kenya (Smith *et al.*,

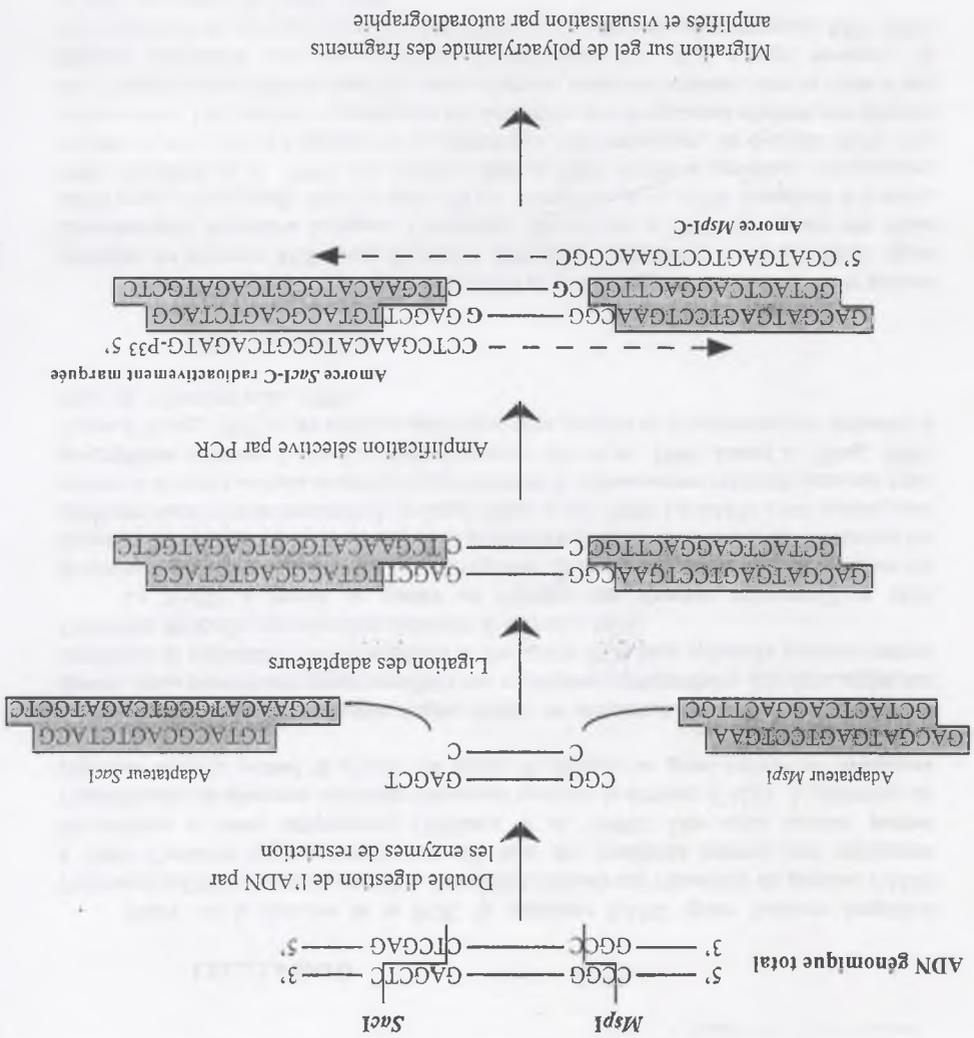


Figure 1-5. Principe de la technique AFLP avec la combinaison *MspI*-C / *SacI*-C.

1995), en Guadeloupe et Martinique (Frey *et al.*, 1996), au Japon (Tsuchiya & Horita, 1998), à Taïwan (Jaunet & Wang, 1999); cependant pour les souches européennes, son intérêt est plus limité (Van der Wolf *et al.*, 1998).

#### I.2.1.4. La RC-PFGE

La RC-PFGE (pour Rare Cutting-Pulsed Field Gel Electrophoresis) consiste à digérer l'ADN total à l'aide d'une ou plusieurs endonucléases à site de coupure rare (6 à 8 pb), les fragments générés étant ensuite séparés par une électrophorèse en champs pulsés. Cette électrophorèse permet d'observer des fragments d'ADN (généralement entre 5 et 40) dont la taille varie de 1 à 10000 kpb alors qu'une électrophorèse classique en gel d'agarose (champ électrique constant) permet la séparation de fragment de 100 pb à 50 kpb.

Des enzymes à site de coupure fréquent ont aussi été utilisés mais le niveau de discrimination apparaît souvent plus faible que celui obtenu avec des enzymes à site de coupure rare (Gillings & Fahy, 1993b; Smith *et al.*, 1995). La RC-PFGE s'est avérée la technique la plus discriminante lors d'analyses de diversité effectuées sur les populations de *R. solanacearum* (Smith *et al.*, 1995; Frey *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998), de *Xanthomonas* (Egel *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1997) et de *Pseudomonas* (Rainey *et al.*, 1994). Même si cette technique est très performante pour l'analyse de la diversité elle reste peu employée pour cet objectif car elle se révèle lourde à mettre en oeuvre par rapport aux autres techniques, la rendant difficilement applicable aux études épidémiologiques; de plus elle nécessite des conditions expérimentales bien standardisées (Römling *et al.*, 1998).

#### I.2.1.5. L'AFLP

La technique AFLP (pour Amplified Fragment Length Polymorphism) comprend plusieurs étapes (Vos *et al.*, 1995) (figure I-5) : (i) une digestion de l'ADN total par deux enzymes de restriction, l'une à site de reconnaissance rare et l'autre à site de reconnaissance fréquent, (ii) une ligature d'adaptateurs spécifiques aux extrémités des fragments de restriction générés, (iii) une amplification à l'aide d'amorces définies d'après la séquence des adaptateurs, ces amorces portant à leur extrémité 3' des extensions aléatoires de 1 à 3 bases permettant l'amplification sélective des fragments de restriction, (iv) une séparation des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le polymorphisme provient donc des sites de restriction et des sites d'hybridation des bases arbitraires.

L'AFLP est une technique de plus en plus utilisée en raison du nombre élevé de bandes polymorphes qu'elle fournit, d'une bonne reproductibilité et d'un fort degré de résolution. Les bandes polymorphes peuvent être spécifiques d'espèce, de pathovar, de biovar, ou d'une origine géographique particulière, ce qui peut la rendre très utile pour des études épidémiologiques (Hermans *et al.*, 1995; Arias *et al.*, 1997; Aarts *et al.*, 1998; Blears *et al.*, 1998). L'utilisation de cette technique montre qu'elle est très discriminante car elle permet souvent de différencier des souches très proches non séparables par d'autres techniques. De plus, elle autorise une classification des souches similaires à celle obtenue par hybridation ADN/ADN ou par comparaison de séquence du fragment 16S de l'ADNr, ce qui en fait potentiellement une technique de choix pour des études de taxonomie (Janssen *et al.*, 1996). Il peut même être

envisagé que cette technique vienne à remplacer l'hybridation ADN/ADN, technique nettement plus lourde à mettre en oeuvre, pour définir les espèces bactériennes.

Cette méthode a été utilisée avec succès pour l'analyse de la diversité génomique au sein des *Xanthomonas* (Janssen *et al.*, 1996), des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre (Pilet *et al.*, 2000), de *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Restrepo *et al.*, 1999), de *Xylophilus ampelinus* (Henry *et al.*, 2000), de *P. syringae* (Clerc *et al.*, 1998), de *R. solanacearum* (cf. chapitre III.1.2.) et du biovar 2 de *R. solanacearum* (Van der Wolf *et al.*, 1998).

### I.2.2. Autres techniques

Les méthodes d'analyse de diversité génétique présentées ci-dessus sont celles qui sont les plus couramment utilisées dans les laboratoires. Néanmoins, d'autres techniques existent mais suscitent encore peu d'intérêt.

La DGGE ou TGGE (pour Denaturing ou Temperature Gradient Gel Electrophoresis) consistent à faire migrer des fragments d'ADN amplifiés par PCR, habituellement l'ADNr 16S, dans un gel de polyacrylamide selon un gradient linéaire d'urée/formamide ou de température. Les différences de séquence d'une base, entraînant des différences de stabilité (dénaturation) de l'ADN, peuvent être détectées par des différences de migration. Ces techniques peuvent permettre d'étudier la diversité microbienne dans des échantillons de sol ou de plante (Heuer & Smalla, 1997; Heuer *et al.*, 1997; Muyzer & Smalla, 1998; Heuer & Smalla, 1999). A partir des profils obtenus sur gel, la présence de bandes distinctes et intenses suggère la prédominance de certaines espèces microbiennes. Ces bandes peuvent ensuite être isolées, ré-amplifiées et caractérisées phylogénétiquement; il est aussi possible d'utiliser une sonde qui permettra l'identification spécifique d'un micro-organisme comme c'est le cas pour *Agrobacterium tumefaciens* (Muyzer & Smalla, 1998; Heuer & Smalla, 1999; Fromin *et al.*, 2000). Ces techniques sont, par exemple, employées dans le cadre d'études menées aux Pays-Bas sur *R. solanacearum* dans différents milieux naturels (sol, rhizosphère, systèmes aquatiques divers) (Trigalet, communication personnelle).

La HMA (pour Heteroduplex Mobility Assay) est basée sur le fait que les hétéro-duplex d'ADN ont une mobilité sur gel de polyacrylamide réduite proportionnellement à leur degré de divergence. Ainsi, l'étude des hétéro-duplex formés au niveau de régions amplifiées et variables de l'ADNr 16S décrites chez les *Pseudomonas* fluorescents, a permis de montrer un caractère discriminant de la HMA supérieur à celui observé par PCR-RFLP de la même région (Gardan *et al.*, 2000).

### I.2.3. Application des méthodes d'analyse de diversité génétique

Toutes les méthodes d'analyse de diversité génétique ont par conséquent pour objectif d'obtenir une empreinte génétique unique et caractéristique d'un individu ou d'un groupe d'individus issu d'une population. Elles sont très utilisées dans un but de taxonomie pour confirmer ou infirmer les conclusions issues d'autres méthodes de classification génétiques ou non. Leur capacité de discrimination souvent élevée autorise l'accès à une variabilité qui n'est généralement pas mise en évidence par les méthodes dites classiques. Elles peuvent ainsi permettre d'identifier des lignées clonales ou encore d'estimer les distances génétiques entre les différents individus ou populations d'un même taxon. Le fait de savoir que des populations éloignées géographiquement soient génétiquement homogènes ou hétérogènes est très important

car il est fréquemment observé que des populations génétiquement distinctes ont un pouvoir pathogène (virulence et/ou agressivité) différent. Ceci aura bien évidemment des répercussions en terme de stratégie de lutte particulièrement au niveau du choix variétal (Leung *et al.*, 1993; Milgroom & Fry, 1997). Ces techniques peuvent aussi rendre compte des migrations, naturelles ou induites par l'homme, de l'agent pathogène ou encore des échanges génétiques au sein ou entre populations, et ainsi permettre d'estimer l'évolution des populations au cours du temps dans une région géographique plus ou moins restreinte (au niveau de différents agro-écosystèmes ou au niveau parcellaire) (Sicard, 1996).

La diversité génétique existe aussi bien au niveau de régions du génome liées au pouvoir pathogène qu'au niveau de régions dites neutres. L'analyse de populations basée uniquement sur des marqueurs neutres, ce qui est le plus fréquemment effectué, peut se révéler insuffisante pour bien comprendre la structure des populations pathogènes (degré de diversité, relations génétiques entre individus, évolution dans le temps et l'espace de cette population (Leung *et al.*, 1993), surtout s'il n'y a pas de corrélation entre la diversité génétique et phénotypique (Jaunet & Wang, 1999). Les marqueurs neutres ne permettent pas en effet, à eux seuls, d'étudier l'influence de la pression de sélection. Le génotype de l'hôte, l'habitat naturel, les pratiques culturales sont présumés être des facteurs de sélection très importants (Leach *et al.*, 1995; Ardales *et al.*, 1996; Haubold & Rainey, 1996; Wise *et al.*, 1996; Di Cello *et al.*, 1997; Haubold & Rainey, 1997; Restrepo & Verdier, 1997). En comparant le polymorphisme neutre à celui observé pour des marqueurs sélectionnés, il est possible de discerner la part de la pression de sélection. Néanmoins, les marqueurs neutres peuvent être en association avec des gènes soumis à sélection ce qui peut rendre les interprétations difficiles (Sicard, 1996).

Jusqu'à présent, peu d'études effectuées sur les bactéries phytopathogènes ont été entreprises pour mettre en relation la diversité génétique observée et des données du pouvoir pathogène et encore moins des données d'ordre épidémiologique ou même des situations sur le terrain. L'exemple le plus remarquable, car de nombreux travaux ont été réalisés, est celui de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Nelson *et al.*, 1994; Adhikari *et al.*, 1995; Leach *et al.*, 1995; Ardales *et al.*, 1996; Vera Cruz *et al.*, 1996; George *et al.*, 1997). Quelques études concernent aussi *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Restrepo & Verdier, 1997; Restrepo *et al.*, 2000) *X. pv. mangiferaeindicae* (Gagnevin, 1998) et *R. solanacearum* (Darrasse *et al.*, 1998; Horita & Tsuchiya, 1998; Jaunet & Wang, 1998; Jaunet & Wang, 1999).

Enfin, ces méthodes peuvent servir directement ou indirectement pour le diagnostic (identification, détection) des bactéries phytopathogènes, ce qui est particulièrement intéressant car les méthodes moléculaires de diagnostic sont généralement les plus performantes.

### 1.3. L'identification et la détection des bactéries phytopathogènes

#### Introduction

La première étape du diagnostic d'une maladie consiste généralement en l'observation des symptômes déclarés sur la plante. Une analyse de laboratoire est ensuite indispensable pour déterminer l'agent responsable de ces symptômes car des agents phytopathogènes différents peuvent induire des symptômes similaires. La détection et l'identification des agents phytopathogènes permet ainsi d'établir ou de confirmer un diagnostic lorsque la maladie est déclarée, mais surtout de prévenir le développement de maladies en phase d'incubation (la

bactérie est présente mais ne s'exprime pas encore). Le succès de la lutte dépend par conséquent de la qualité des méthodes de détection et de leur capacité à mettre en évidence, de façon sûre et précoce, l'agent pathogène dans la plante infectée. Dans tous les cas, les méthodes de détection doivent répondre à cinq critères principaux (Tourte, 1993; Fox, 1998) :

- la sensibilité; il faut pouvoir détecter le pathogène même s'il est présent en faible quantité,
- la spécificité; il est nécessaire non seulement de détecter le pathogène mais également de le distinguer des bactéries saprophytes souvent abondantes,
- la rapidité d'exécution; il est important que le délai de réponse soit le plus court possible afin d'éviter soit l'introduction, soit la propagation de la maladie,
- la reproductibilité et la simplicité; le test doit être réalisable par toute personne possédant un minimum de technicité et le résultat indépendant du manipulateur,
- le coût; le test doit rester peu onéreux.

La détection des bactéries phytopathogènes implique tout d'abord un échantillonnage du milieu à analyser, une préparation de l'échantillon suivi d'une extraction des bactéries, puis requiert une méthode spécifique d'identification de la bactérie recherchée. De nombreuses méthodes d'identification sont utilisables et chacune a ses avantages et ses limites. Ces méthodes font appel aux caractéristiques biochimiques, pathologiques, sérologiques ou encore génétiques des agents phytopathogènes.

### **I.3.1. L'échantillonnage**

L'échantillonnage est un préalable nécessaire car il n'est pas envisageable d'effectuer des analyses sur l'ensemble d'un lot de plusieurs tonnes de semences par exemple ou sur l'ensemble des feuilles d'un arbre en raison notamment du caractère destructif de ces analyses. Il s'agit d'une étape essentielle qui ne doit donc en aucun cas être négligée. En effet, la probabilité de détecter une bactérie dans un milieu est en relation étroite avec l'échantillon analysé.

L'échantillonnage diffère selon que l'on considère la plante entière, un fragment de plante, le sol ou encore la semence. Il dépend également de la connaissance préalable de la variabilité de distribution de la bactérie recherchée dans le milieu. Si cette variabilité n'est pas connue, des études préliminaires sont à engager pour l'analyser et ainsi déterminer la taille d'un échantillon représentatif. Par exemple dans un sol, de telles études permettent de déterminer le nombre d'échantillons à collecter, leur taille, le lieu ainsi que la profondeur du prélèvement (Johnson & Curl, 1972). Dans le cas des semences, elles permettent de définir le nombre de prélèvements nécessaires ainsi que la quantité de graines à examiner. L'échantillonnage est, dans ce cas, très fréquemment pratiqué sous forme de cinq répétitions de 1000 graines (Van Vuurde *et al.*, 1983; Grondeau *et al.*, 1993).

### **I.3.2. La préparation de l'échantillon**

La préparation de l'échantillon est également une étape importante car elle peut conditionner le niveau de sensibilité voire la réussite de la détection. Comme l'échantillonnage, elle dépend du type de milieu à analyser mais aussi de la méthode d'identification à mettre en oeuvre (Roth, 1989). Par exemple pour le sol, elle peut consister en un tamisage et une mise en suspension dans de l'eau stérile ou dans un tampon spécifique (Johnson & Curl, 1972; Rudolph

*et al.*, 1990). Pour les organes des plantes, une désinfection superficielle à l'aide d'alcool ou d'hypochlorite de sodium visant à éliminer ou limiter la présence des bactéries saprophytes peut être effectuée. Il est même possible d'enflammer l'excès d'alcool quand il s'agit d'organes ligneux. En revanche, les limbes des feuilles ne doivent pas être désinfectés afin d'éviter la stérilisation des lésions (Kiraly *et al.*, 1970; Gardan & Luisetti, 1982; Rudolph *et al.*, 1990). Quant aux graines, elles peuvent être également désinfectées en surface à l'aide d'alcool ou d'hypochlorite de sodium si la bactérie recherchée se situe sous le tégument de la graine (Kiraly *et al.*, 1970; Roth, 1989).

### I.3.3. L'extraction des bactéries

La technique d'extraction des bactéries dépend là encore du type de milieu à analyser et du type d'outil d'identification à utiliser (Roth, 1989; Rudolph *et al.*, 1990). Dans le cas de sol, l'extraction consiste en une décantation associée ou non à une centrifugation légère; une série de dilutions est également fréquemment employée (Johnson & Curl, 1972). Pour les organes manifestant des symptômes, il convient tout d'abord de dilacérer finement les tissus infectés à l'aide d'un scalpel stérile ou de les broyer. Une macération plus ou moins prolongée est ensuite effectuée afin de permettre la diffusion des bactéries à partir des fragments fins de tissus (Gardan & Luisetti, 1982; Rudolph *et al.*, 1990; Fox, 1993). Quant à l'extraction des populations bactériennes épiphytes, il est recommandé d'effectuer un lavage et/ou un broyage des tissus sains (Luisetti & Paulin, 1972). L'extraction des bactéries des graines peut être réalisée par macération et/ou par broyage (Taylor, 1970; Tourte, 1993). Pour cette dernière technique, le liquide, la température, la durée de macération ainsi que les adjuvants sont variables (Van Vuurde *et al.*, 1983; Roth, 1989; Grondeau *et al.*, 1993).

### I.3.4. Les méthodes traditionnelles de détection

#### I.3.4.1. La culture sur milieu gélosé

La méthode consiste à cultiver les cellules bactériennes présentes dans le liquide d'extraction sur un milieu nutritif gélosé pour obtenir des colonies séparées.

Des dilutions de l'échantillon sont tout d'abord effectuées. Une aliquote de chaque dilution est alors déposée (plusieurs répétitions) à la surface d'un milieu gélosé contenu dans une boîte de Petri et étalée sur trois secteurs afin d'opérer une séparation des différents germes présents dans le liquide d'extraction et dont la concentration est inconnue. Le but est d'obtenir des colonies séparées, donc aisées à cloner (culture pure), dans le troisième secteur après une incubation entre 25 °C et 27 °C, température de croissance optimum pour la majorité des bactéries phytopathogènes (Gardan & Luisetti, 1982; Rudolph *et al.*, 1990; Fox, 1993). Cependant, pour parvenir à la certitude d'un clone pur, une ou plusieurs subcultures sont nécessaires. Le délai d'apparition des colonies caractéristiques sur le milieu de culture est en général compris entre 36 à 72 h mais il peut être de six à quatorze jours pour *X. albilineans*, *X. fragariae* ou *Xylophilus ampelinus* (Rudolph *et al.*, 1990).

Certains milieux gélosés, comme le milieu LPGa (pour Levure, Peptone, Glucose, Agar), sont utilisables pour isoler la plupart des bactéries phytopathogènes. D'autres, en revanche, sont plus spécifiques comme le milieu B de King (King *et al.*, 1954) pour les *Pseudomonas* fluorescents ou les milieux de Kelman (Kelman, 1954), Granada et Sequeira (Granada & Sequeira, 1983b) et SMSA (Engelbrecht, 1994) pour *R. solanacearum*.

Tableau I-6. Caractères d'orientation des grands groupes de bactéries phytopathogènes (d'après Gardan et Luisetti, 1982).

GRAM	UTILISATION DU GLUCOSE	MOBILITE FLAGELLES	FLUORESCENCE	REDUCTION DES NITRATES	OXYDASE	SENSIBILITE	HYPERSENSIBILITE	GENRE	GROUPE
+	-	-	-	-	-	+	+	<i>CONTROBACTERIUM</i>	* Groupe 1, 2, 3 du Bergey groupe 5 du Bergey (C. flac- cumfaciens et C. trifidum)
	+	+	+	+	+	-	-	<i>AGROBACTERIUM</i>	
		+	-	-	-	-	+	<i>XANTHOMONAS</i>	
-	Oxydactif		+	+	+	+	+	<i>PSEUDOMONAS</i>	1, 2 de Lilliac (Phycodho- logie) 3, 4 et 5 de Lilliac (Phyco- logie) et 6 (Phycodho- logie) et 7 (Phycodho- logie) non fluorescente (P. sola- naceum)
	Fermentactif		-	-	-	+	+	<i>ERWINIA</i>	<i>Ameliorata</i> <i>Herbicola</i> Carotovore (pectinolytique)

\* Les anciennes Corynebactéries ont été subdivisées en 3 genres : *Clavibacter* (1984), *Curtobacterium* (1986) et *Rhodococcus* (1986) (Gardan, communication personnelle).

L'avantage de la technique est qu'elle ne nécessite que le matériel courant de laboratoire de microbiologie, et de plus elle s'avère très sensible puisque sa limite de détection est estimée à  $10^2$  ufc (unité formant colonie)/mL (Tourte, 1993). Le nombre de répétitions est très important car il détermine la sensibilité de la méthode. Toutefois, cette technique n'est pleinement efficace que si les populations de la microflore saprophyte ne sont pas trop nombreuses (Rudolph *et al.*, 1990; Fox, 1993). C'est pourquoi la mise en culture de bactéries extraites de milieu très pollué, comme le sol, est souvent difficile. La mise au point de milieux sélectifs, favorisant la croissance des agents pathogènes recherchés au détriment de celle des saprophytes, peut pallier à cet inconvénient. La sélection s'effectue par l'introduction dans le milieu de sources de carbone et/ou d'azote spécifiques, d'antibiotiques ou encore de colorants (Rudolph *et al.*, 1990). Néanmoins pour ces milieux, se pose le problème de la sélectivité (nombre ou proportion des souches de l'espèce et hors de l'espèce poussant sur le milieu) (Luisetti, communication personnelle).

#### 1.3.4.2. La caractérisation, les profils biochimiques

Les méthodes classiques d'identification des bactéries phytopathogènes isolées en culture pure font appel aux caractéristiques culturelles, cytologiques et biochimiques des populations bactériennes. L'identification peut se faire au niveau genre, espèce, pathovar, biovar,...

Pour orienter le diagnostic, on s'intéresse aux caractères cultureux (couleur, forme des colonies, vitesse de croissance), aux caractères morphologiques et cytologiques (coloration de Gram, étude de la mobilité, localisation des flagelles) ainsi qu'à diverses caractéristiques bactériologiques (type métabolique, production de pigments fluorescents, pouvoir pathogène, présence d'une nitrate réductase, d'une cytochrome c oxydase) (Kiraly *et al.*, 1970; Gardan & Luisetti, 1982; Hayward, 1990; Rudolph *et al.*, 1990). Ces caractères d'orientation permettent l'identification des bactéries au niveau du genre (tableau I-6). Cette identification peut également s'effectuer à l'aide du système BACTID qui propose une série de tests présentés sous forme de kit.

Pour aboutir au diagnostic d'espèce, de pathovar ou de biovar, une caractérisation complémentaire est requise. De multiples tests biochimiques ou nutritionnels (assimilation de différentes sources de carbone, production d'enzymes) sont utilisables. Les tests miniaturisés et standardisés de marque API® (tests en microtubes) ou BIOLOG® (tests en plaque de microtitration) sont très pratiques et très reproductibles (Fox, 1993). Ainsi le profil d'assimilation de 99 ou 95 substrats carbonés (plaques API ou BIOLOG) complété par des caractères variés (amylolyse, pectinolyse, cellulolyse, gélatinolyse, test tabac,...) constitue un moyen très complet et très rapide (réponse entre 24 et 48 heures) de caractériser une souche bactérienne (Black & Sweetmore, 1993). L'utilisation d'une bibliothèque de souches de référence permet, en théorie, une identification efficace (logiciels disponibles). En utilisant le système BIOLOG®, 96 % des souches de *Pseudomonas* phytopathogènes (dont des souches de *R. solanacearum*) (Li & Hayward, 1993) et 92 % des souches de *R. solanacearum* (Black & Sweetmore, 1993) ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce; en revanche, l'identification au niveau du biovar est beaucoup plus incertaine.

Cependant, on se limite en général à comparer la souche à identifier à (aux) la souche(s) de référence sur un nombre plus restreint de caractères, qui se sont révélés assez stables pour l'entité concernée. Ainsi, environ vingt caractères sont sélectionnés et mis en oeuvre, en routine, pour identifier la plupart des bactéries phytopathogènes (espèce ou pathovar). Le tableau I-7 présente comment sont identifiés les *Pseudomonas* fluorescents. Quant au tableau I-8, il illustre les caractères distinctifs de différents pathovars de l'espèce *P. syringae*.



### I.3.4.3. Le pouvoir pathogène

Ce test biologique consiste à inoculer une culture bactérienne à la plante-hôte dans le but de reproduire les symptômes typiques de la maladie. Il s'agit d'une étape incontournable du principe de Koch. L'exploration du pouvoir pathogène se révèle très utile pour différencier des bactéries qui ont des caractéristiques biochimiques identiques : par exemple les pathovars *pisi* et *syringae* de l'espèce *P. syringae* (Grondeau, 1992), ou *A. tumefaciens* et *A. radiobacter* (Gardan & Luisetti, 1982). Il permet également l'identification des différentes espèces ou pathovars de *Xanthomonas* (Moffett & Croft, 1983).

L'expression du pouvoir pathogène requiert des conditions bien précises qui, faute d'être correctement remplies, entraînent un résultat négatif et par conséquent une difficulté d'identification. Il faut (i) avoir une plante sensible au stade sensible, (ii) posséder un inoculum suffisant à la fois en quantité et en qualité, (iii) connaître les meilleures voies d'inoculation (naturelles ou artificielles), (iv) savoir quelles sont les conditions environnementales les plus favorables à l'apparition et au développement des symptômes (Klement *et al.*, 1990).

Pour reproduire avec succès les symptômes caractéristiques d'une maladie, la dose d'inoculum recommandée est généralement de l'ordre de  $10^7$  à  $10^8$  ufc/mL. Selon l'agent pathogène, l'inoculation peut se réaliser par pulvérisation à la surface de la plante, trempage des racines (*R. solanacearum*; Nicole, 1995), injection au niveau de la tige,... (Klement *et al.*, 1990).

La reproduction des symptômes qui demande entre cinq et quinze jours en général pour les bactérioses des cultures légumières et florales nécessite en revanche plusieurs mois pour les maladies des arbres fruitiers (Gardan & Luisetti, 1982).

Il s'avère que l'épreuve du pouvoir pathogène est une méthode lourde (infection de plusieurs plantes pour un même échantillon), longue (comparée à d'autres méthodes d'identification) et onéreuse (entretien de serre, de chambre climatique ou encore de phytotron). L'ensemble de ces conditions fait que ce test sert souvent à confirmer une identification présomptive.

### I.3.5. Autres méthodes

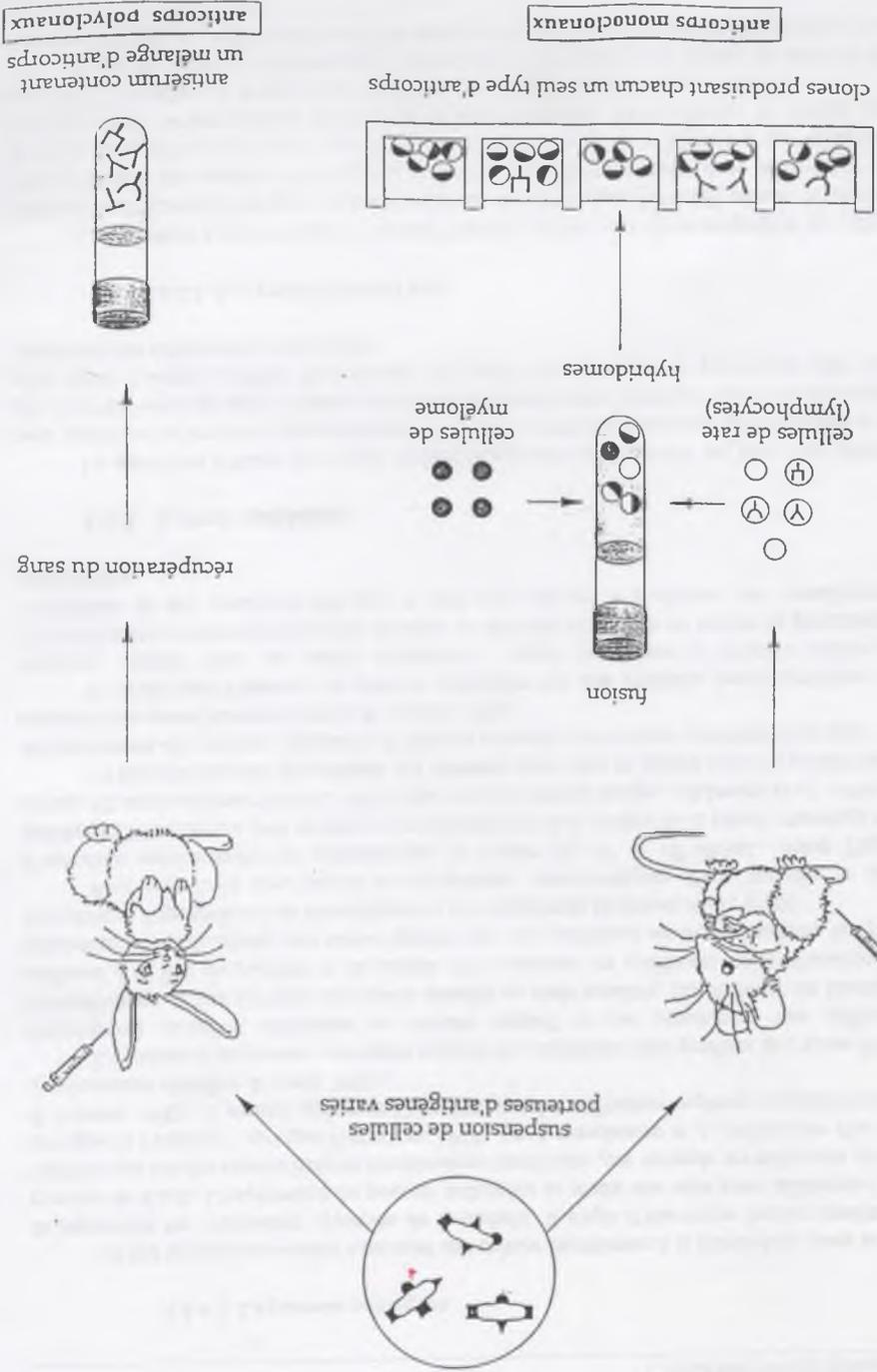
La spécificité d'hôtes de certains bactériophages est une propriété qui peut être utilisée pour identifier les bactéries phytopathogènes. Toutefois, cette propriété reste peu exploitée et le plus souvent vient en appui d'autres méthodes d'identification, autorisant ainsi un diagnostic plus fiable (Civerolo, 1990). En revanche, les profils d'acides gras et protéiques sont des méthodes plus fréquemment employées.

#### I.3.5.1. Les profils d'acides gras

La technique a pour principe d'extraire puis de séparer par chromatographie en phase gazeuse les différents acides gras des bactéries issues de culture pure. Le profil obtenu de chaque bactérie étudiée est comparé avec le profil de souches de référence stocké dans une banque de données. La conclusion est alors fournie sous forme de probabilité d'identité à une référence. Pour permettre la comparaison des profils, la standardisation des conditions de culture des bactéries, d'extraction et de séparation des acides gras est nécessaire (Sasser, 1990).

C'est une méthode de choix pour l'identification des bactéries au niveau du genre et de l'espèce (Stead *et al.*, 1997), mais au niveau infra-spécifique l'identification est plus aléatoire. Au

Figure I-6. Principe d'obtention et différence entre anticorps monoclonaux et polyclonaux (d'après Malandrin, 1995).



sein de *Xanthomonas*, quatre groupes de pathovars ont été définis mais aucun profil spécifique d'un pathovar n'a été obtenu (Stead, 1989). Il en est de même de l'espèce *P. syringae* puisque aucun profil spécifique d'un pathovar n'a été observé (Stead, 1988). Cette méthode a permis de distinguer quatre groupes au sein de *R. solanacearum* dont trois correspondent bien aux races 1, 2 et 3 de cette espèce (Janse, 1991).

### 1.3.5.2. Les profils protéiques

Cette technique consiste à extraire les protéines d'une culture bactérienne puis à les séparer selon leur masse en effectuant une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes, c'est à dire en présence de sodium dodécyl sulfate. Le profil protéique obtenu est comparé aux profils de souches de référence archivés dans une bibliothèque permettant ainsi l'identification. Une standardisation est là aussi requise pour une bonne reproductibilité des résultats (Kersters, 1990; Stead *et al.*, 1997).

Comme les profils d'acides gras, les profils protéiques permettent une identification au niveau du genre et de l'espèce, mais au niveau infra-spécifique l'identification est plus incertaine. Parmi 27 pathovars de différentes espèces de *Xanthomonas*, seulement six ont pu être clairement différenciés (Vauterin *et al.*, 1991). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* ont bien été identifiées (Li & Hayward, 1994) et la variabilité des profils protéiques observée chez *R. solanacearum* a été corrélée au biovar des souches (Dristig & Dianese, 1990; Dianese & Dristig, 1994; Li & Hayward, 1994).

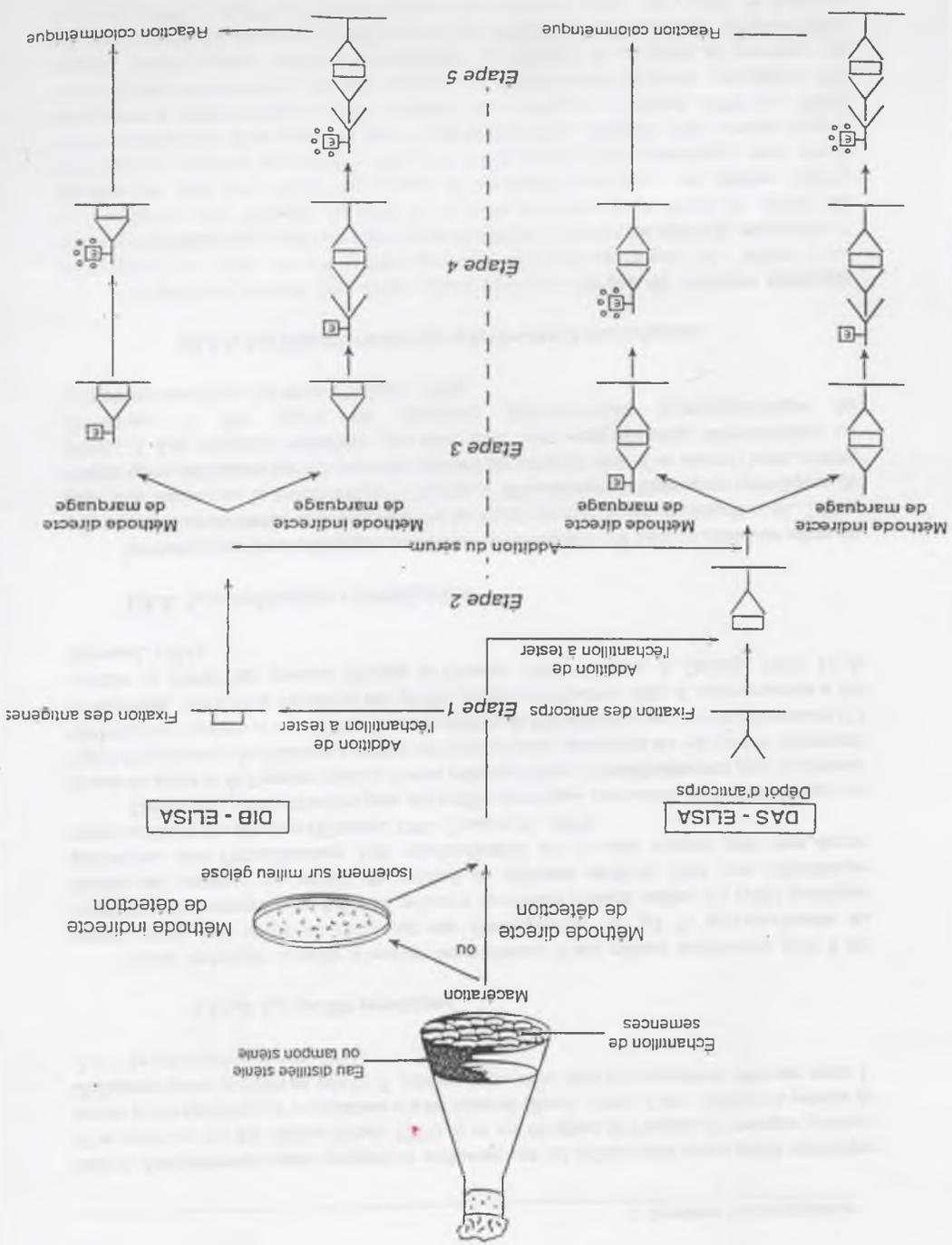
### 1.3.6. Les méthodes sérologiques

Les techniques immunologiques sont parmi les techniques les plus couramment mises en oeuvre pour l'identification et la détection des bactéries phytopathogènes (Schaad *et al.*, 1990). Elles sont basées sur la reconnaissance d'épitopes (déterminants antigéniques spécifiques de chaque agent pathogène) par des anticorps obtenus par immunisation d'un animal (lapin, souris, chèvre,...). Les antigènes bactériens pris pour cible sont extracellulaires, intracellulaires ou structuraux et leur nature est protéique, glycoprotéique, polysaccharidique ou lipopolysaccharidique (De Boer & Schaad, 1990).

#### 1.3.6.1. Les réactifs : anticorps polyclonaux et monoclonaux

Les anticorps peuvent être dirigés contre plusieurs épitopes de l'antigène (anticorps polyclonaux) ou contre un seul épitope (anticorps monoclonaux) (figure I-6). Même si les sérums polyclonaux sont encore les plus largement utilisés, le recours aux anticorps monoclonaux est de plus en plus fréquent. En effet, les hybridomes (issus de la fusion de cellules de lymphocytes avec des cellules cancéreuses de myélome) produisant ces derniers offrent l'avantage de constituer une source constante et uniforme d'anticorps spécifiques, alors que la réponse immunitaire d'un animal, et donc la qualité des sérums produits, varie souvent dans le temps pour un même individu et d'un individu à l'autre (Bertheau & Tempé, 1990; Fox, 1998). Les anticorps monoclonaux peuvent permettre la différenciation d'agents pathogènes très proches sérologiquement mais ils ne permettent pas toujours de résoudre le problème des réactions croisées fréquemment observées quand des anticorps polyclonaux sont utilisés (Miller & Martin, 1988; Schaad *et al.*, 1990). De plus, leur grande spécificité est parfois un handicap

Figure I-7. Méthode de détection ELISA à partir d'un macérat de graines, description des variantes DAS et DIB (d'après Blancho, 1994).



pour l'identification de plusieurs souches au sein d'un taxon variable, et l'utilisation conjointe de plusieurs anticorps monoclonaux est alors une solution (Schaad *et al.*, 1990). Enfin, la technique d'obtention des anticorps monoclonaux s'avère relativement sophistiquée, coûteuse et inductrice d'une dépendance vis-à-vis des fournisseurs, plus grande qu'avec les anticorps polyclonaux (Bertheau & Tempé, 1990; Schaad *et al.*, 1990).

Le problème majeur des réactions immunologiques demeure le manque de spécificité des réactifs employés. Pour la détection de *R. solanacearum*, les anticorps polyclonaux restent les plus couramment utilisés même si des réactions croisées sont observées (Janse, 1988; Caruso *et al.*, 1998). Les anticorps monoclonaux obtenus assurent généralement une meilleure spécificité (au niveau de l'espèce ou au niveau intra-spécifique, biovar/race) mais il peuvent aussi réduire la sensibilité (Robinson, 1993; Seal & Elphinstone, 1994; Robinson-Smith *et al.*, 1995; Elphinstone *et al.*, 1996; Griep *et al.*, 1998a; Griep *et al.*, 1998b).

### I.3.6.2. Les techniques

De nombreuses techniques sérologiques existent. Certaines, comme l'agglutination et la double immunodiffusion, sont utilisables mais préférentiellement après isolement sur milieu gélosé. Bien que ces techniques soient simples et rapides à mettre en oeuvre, elles restent peu employées en raison de leur très faible sensibilité et servent le plus souvent à confirmer un diagnostic (Fox, 1993; Fox, 1998). En revanche, les techniques d'immunomarquage, comme l'ELISA (pour Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et l'immunofluorescence, sont très largement utilisées dans les laboratoires car elles permettent la détection des bactéries phytopathogènes directement à partir de leurs milieux d'origine sans passage par la culture pure. Le marquage (enzymatique, fluorescent ou radioactif, ce dernier restant peu employé) des anticorps a largement contribué, par la possibilité de visualisation et par le gain de sensibilité, à l'exploitation de ces techniques en routine (Lemattre *et al.*, 1991).

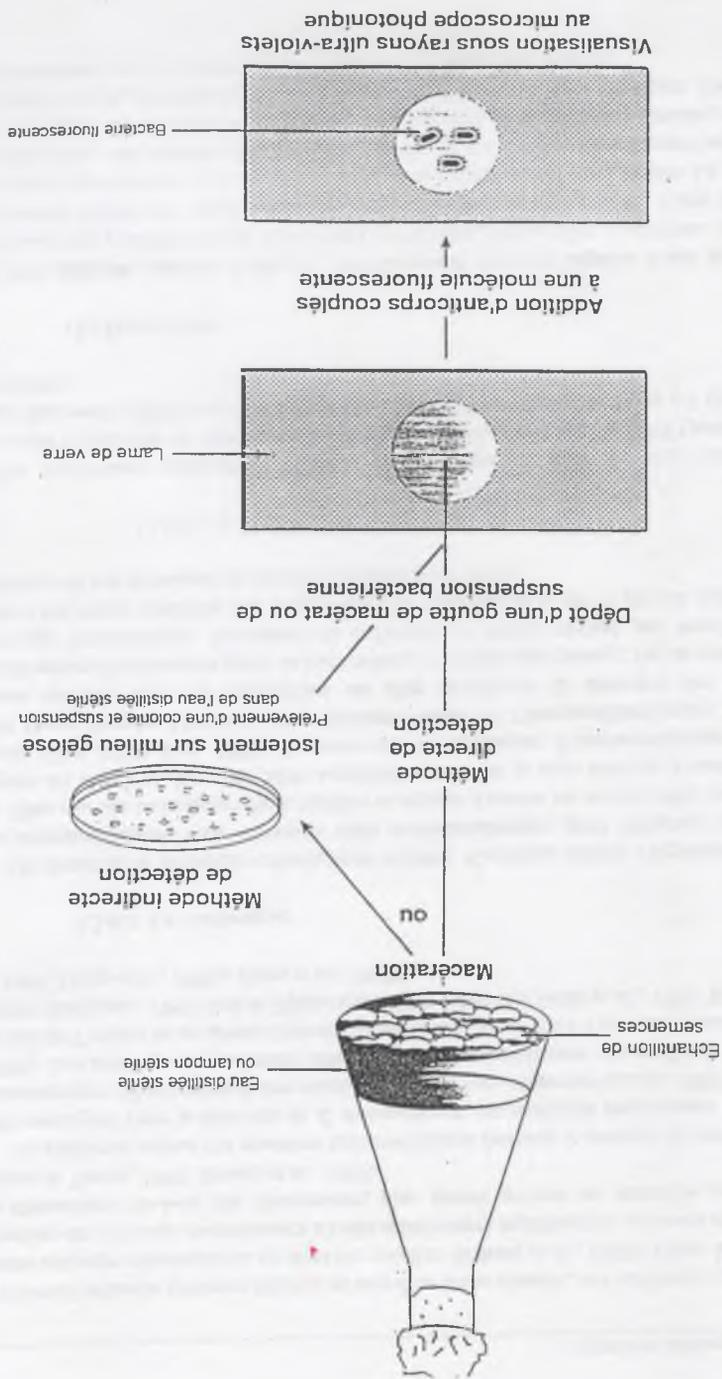
#### 1.3.6.2.1. L'ELISA

De nombreuses variantes de l'ELISA ont été proposées mais les plus couramment utilisées pour la détection en routine des bactéries phytopathogènes sont le DAS (pour Double Antibody Sandwich) -ELISA et le DIB (pour Dot ImmunoBlot) -ELISA; la figure I-7 illustre ces deux variantes.

##### • Le DAS-ELISA

Cette méthode consiste à déposer successivement dans les cupules d'une plaque de microtitration une première couche d'anticorps spécifiques, l'échantillon à analyser puis une seconde couche d'anticorps spécifiques. Des anticorps anti-anticorps couplés à une enzyme, généralement la phosphatase alcaline, puis le substrat de l'enzyme sont alors ajoutés. Le substrat étant chromogène, une réaction colorimétrique s'opère et est évaluée visuellement ou lue au spectrophotomètre. La réaction est quantifiable car l'intensité de la coloration obtenue, mesurée par la densité optique, est proportionnelle à la quantité d'anticorps liée à l'antigène. Il est ainsi possible de mesurer la concentration du pathogène dans l'échantillon analysé.

Figure 1-8. Méthode de détection par immunofluorescence à partir d'un macérat de graines (d'après Blanco, 1994).



## • Le DIB-ELISA

Ce test est identique au précédent sauf qu'il n'y a pas de dépôt d'une première couche d'anticorps. Les antigènes bactériens sont adsorbés directement sur le support et ne sont donc pas pris en sandwich entre deux couches d'anticorps.

La technique ELISA offre de nombreux avantages comme la quantité d'échantillons analysables simultanément, la reproductibilité, le faible coût, le délai d'obtention des résultats (3 à 24 h) et la possibilité de quantifier l'inoculum (Miller & Martin, 1988; Schaad *et al.*, 1990; Seal & Elphinstone, 1994). Ces avantages font de l'ELISA une technique de choix pour les pays en voie de développement notamment pour la détection de *R. solanacearum* (Robinson, 1993). Cependant, la sensibilité de l'ELISA n'est pas toujours très élevée, entre  $10^4$  et  $10^6$  ufc/mL (Schaad *et al.*, 1990; Seal, 1998a); elle peut toutefois être améliorée à l'aide du système avidine-biotine (Miller & Martin, 1988; Seal & Elphinstone, 1994). La détection à partir d'échantillons de sol se révèle souvent problématique mais elle peut être améliorée par l'addition d'adjuvants au tampon d'extraction (Robinson & Forde, 1994). Cette méthode rencontre également des problèmes de spécificité : des réactions croisées sont en effet fréquemment observées entre la bactérie recherchée et les bactéries proches sérologiquement entraînant l'apparition de faux résultats positifs; par exemple entre *R. solanacearum* et *R. pickettii*, *B. cepacia*, *P. syzygii* et le BDB (Janse, 1988; Robinson, 1993; Seal, 1998a). De même, la différenciation entre les pathovars de *P. syringae* est difficile (Samson & Saunier, 1987). Un résultat positif nécessite donc d'être confirmé par un test de pouvoir pathogène, une PCR, ou un autre test (Seal, 1998a). L'utilisation, comme support de la réaction antigène-anticorps, de membrane de nitrocellulose ou de nylon au lieu de plaque de microtitration tend à se développer car elle présente plusieurs avantages : plus grande simplicité, rapidité, faible coût et une sensibilité équivalente (Lemattre *et al.*, 1991; Seal & Elphinstone, 1994). Ces immunobandelettes sont employées pour une détection directe au champ (Fox, 1998) et en particulier pour la détection des populations latentes de *R. solanacearum* dans les tubercules de pomme de terre (Seal & Elphinstone, 1994).

## 1.3.6.2.2. L'immunofluorescence (figure I-8)

Cette méthode a pour principe de mettre en contact l'échantillon à étudier (broyage, lavage, macérat) ou la colonie isolée sur milieu gélosé avec les anticorps couplés à une molécule fluorescente comme l'isothiocyanate de fluorescéine (Trigalet *et al.*, 1978). Le plus fréquemment, le couplage du marqueur est effectué avec un anticorps anti-anticorps. La présence de la bactérie recherchée est détectée en microscopie photonique par sa fluorescence sous lumière ultraviolette.

Les avantages de cette méthode sont sa rapidité, sa simplicité, son coût raisonnable et sa plus grande sensibilité par rapport à celle de l'ELISA (Van Vuurde *et al.*, 1983). En effet, le résultat est obtenu en 3 h et le seuil de détection est estimé entre  $10^2$  et  $10^4$  ufc/mL (Trigalet *et al.*, 1978; Van Vuurde *et al.*, 1983; Janse, 1988; Caruso *et al.*, 1998; Seal, 1998a). En outre, l'immunofluorescence donnerait moins de réactions non spécifiques que l'ELISA (Janse, 1988; Caruso *et al.*, 1998) mais elle présente l'inconvénient d'une lecture fastidieuse quand le nombre d'échantillons à analyser est important, et d'une interprétation parfois difficile du fait de fluorescences d'origine cellulaire (Miller & Martin, 1988; Lemattre *et al.*, 1991). Dans le cas de

*R. solanacearum*, il est recommandé d'effectuer un test de pouvoir pathogène (Janse, 1988; OEPP/EPPO, 1990) ou une PCR (Caruso *et al.*, 1998) pour confirmer un résultat positif en immunofluorescence. Il s'agit d'une technique très utilisée pour la sélection sanitaire vis-à-vis de nombreuses bactérioses affectant semences, tubercules et boutures (Schaad *et al.*, 1990).

### **I.3.7. Les méthodes basées sur les propriétés des acides nucléiques**

Face aux limites actuelles des autres méthodes de détection, la biologie moléculaire offre un moyen supplémentaire d'investigation non négligeable. Le principal intérêt de travailler directement sur le génome est de pouvoir se soustraire à l'influence des conditions environnementales.

La sensibilité, la spécificité, la fiabilité ainsi que la rapidité des techniques font de la biologie moléculaire un outil largement utilisé dans des domaines aussi divers que la phytopathologie, la médecine ou la microbiologie alimentaire (Miller & Martin, 1988; Barry *et al.*, 1990; Bej *et al.*, 1990; Bertheau & Tempé, 1990; Barry *et al.*, 1991; Bej *et al.*, 1991a; Monstein *et al.*, 1996; Fox, 1998).

Les deux propriétés principales des acides nucléiques exploitées pour la mise au point des techniques de détection sont (i) la capacité de deux chaînes monocaténares complémentaires à former, sous certaines conditions de milieu et de température, des molécules double brins stables et (ii) la réversibilité de la dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin.

#### **I.3.7.1. Les techniques**

##### **I.3.7.1.1. L'hybridation moléculaire**

L'objectif de l'hybridation moléculaire est de détecter spécifiquement une séquence d'acides nucléiques à l'aide d'une sonde nucléique marquée. Une sonde peut être d'origine chromosomique ou plasmidique et sa taille est comprise entre 15-20 pb et 30 kpb (Fox, 1998).

Le marquage d'une sonde peut s'effectuer à l'aide d'éléments radioactifs mais comme la manipulation de ces radioéléments demeure contraignante et relativement dangereuse, leur utilisation pour la détection en routine n'est pas envisageable. De ce fait, l'alternative employant un marquage non radioactif, dit "froid", s'est fortement développée au cours de ces dernières années. De nombreux kits commerciaux de marquage et de détection sont désormais disponibles et leur sensibilité est devenue comparable à ceux utilisant des éléments radioactifs (Seal & Elphinstone, 1994; Fox, 1998). La détection de l'hybridation peut se faire par spectrophotométrie, fluorimétrie ou luminimétrie.

Le niveau de spécificité d'une sonde est variable. Une sonde peut être discriminante au niveau du genre, de l'espèce ou même à un niveau infrasécifique. La spécificité des sondes est vérifiée soit par hybridation avec des profils de restriction d'ADN totaux (technique RFLP, cf. chapitre I.2.1.1.), soit par hybridation sur membrane de nitrocellulose ou de nylon avec de l'ADN extrait ou directement avec du lysat bactérien à partir d'une collection bactérienne sous forme de spot (technique du dot-blot). Le dot-blot peut se réaliser également sur un échantillon biologique déposé directement sur la membrane. Les avantages du dot-blot sont sa simplicité, sa rapidité et le nombre élevé d'échantillons que l'on peut tester simultanément (Fox, 1993). Mais la faible sensibilité de la technique d'hybridation estimée généralement entre  $10^5$  à  $10^6$  ufc/mL fait qu'elle est rarement employée comme moyen de détection directe sur échantillon biologique.

Néanmoins, la technique FISH (pour *fluorescent in situ hybridization*) utilisée pour la détection de *R. solanacearum* dans des échantillons de plante, de sol et d'eau s'est avérée très efficace pour réduire le nombre de faux résultats positifs par immunofluorescence (Wullings *et al.*, 1998).

#### 1.3.7.1.2. La PCR

La PCR, depuis sa mise au point il y a environ 15 ans, a connu un développement considérable et est devenue comme l'ELISA une des techniques les plus employées en laboratoire. Ses caractéristiques font qu'elle est parfaitement adaptée à la détection en routine des bactéries phytopathogènes. Une difficulté majeure de son utilisation, en particulier dans les pays en voie de développement, est son coût qui reste, malgré d'indéniables progrès, relativement élevé (Seal, 1995; Seal, 1998a).

La PCR conduit à l'amplification exponentielle *in vitro* d'une séquence spécifique d'ADN à l'aide de deux amorces complémentaires chacune d'un des deux brins de l'ADN et d'une ADN polymérase thermorésistante. En pratique, le nombre de cycles d'amplification réalisé varie entre 20 et 35, soit un facteur d'amplification d'au moins  $10^6$ . Chaque cycle se décompose en trois étapes : (i) dénaturation des deux brins d'ADN, (ii) hybridation du couple d'amorces encadrant la région à amplifier et (iii) synthèse par l'ADN polymérase des brins complémentaires. Après amplification, une électrophorèse est généralement réalisée en présence d'un marqueur de masse moléculaire afin de vérifier, par sa taille, la nature du (ou des) fragment(s) amplifié(s).

La maîtrise de certains paramètres de la réaction comme le choix des amorces (logiciels disponibles), la température d'appariement des amorces à l'ADN cible et la concentration des éléments constitutifs du milieu réactionnel, est essentielle pour assurer l'efficacité de cette technique.

La spécificité de la méthode est plus ou moins large. Elle peut être reliée à un ensemble de micro-organismes, à un pathogène déterminé, ou un groupe de souches. La spécificité peut être vérifiée et améliorée par une digestion du produit d'amplification par une ou plusieurs enzymes de restriction (technique PCR-RFLP) ou par une seconde série d'amplifications à l'aide d'autres amorces ayant des sites d'hybridation au sein du premier fragment amplifié (technique nested-PCR). La PCR présente l'avantage d'être une méthode très rapide et applicable directement à un échantillon biologique. De plus, comme il s'agit d'une méthode très sensible, de très faibles quantités de populations bactériennes sont détectables. Cette caractéristique est très intéressante, en particulier pour la détection des infections latentes de *R. solanacearum*. Mais la puissance de cette technique fait que la moindre contamination de l'échantillon ou des réactifs peut engendrer de faux résultats positifs. Afin de minimiser les risques, des conditions de travail extrêmement rigoureuses doivent être observées. Par ailleurs, l'inhibition de la réaction PCR due à des substances présentes dans les échantillons biologiques est un phénomène fréquemment rencontré. Pour lever ces inhibitions de nombreuses possibilités existent (utilisation d'adjuvants, purification d'ADN, technique d'immuno- ou séquence- capture-PCR,...) mais leur efficacité est plus ou moins grande selon les échantillons (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997).

### I.3.7.2. Stratégies de recherche d'une séquence nucléotidique spécifique

#### I.3.7.2.1. Exploration des opérons ADNr

L'exploration des opérons ADNr est sans aucun doute l'approche la plus utilisée pour l'obtention de séquences spécifiques du genre, de l'espèce mais également à un niveau infra-spécifique. L'ADNr 16S a été utilisé pour la détection spécifique de *A. tumefaciens* (Picard *et al.*, 1992), du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993), et des sous-groupes de *R. solanacearum* (Fegan *et al.*, 1998a; Boudazin *et al.*, 1999; Seal *et al.*, 1999); l'ADNr 23S pour la détection spécifique d'*E. amylovora* (Maes *et al.*, 1996) et du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Wullings *et al.*, 1998). L'ITS situé entre les fragments 16S et 23S de l'ADNr, présentant une plus grande diversité, a permis d'obtenir des fragments spécifiques d'espèces ou de sous-espèces (Barry *et al.*, 1991), par exemple pour *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Li & De Boer, 1995), *C. xyli* subsp. *xyli* (Fegan *et al.*, 1998b) *X. albilineans* (Pan *et al.*, 1997) et les sous-groupes de *R. solanacearum* (Fegan *et al.*, 1998a).

#### I.3.7.2.2. Gènes impliqués dans le pouvoir pathogène

La stratégie consistant à prendre pour cible les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène des bactéries phytopathogènes est également très souvent employée pour l'obtention de séquences spécifiques, surtout au niveau infra-spécifique car les séquences de ces gènes sont plus variables que les ADNr.

Les gènes *hrp* ont ainsi été explorés et exploités pour l'amplification spécifique des souches de *X. vesicatoria* (Leite *et al.*, 1995) de *X. fragariae* (Roberts *et al.*, 1996) et du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (cf. chapitres III.1.1. et III.1.2.). Les gènes codant pour des phytotoxines ont aussi été exploités avec succès. Par exemple, les sondes correspondant aux gènes responsables de la production de la phaséolotoxine et de la coronatine sont des sondes spécifiques respectivement des pathovars *phaseolicola* et *tomato* de l'espèce *P. syringae* (Schaad *et al.*, 1989; Cuppels *et al.*, 1990). L'amplification par PCR d'un fragment du gène codant pour la phaséolotoxine s'est révélée également spécifique de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Prosen *et al.*, 1993; Audy *et al.*, 1996). La séquence des gènes codant pour des exoenzymes, endoglucanase et polygalacturonase, a permis la synthèse d'amorces PCR pour l'amplification spécifique des souches du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB et de *P. syzygii* (Gillings *et al.*, 1993; Fegan *et al.*, 1998a).

#### I.3.7.2.3. Séquence d'insertion (IS)

Les IS ont aussi été exploités mais plus rarement dans un but d'identification par hybridation moléculaire ou PCR. Des IS ont été utilisés pour différencier *X. oryzae* pv. *oryzae* des nombreux pathovars de *X. campestris* (Leach *et al.*, 1990), et pour identifier *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (Berthier *et al.*, 1994) et *X. oryzae* pv. *oryzae* (George *et al.*, 1997).

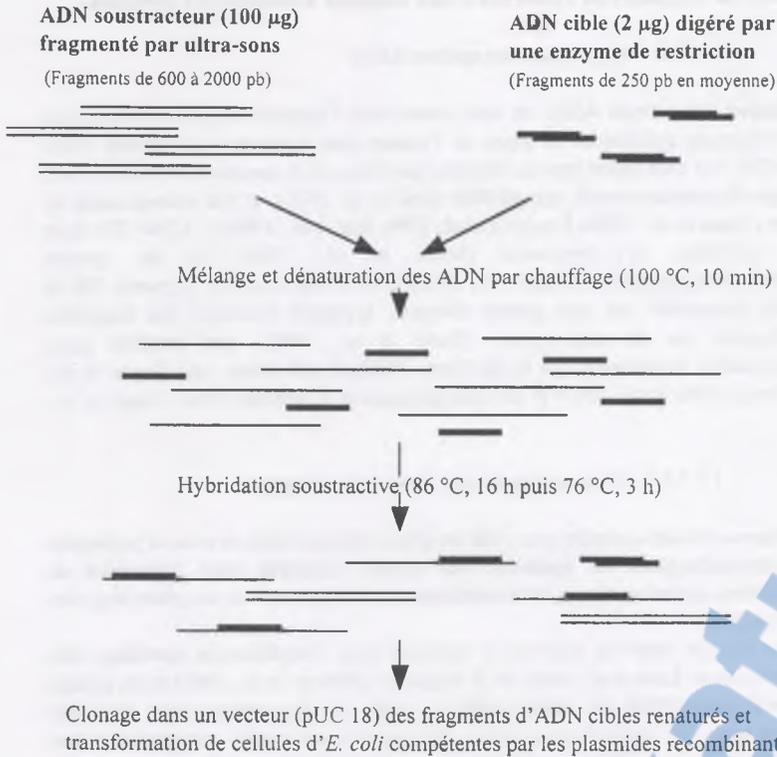


Figure I-9. Principe de l'hybridation soustractive (d'après Manceau *et al.*, 2000a).

## I.3.7.2.4. Exploration du génome entier

Cette technique consiste à réaliser une banque génomique de la bactérie à détecter puis à rechercher parmi les différents clones obtenus une séquence nucléotidique spécifique. Le criblage de cette banque est assez lourd puisqu'il est nécessaire de tester, séparément par hybridation moléculaire, chaque clone pour sa spécificité vis-à-vis du micro-organisme.

## I.3.7.2.5. L'hybridation soustractive (ou soustraction génomique)

Le principe de cette technique (figure I-9) est de soustraire du génome d'un organisme dit cible toutes les séquences qu'il possède en commun avec un organisme dit soustracteur afin de ne conserver que celles qui sont spécifiques à cet organisme cible (Fox, 1998). Le choix des organismes cibles et soustracteurs peut permettre de cibler des séquences différentielles codant pour des caractères physiologiques, écologiques ou pathogènes. En général, il est préférable de choisir des organismes taxonomiquement proches (Manceau *et al.*, 2000a). Par cette technique, plusieurs fragments d'ADN spécifiques d'*E. carotovora* subsp. *atroseptica* (Darrasse *et al.*, 1994), de *P. syringae* pv. *pisi* et de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Manceau *et al.*, 2000b) et de *Xylophilus ampelinus* (Manceau *et al.*, 2000a) ont été isolés. Cette technique s'est également avérée efficace pour l'obtention d'une sonde spécifique de *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1992a) et d'une majorité des souches de la race 3 de *R. solanacearum* (Cook & Sequeira, 1991b).

## I.3.7.2.6. Exploitation des techniques d'analyse de la diversité génomique

Les techniques RAPD et rep-PCR sont très utiles pour différencier des souches au niveau de l'espèce et surtout au niveau infra-spécifique (Stead *et al.*, 1997), mais comme leur utilisation requiert une purification préalable du pathogène, ces méthodes ne permettent pas une détection *in situ* dans les échantillons de plantes, de sols ou de semences (Louws *et al.*, 1994; Fox, 1998). Par exemple, la RAPD autorise la différenciation des sous-espèces *atroseptica* et *carotovora* d'*E. carotovora* (Parent *et al.*, 1996) et la discrimination des pathovars *maculicola* et *tomato* de *P. syringae* (Clerc *et al.*, 1998). La rep-PCR permet l'identification de pathovars de *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994) et des cinq sous-espèces de *C. michiganensis* (Louws *et al.*, 1998).

La détection directe *in situ* des agents pathogènes est toutefois envisageable en sélectionnant les marqueurs RAPD polymorphes. Ces marqueurs peuvent être clonés puis séquencés, rendant possible la synthèse d'un couple d'amorces dirigeant l'amplication d'un fragment appelé alors SCAR (pour Sequenced-Characterized Amplified Region) qui aura une forte probabilité d'être spécifique. Cette technique a notamment été utilisée pour la détection spécifique de *X. campestris* pv. *pelargonii* (Manulis *et al.*, 1994), *X. fragariae* (Pooler *et al.*, 1996), *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Toth *et al.*, 1998) et des races de *P. syringae* pv. *phaseolicola* (Gonzalez *et al.*, 1998). Une démarche identique peut être envisagée pour toute technique fournissant une empreinte génétique en particulier pour l'AFLP qui peut générer de multiples marqueurs polymorphes. Par exemple, l'étude AFLP de souches de *R. solanacearum* (cf. chapitre III.1.2.) a révélé (sous réserve de confirmation) des marqueurs spécifiques de groupes de biovar, de biovar ou encore d'une origine géographique.

## **II. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS**

## II.1. Le flétrissement bactérien à la Réunion : problématique

### II.1.1. Le contexte réunionnais

#### II.1.1.1. Situation géographique

L'île de la Réunion, d'une superficie de 2512 km<sup>2</sup>, est située dans la partie Sud-Ouest de l'Océan Indien, au sein de l'archipel des Mascareignes. Elle est localisée à environ 700 km à l'Est de Madagascar et à 200 km au Sud-Ouest de l'île Maurice.

#### II.1.1.2. Relief

La Réunion est constituée de deux massifs volcaniques bien individualisés : le massif du Piton des neiges (culminant à 3069 m) et le massif du Piton de la Fournaise (culminant à 2631 m). Le premier est inactif à ce jour et est âgé d'environ 3 millions d'années. Le Piton des Neiges domine trois caldeiras grandioses (les cirques de Cilaos, Mafate et Salazie) résultant d'un effondrement initial et d'une érosion très intense. Le massif du Piton de la Fournaise, au Sud-Est de l'île, âgé d'environ 0,5 millions d'années, est toujours en activité aujourd'hui. Entre les deux massifs s'étend une zone de hautes plaines : la plaine des Palmistes et la plaine des Cafres.

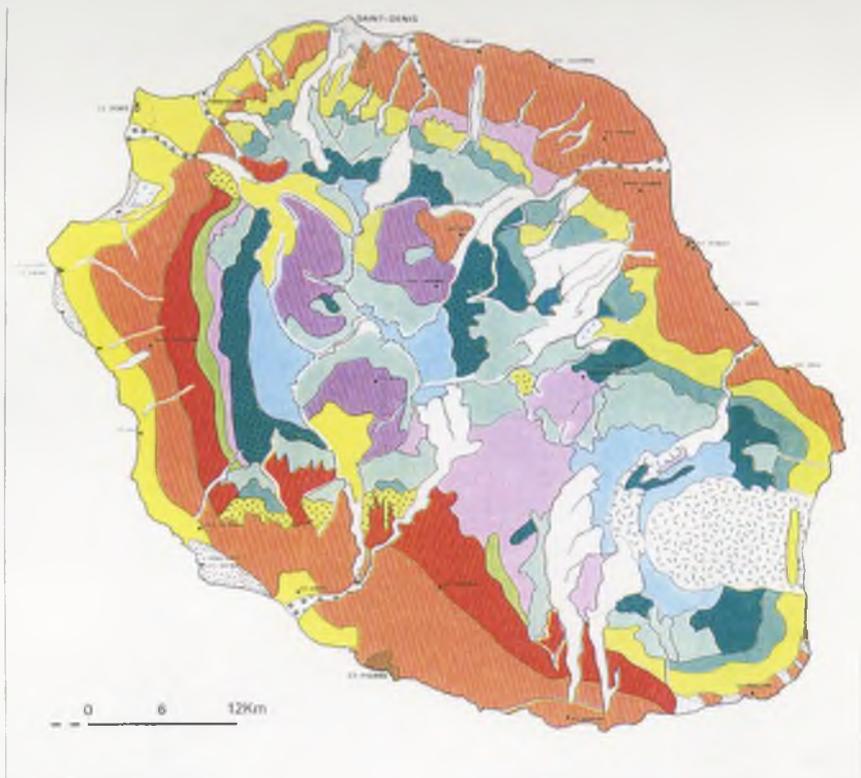
#### II.1.1.3. Climat

De par son relief très accentué, l'île de la Réunion connaît une très grande variété de micro-climats. Globalement, l'île est soumise à un climat tropical humide caractérisé par deux saisons bien marquées. L'hiver austral (de mai à octobre) est la saison sèche et fraîche. Les pluies, très variables, sont liées aux alizés (vents d'est dominants). Ainsi, la côte dite « au vent » est bien arrosée alors que la côte dite « sous le vent » est soumise à une relative sécheresse avec une végétation de type savane autour de St-Gilles. C'est pendant l'été austral (de novembre à avril), saison chaude et humide, que l'île connaît des activités cycloniques parfois violentes et destructrices.

Les températures varient en fonction de l'altitude et de la saison. Un gradient de 0,6 °C pour 100 mètres est observé. A basse altitude, les températures moyennes oscillent entre 20-22 °C en saison sèche et entre 26-28 °C en saison humide.

#### II.1.1.4. Végétation

Comme le relief et le climat, la végétation présente sur l'île est très diversifiée (figure II-1). La ceinture sucrière se situe tout autour de l'île entre 0 à 600 m d'altitude. Au dessus et dans l'Ouest de l'île se situent des cultures de géranium ainsi que des cultures vivrières et maraîchères puis des pâturages jusqu'à environ 1600 m. Au delà, ainsi que dans l'Est à partir de 700 m, s'étend la végétation forestière naturelle constituée d'une zone de forêt secondaire à espèces introduites puis d'une forêt primitive à « bois de couleur ». Enfin, entre 1500 et 1800 m, se rencontre une forêt de tamarins, spécifique de la Réunion. Quant aux coulées du Piton de la Fournaise, elles ne portent le plus souvent qu'une végétation pionnière composée de lichens et de fougères (Cadet, 1980).



## VEGETATION NATURELLE

-  Absence de végétation (ou lichens, tougeres) (volcanisme actuel)
-  Végétation éricoïde d'altitude
-  Forêt mesotherme
-  Forêt megatherme hygrophile
-  Fourré très hygrophile à Pandanus
-  Forêt à Acacia heterophylla (Tamarins)
-  Forêt secondaire à Goyaviers et Jamrose
-  Forêt secondaire à Goyaviers dominants
-  Savane semi-aride herbeuse ou arbustive à Leucaena (végétation secondaire)
-  Végétation marécageuse
-  Végétation indifférenciée des escarpements
-  Lits actuels des cônes de déjection

## ACTIVITES AGRICOLES ET BOISEMENTS

-  Canne à sucre
-  Géranium et cultures diverses (légumes, maïs, tabac, fruitiers, fleurs, vetyver...)
-  Boiselements d'Acacia decurrens
-  Paturages d'altitude dominants
-  Cultures des "cirques" (sur "Ilets") et végétation des zones ravinées
-  Vanille
-  Boiselements de Filao sur sables littoraux

Figure II-1. Carte de la végétation naturelle et des activités agricoles de l'île de la Réunion (d'après Raunet, 1991).

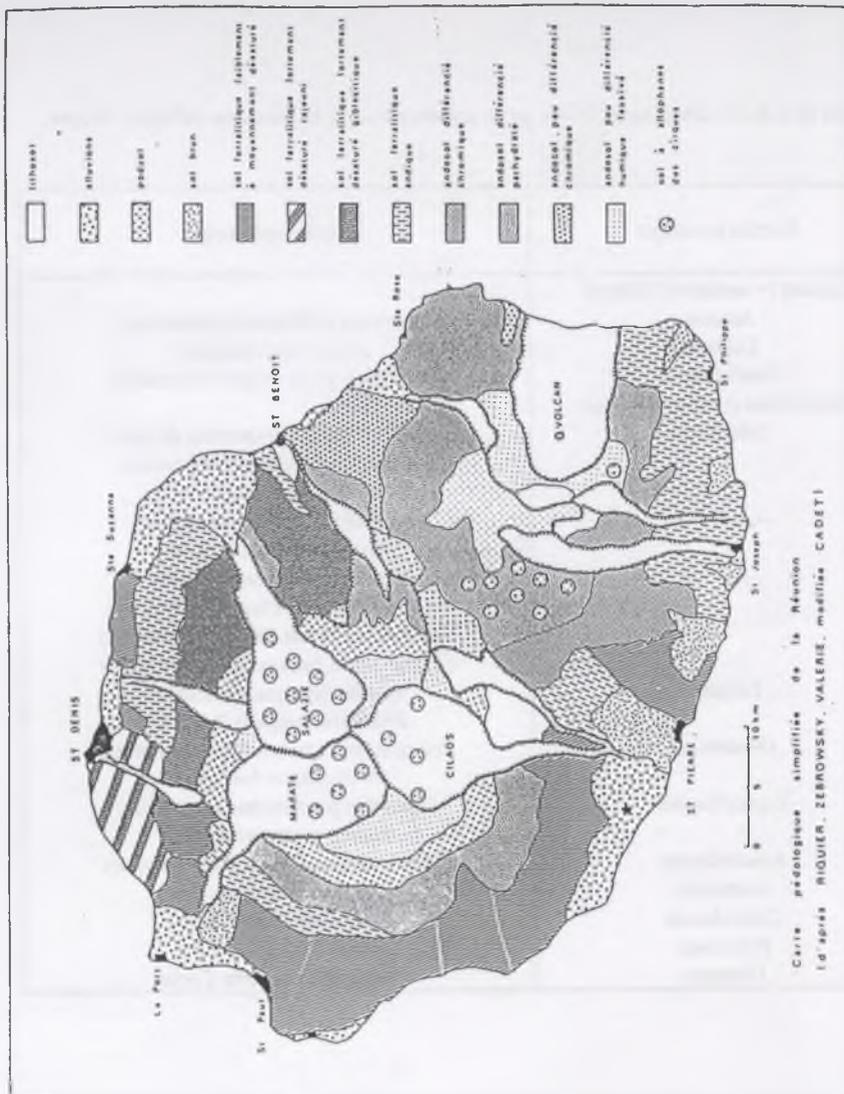


Figure II-2. Carte pédologique simplifiée de l'île de la Réunion (d'après Riquier-Zebrowsky modifiée par Cadet).

Tableau II-1. Liste des plantes hôtes de *R. solanacearum* à la Réunion (d'après Nicole, 1995).

Famille botanique	Espèce botanique
Liliidae (= monocotylédones)	
Araceae	<i>Anthurium andreanum</i> (anthurium)
Liliaceae	<i>Allium cepa</i> (oignon)
Strelitziaceae	<i>Strelitzia reginae</i> (oiseau du paradis)
Magnoliidae (= dicotylédones)	
Solanaceae	<i>Solanum tuberosum</i> (pomme de terre)
	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)
	<i>Capsicum annuum</i> (poivron)
	<i>Solanum melongena</i> (aubergine)
	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabac)
	<i>Capsicum frutescens</i> (piment)
	<i>Solanum nigrum</i> (morelle noire)
	<i>Solanum auriculum</i> (bringellier marron)
	<i>Cyphomendra betacea</i> (tomate arbuste)
Fabaceae	<i>Arachis hypogaea</i> (arachide)
	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot)
Geraniaceae	<i>Pelargonium asperum</i> (géranium rosat)
	<i>Pelargonium hortorum</i>
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia pulcherrima</i> (poinsettia)
	<i>Ricinus communis</i> (ricin)
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> (faux-poivrier)
Asteraceae	<i>Angeratum conyzoides</i>
Crassulaceae	<i>Kalanchoe blossfeldiana</i>
Potulaceae	<i>Portula</i> sp. (pourpier)
Urticaceae	<i>Obetia ficifolia</i> (boie d'ortie)

### II.1.1.5. Pédologie

D'origine volcanique à dominante basaltique, les sols de la Réunion ont subi une pédogenèse intense liée au climat tropical (figure II-2). Ces sols présentent des pH neutres à acides et sont généralement d'épaisseur réduite. Dans la zone « au vent », l'engorgement hydrique quasi permanent conduit essentiellement à la formation d'andosols perhydratés. En revanche, dans la zone « sous le vent » les sols sont plus variés. Ce versant de l'île montre une différenciation des sols liée au climat et à l'altitude très nette : en région côtière, ce sont les sols ferrallitiques et les sols peu évolués qui dominent puis se succèdent en fonction de l'augmentation de l'altitude des sols bruns ordinaires, des sols bruns andiques, des andosols non perhydratés et des andosols perhydratés (Raunet, 1991).

### II.1.1.6. Agriculture

L'agriculture réunionnaise reste fragile car elle est confrontée à de nombreuses contraintes physiques (relief accidenté, érosion des sols, cyclones) et de nombreuses attaques de ravageurs et pathogènes. L'agriculture est essentiellement basée sur les productions végétales. La filière élevage demeure insuffisante malgré les efforts entrepris pour la développer, notamment dans « les hauts » de l'île. La première production de l'île est la canne à sucre qui domine depuis plus d'un siècle et demi l'économie de la Réunion. Elle est omniprésente sur l'île jusqu'à 600 m d'altitude (60 % de la surface agricole utile; 1,8 millions de tonnes produites par an en moyenne). Actuellement, les productions traditionnelles (géranium, vanille, vétiver), qui participèrent à la renommée de l'île, sont marquées par une forte régression. En revanche, les filières fruitières (agrumes, letchis, manguiers, bananiers, ananas) et maraîchères (tomate, pomme de terre, poivron, aubergine) sont en expansion. La diversification et la progression des productions maraîchères ont abouti à une quasi autosuffisance de l'île en matière de légumes frais. La tomate demeure au premier rang des espèces cultivées et consommées sur l'île.

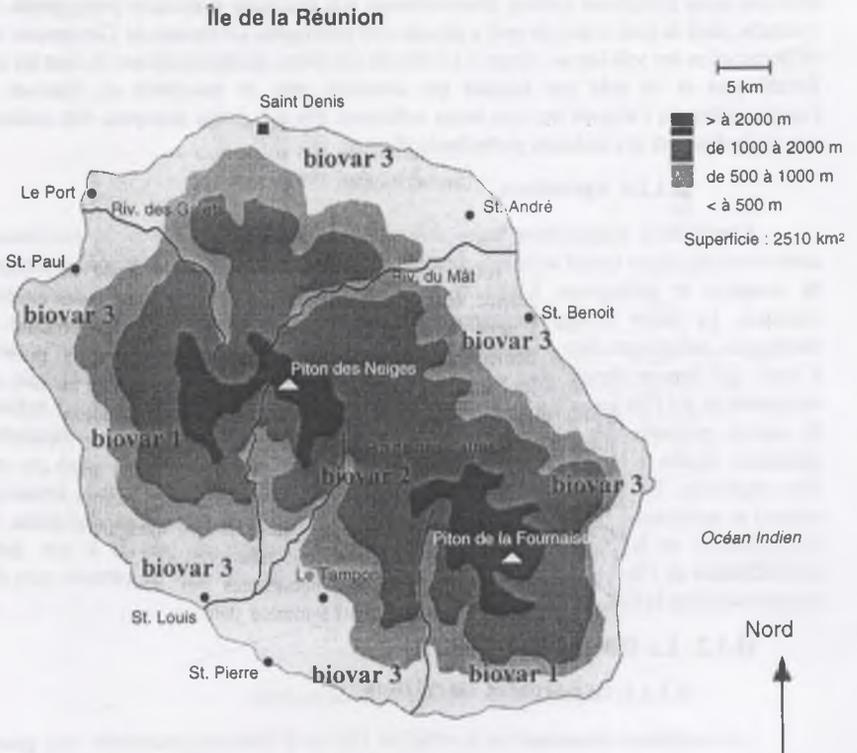
## II.1.2. Le flétrissement bactérien

### II.1.2.1. Importance économique de la maladie

Les conditions climatiques et le relief de l'île de la Réunion permettent une grande diversité des cultures mais sont également favorables au développement de nombreux ravageurs et micro-organismes. Parmi eux, *R. solanacearum*, agent du flétrissement bactérien, se manifeste régulièrement et constitue l'un des problèmes phytosanitaires majeurs de l'île.

À la Réunion, le flétrissement bactérien a été décrit pour la première fois par Roger en 1960, mais sa présence dans l'île doit probablement remonter à bien au-delà (Nicole, 1995) (et plus encore s'il y est endémique...). Vingt trois espèces végétales sensibles, réparties au sein de 12 familles botaniques, ont été identifiées (tableau II-1). Cette maladie est considérée comme une contrainte économique importante pour les cultures de Solanacées (tomate, pomme de terre, aubergine principalement) et un frein au développement de la culture du géranium rosat et de l'anthurium. Durant la saison chaude et humide (de novembre à avril), la culture des Solanacées peut même devenir illusoire dans les sols fortement infestés (Girard *et al.*, 1993). Par ailleurs, il faut signaler que des cas de flétrissement bactérien sur cultures hors-sol de tomate se déclarent occasionnellement (Girard *et al.*, 1993; Nicole *et al.*, 1998).

pour l'île de la Réunion et de l'île de la Martinique. Les populations de *R. solanacearum* de l'île de la Réunion sont regroupées en trois biovars (biovar 1, biovar 2 et biovar 3) qui sont distribués de manière hétérogène sur l'île. Le biovar 1 est présent dans les zones de montagne (altitude > 1000 m) et le biovar 2 est présent dans les zones de montagne (altitude > 1000 m) et le biovar 3 est présent dans les zones de montagne (altitude > 1000 m) et le biovar 3 est présent dans les zones de montagne (altitude > 1000 m).



**Figure II-3. Répartition des trois biovars de *R. solanacearum* à la Réunion.**

### II.1.2.2. Mesures de lutte

La lutte contre le flétrissement bactérien à la Réunion demeure relativement restreinte. Les rotations culturales sont occasionnellement utilisées et la plus efficace est probablement réalisée avec des plantes non-hôtes comme la canne à sucre ou des Graminées de pâturages. Le greffage de variétés d'aubergine sur le porte-greffe résistant *Solanum torvum* est traditionnellement pratiqué par quelques agriculteurs avec un certain succès d'ailleurs, mais comme l'opération de greffage est fastidieuse et d'un prix de revient élevé, cette technique n'est pas appliquée à plus grande échelle (Girard *et al.*, 1993). La culture hydroponique de tomate, qui a tendance à se développer, assure un meilleur contrôle sanitaire parce qu'elle échappe au problème d'infestation de *R. solanacearum* dans le sol et offre la possibilité de désinfecter le substrat à la vapeur d'eau ou à l'hypochlorite de calcium (Nicole, 1995). Une collection de cultivars résistants de tomate et d'aubergine de diverses origines ont été testés mais confrontés aux souches locales de *R. solanacearum* les niveaux de résistance se sont avérés très insuffisants et/ou les qualités organoleptiques des fruits ne correspondent pas aux attentes des consommateurs (Girard *et al.*, 1989). Un essai variétal de tomates coordonné par l'AVRDC, effectué récemment dans de nombreux sites de par le monde (dont la Réunion), a permis de dégager un certain nombre de cultivars potentiellement intéressants car résistants ou tolérants aux souches de biovar 3 de la Réunion (Wang *et al.*, 1998a).

### II.1.2.3. Populations de *R. solanacearum* et distribution géographique

L'île de la Réunion constitue un site géographique restreint propice à l'étude du flétrissement bactérien puisqu'elle a la particularité d'héberger trois populations différentes de *R. solanacearum* (biovar 1/race 1; biovar 2/race 3; biovar 3/ race 1) (Girard *et al.*, 1993), ce qui est un fait assez rare dans le monde. Quant aux souches appartenant à la race 2, jusqu'ici elles n'ont pas été signalées sur l'île (Girard *et al.*, 1989). Les lieux d'isolement de *R. solanacearum* sont tous compris entre 0 et 1700 m d'altitude. Toutefois, entre 200 et 600 m, peu d'isolats sont obtenus probablement du fait de la culture dominante de la canne à sucre (plante non-hôte) dans cette zone (Girard, 1989). Les trois populations du pathogène sont réparties en fonction de l'altitude (Girard *et al.*, 1993; Nicole, 1995) (figure II-3) :

- les souches de biovar 1 (les plus rares) sont isolées dans une région de l'Ouest de l'île entre 600 et 1000 m d'altitude sur géranium rosat, tomate et pomme de terre, ainsi que dans une région limitée du Sud jusqu'à 600 m sur géranium rosat,

- les souches de biovar 2 sont isolées sur pomme de terre dans une zone nommée "Plaine des Cafres" située entre 1200 et 1700 m, et exceptionnellement à des altitudes plus basses (entre 0 et 1200 m), sur tomate en culture hors-sol,

- les souches de biovar 3 (les plus fréquentes) sont isolées tout autour de l'île du niveau de la mer jusqu'à 1200 m d'altitude et sur une large gamme d'hôtes.

Par conséquent, d'une manière générale, la répartition des trois populations de *R. solanacearum* à la Réunion correspond à celle observée dans le monde entier, à savoir que les souches de la race 1 (biovars 1 et 3) se manifestent essentiellement dans « les bas » de l'île, c'est à dire à des altitudes où les températures peuvent être qualifiées de tropicales alors que les souches de la race 3 (biovar 2) se trouvent confinées dans les « hauts » de l'île, c'est à dire à des altitudes où règne un climat plus tempéré (entre 15 et 20 °C).

La température est probablement le facteur principal expliquant l'absence du biovar 3 dans les « hauts » de l'île. En revanche, il n'est pas à lui seul responsable de l'absence du biovar 2 dans les « bas » de l'île; la faible compétitivité du biovar 2, notamment en présence du biovar 1 et/ou du biovar 3, pourrait expliquer cette observation (Nicole, 1995; Nicole *et al.*, 1998).

## II.2. Objectifs

L'existence de trois populations dans des zones géographiquement limitées, des moyens de lutte restreints et la grande diversité agro-pédo-climatique de l'île ont amené le laboratoire de phytopathologie du CIRAD-Réunion à définir un programme de recherche, au sein duquel s'est inscrit mon travail de thèse. Ce programme a pour objectif l'optimisation des mesures de lutte prophylactique car elles demeurent souvent les plus accessibles, les moins onéreuses et parfois les plus efficaces contre le flétrissement bactérien et peuvent venir en appui de la lutte variétale menée dans le cadre d'une stratégie de lutte intégrée.

Pour améliorer l'efficacité de la lutte contre le flétrissement bactérien, une meilleure connaissance de la diversité génétique de la bactérie pathogène est indispensable de manière à pouvoir effectuer une sélection et une utilisation pertinente au plan variétal. C'est dans ce contexte que nous avons collecté un très grand nombre de souches de *R. solanacearum* avec pour objectif d'obtenir la meilleure représentativité aussi bien au niveau géographique, métabolique (biovars), qu'au plan pathologique (gamme d'hôtes). Une grande attention a été portée aux souches d'origine africaine, et bien entendu réunionnaise, car, jusqu'à présent, elles n'avaient pas ou très rarement été intégrées dans les précédentes analyses de la diversité (phénotypique ou génétique) effectuées sur l'espèce *R. solanacearum*. Afin d'analyser cette diversité, nous nous sommes orientés vers l'exploration d'une zone du génome fortement impliquée dans le pouvoir pathogène de la bactérie, les gènes *hrp*. Cette région avait déjà été en partie étudiée mais par une méthode plus lourde, la RFLP et avait alors fourni des résultats très probants. Nous avons décidé d'utiliser une technique plus facile à mettre en oeuvre, la PCR-RFLP. Par la suite, au regard des résultats originaux obtenus, d'autres techniques ont été employées pour analyser la diversité génétique de *R. solanacearum* : l'AFLP, le séquençage total de l'ADNr 16S ainsi que le séquençage partiel du gène *hrpB* et du gène codant pour l'endoglucanase. Enfin, nous avons affiné notre étude en analysant la diversité génétique existant au sein d'une population de *R. solanacearum* présente naturellement dans une parcelle.

L'efficacité de la lutte prophylactique repose sur une parfaite connaissance et une bonne maîtrise des sources d'inoculum, ce qui implique de disposer d'outils de détection performants, c'est à dire capables de détecter et de quantifier *R. solanacearum* et chacun de ses variants (race et biovar) de manière spécifique, sensible, rapide et reproductible dans les divers milieux où la bactérie est susceptible de se retrouver. L'isolement et la numération sur milieu gélosé sont le plus souvent inopérants en raison de la richesse et de la complexité de la flore bactérienne connexe (sol, semence) et/ou de très faibles concentrations de *R. solanacearum* (eau). Par ailleurs, la mise au point de milieux sélectifs réellement efficaces a échoué, ce qui a pendant longtemps constitué un frein aux études épidémiologiques. Les méthodes sérologiques sont devenues les méthodes les plus couramment employées pour la

détection de *R. solanacearum* en raison des avancées dans ce domaine (anticorps monoclonaux, ELISA), mais elles présentent une spécificité encore insuffisante et une sensibilité encore trop faible. Nous avons donc choisi de nous orienter vers la biologie moléculaire capable de fournir des outils réputés être hautement spécifiques, très sensibles et pouvant correspondre parfaitement aux besoins en matière de détection de *R. solanacearum*. Nous nous sommes basés sur l'analyse par PCR-RFLP des gènes *hrp* de *R. solanacearum* pour mettre au point un tel outil avant de l'adapter à la détection de la bactérie dans les différents réservoirs potentiels d'inoculum.

Pour optimiser l'efficacité de la lutte, une amélioration significative de la connaissance des caractéristiques biologiques et épidémiologiques de la bactérie apparaît nécessaire car de nombreuses questions subsistent dans ce domaine.

Une première question concerne l'eau. En effet, peu d'études ont été réalisées sur l'aptitude de la bactérie à se conserver dans l'eau. De plus, même si l'eau est souvent rapportée comme un facteur clé pour la dissémination de la bactérie, il nous est apparu important de le confirmer.

Une seconde question concerne la semence. En effet, même s'il est couramment admis que cette voie de transmission n'est pas effective dans le cas de *R. solanacearum*, excepté pour les tubercules de pomme de terre, aucune preuve scientifique incontestable n'a encore été apportée à ce jour. En prenant comme modèle la tomate et l'aubergine, nous avons donc évalué la possibilité d'une transmission de la bactérie par la graine.

Une autre question concerne le sol. Certains sols, de par leurs caractéristiques physico-chimiques, sont rapportés comme favorisant ou diminuant l'incidence du flétrissement bactérien mais finalement peu d'études ont été réalisées sur ce sujet. Nous avons donc étudié l'influence du type de sol, d'une part sur la durée de survie de *R. solanacearum* (sol nu ou cultivé), et d'autre part sur le développement de la maladie.

**III. DIVERSITE GENETIQUE  
DE *RALSTONIA SOLANACEARUM***

### III.1. Analyse de la diversité génétique de *R. solanacearum* à partir d'une collection mondiale

#### Introduction

Les travaux de référence sur l'estimation de la diversité génétique de *R. solanacearum* font appels à différentes techniques, en particulier par hybridation ADN/ADN (Palleroni & Doudoroff, 1971), par PCR-RFLP d'un fragment du gène codant une polygalacturonase (Gillings *et al.*, 1993), par comparaison de séquences partielles (Seal *et al.*, 1993) ou totales (Li *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996) du fragment 16S de l'ADNr. L'étude la plus complète, car comportant un plus grand nombre de souches, a été effectuée par RFLP à l'aide de sondes correspondant à des régions des gènes *hrp*, de gènes impliqués dans la biosynthèse du tryptophane et de l'EPS (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991; Cook & Sequeira, 1994). Ces études RFLP ont permis la mise en évidence de deux groupes évolutifs au sein de l'espèce *R. solanacearum*. Ces deux divisions étant fortement corrélées à l'origine géographique, elles ont été nommées « Asiaticum » ou division 1 en relation avec l'origine asiatique et australienne des souches et « Americanum » ou division 2 en relation avec l'origine américaine des souches.

Assez curieusement, ces travaux sur l'analyse de la diversité génétique de *R. solanacearum* n'ont pas, ou tout du moins très rarement, intégré des souches d'origine africaine. Nous nous sommes par conséquent attachés très rapidement à collecter, essentiellement dans les collections internationales, le maximum de souches d'origine africaine afin de conférer un caractère innovant à nos recherches et surtout pour tenter d'obtenir une image plus globale de la diversité existant au sein de *R. solanacearum*. En matière de lutte contre un agent pathogène, il est particulièrement important de bien connaître la structure des différentes populations de l'agent pathogène. Déterminer comment les souches africaines s'apparentent aux souches ayant d'autres origines géographiques doit apporter des informations sur leur évolution par rapport aux autres populations. Suivent-elles une évolution indépendante ou ont-elles été introduites en Afrique par le biais d'échanges commerciaux ?

L'objectif que nous nous sommes fixés est double : analyser la diversité génétique en y associant le développement d'outils moléculaires qui font encore défauts pour l'identification et la détection des souches de *R. solanacearum* à la Réunion. Aussi, dans un premier temps nous avons utilisé la technique de PCR-RFLP car elle pouvait permettre d'apporter des réponses simultanées aux deux objectifs fixés. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à confirmer les résultats obtenus par PCR-RFLP de la région des gènes *hrp* en mettant en œuvre d'autres méthodes d'analyse de la diversité génétique et en s'attachant à explorer d'autres régions du génome de *R. solanacearum*.

#### III.1.1. Analyse de la diversité existant chez *R. solanacearum* par RFLP des fragments amplifiés de la région des gènes *hrp*

Notre première exploration de la diversité existante au sein de l'espèce *R. solanacearum* s'est orientée vers l'analyse de la région des gènes *hrp* qui, impliquée dans le pouvoir pathogène de la bactérie, est supposée être variable. La séquence de cette région étant disponible pour une souche, nous avons sélectionné des amorces pour amplifier par PCR différentes zones de cette région. L'emploi d'enzymes de restriction a permis d'estimer la variabilité au sein des amplifiats obtenus. ▶

Cette partie de nos recherches a fait l'objet d'un l'article intitulé « Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hrp* gene region » paru en 1999 dans la revue internationale « Applied and Environmental Microbiology ». Les principales conclusions sont rapportées dans le résumé dont figure ci-dessous la traduction française.

« La diversité génétique d'une collection mondiale de 120 souches de *R. solanacearum* a été évaluée par l'analyse RFLP de fragments amplifiés de la région des gènes *hrp*. Cinq fragments amplifiés sont apparus comme spécifiques de *R. solanacearum*. Quinze profils différents ont été identifiés parmi les 120 souches, et classés au sein de huit groupes à l'aide d'une classification ascendante hiérarchique. Chaque groupe inclut des souches appartenant à un seul biovar, sauf pour les souches de biovar 3 et 4, qui n'ont pu être différenciées. Cependant, les souches de biovar 1, présentes dans cinq groupes, montrent la plus large diversité tandis que les souches de biovar 2 et les souches de biovars 3 et 4 sont respectivement comprises au sein d'un et deux groupes. L'analyse par PCR-RFLP de la région des gènes *hrp* a confirmé les résultats de précédentes études qui scindent l'espèce en deux divisions : la division « Americanum » incluant les souches de biovar 1 et 2 et la division « Asiaticum » comprenant les souches de biovar 3 et 4. Néanmoins, cette étude a révélé que la majorité des souches de biovar 1 originaires de pays d'Afrique (île de la Réunion, Madagascar, Zimbabwe et Angola) et incluses dans un groupe séparé, appartiennent à la division « Asiaticum » au lieu de la division « Americanum ». Ces souches africaines pourraient par conséquent avoir évolué séparément par rapport aux souches de biovar 1 d'origine américaine. »

L'article est présenté dans les pages suivantes.

# Genetic Diversity of African and Worldwide Strains of *Ralstonia solanacearum* as Determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hrp* Gene Region

STEPHANE POUSSIER,\* PEGGY VANDEWALLE, AND JACQUES LUISETTI

Laboratoire de Phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

Received 5 August 1998/Accepted 11 February 1999

The genetic diversity among a worldwide collection of 120 strains of *Ralstonia solanacearum* was assessed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of amplified fragments from the *hrp* gene region. Five amplified fragments appeared to be specific to *R. solanacearum*. Fifteen different profiles were identified among the 120 bacterial strains, and a hierarchical cluster analysis distributed them into eight clusters. Each cluster included strains belonging to a single biovar, except for strains of biovars 3 and 4, which could not be separated. However, the biovar 1 strains showed rather extensive diversity since they were distributed into five clusters whereas the biovar 2 and the biovar 3 and 4 strains were gathered into one and two clusters, respectively. PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region confirmed the results of previous studies which split the species into an "Americanum" division including biovar 1 and 2 strains and an "Asiaticum" division including biovar 3 and 4 strains. However, the present study showed that most of the biovar 1 strains, originating from African countries (Reunion Island, Madagascar, Zimbabwe, and Angola) and being included in a separate cluster, belong to the "Asiaticum" rather than to the "Americanum" division. These African strains could thus have evolved separately from other biovar 1 strains originating from the Americas.

*Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) *solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi et al. (47) is the causal agent of bacterial wilt, a severe and devastating plant disease in most tropical and subtropical and some warm temperate areas (22). Moreover, it can also occur in cool temperate areas (9, 33). Many economically important food crops such as potatoes, tomatoes, and bananas are affected. The disease was recorded on several hundred plant species distributed in more than 50 families (23). The species *R. solanacearum* is a complex taxonomic unit in which strains display an important diversity at different levels (physiological, serological, genetic characteristics, and host range). In order to describe this intraspecific variability, several systems of classification have been proposed. Thus, the species was subdivided into five races according to its host range (7, 25, 35) and into six biovars based on the utilization of three disaccharides and three hexose alcohols (21, 24, 25). Fatty acid analysis (26, 42) and protein profiling (15) were also performed but did not further clarify the relationships among *R. solanacearum* strains. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (involving nine probes, seven of which encode information required for virulence and the hypersensitive response) (12-14) has provided a new classification scheme dividing the species into 46 groups in relation to geographic origin of strains and sometimes host range. The species was then separated into two major groups, the "Asiaticum" and the "Americanum" divisions, which regrouped strains from Asia and America, respectively. Further investigations comparing sequences of 16S rRNA (30, 40, 43) or using PCR amplification with tRNA consensus primers (39) supported the separation according to geographic origin.

Only a few strains originating from Africa, and only one from Reunion Island (21), were included in these previous

studies. However, strains related to the three major biovars (1, 2, and 3) were isolated from various crops in Reunion (17). The aim of our study was to assess the genetic diversity within the local populations of *R. solanacearum*. Since we also wanted to develop molecular tools for the identification and detection of *R. solanacearum* biovars, we used the PCR-RFLP procedure to analyze the diversity. Recently, several authors have successfully performed PCR-RFLP analysis to assess genetic diversity among bacterial species (27, 28, 31, 44, 45). The *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) gene region, which is required by many phytopathogenic bacteria to produce symptoms on susceptible hosts and a hypersensitive reaction on resistant hosts or on nonhosts (1, 3, 4, 6, 18, 29), was explored for studying the variability within a collection of 120 strains isolated from different hosts over the five continents and belonging to biovars 1, 2, 3, and 4.

## MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. Strains studied (Table 1) included diverse strains of *R. solanacearum* with special attention to those isolated from Africa (51 strains including 28 from Reunion Island) and strains belonging to more or less closely related species (*Ralstonia pickettii*, *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Erwinia chrysanthemi*, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). Identification of *R. solanacearum* strains at the biovar level was performed by using a modification of Hayward's method (21). All strains were stored on beads in cryovials at -80°C (Microbank Pro-Lab Diagnostics). Nutrient broth cultures were grown for 24 h on a rotary shaker (150 rpm) at 28°C. Bacteria were cultivated either (*R. solanacearum*) on a modified Granada and Sequeira medium (19) (tryptone, 1 g/liter; peptone, 10 g/liter; agar, 18 g/liter; glycerine, 6.3 ml/liter; crystal violet, 0.002 g/liter; polymyxin sulfate, 0.01 g/liter; tyrothricin, 0.02 g/liter; chloramphenicol, 0.005 g/liter; triphenyltetrazolium chloride, 0.025 g/liter; propiconazole, 0.4 ml/liter; penicillin, 20 U/liter; pH 7.2) or (other species) on YPGA medium (yeast extract, 7 g/liter; peptone, 7 g/liter; glucose, 7 g/liter; agar, 15 g/liter; pH 7.2) and incubated for 3 days at 28°C.

DNA extraction. DNA was extracted from *R. solanacearum* cells grown over night at 28°C in 30 ml of YP (yeast extract, 7 g/liter; peptone, 7 g/liter) by the hexadecyltrimethylammonium bromide method (2). DNA concentration was estimated by fluorometry (TKO 100 mini-fluorometer; Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Calif.).

DNA amplification. Pairs of primers from the nucleotide sequence of the *hrp* gene region of strain GM11000 (*R. solanacearum* accession no. Z14056 for

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97410 Saint-Pierre, La Réunion, France. Phone: (262) 35 76 30. Fax: (262) 25 83 43. E-mail: poussier@cirad.fr.

TABLE I. Strains of *R. solanacearum* used in this study

Strain	Other designation	Source <sup>a</sup>	Geographic origin	Host	Biovar	PCR-RFLP cluster and subcluster <sup>b</sup>
JS796	CFBP1180	B	Puerto Rico	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	Ia
JS927	NCPPB1225	C	Puerto Rico	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS833	UW30	E	Trinidad and Tobago	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JR659	CFBP2047 <sup>c</sup>	B	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	Ib
JS783	CFBP1036	B	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS967	ICMP7963	D	Kenya	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS831	UW26	E	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	Ic
JS768	CFBP767	B	Guadeloupe	<i>Solanum tuberosum</i>	1	II
JS794	CFBP1162	B	Guadeloupe	<i>Nicotiana tabacum</i>	1	
JS777	CFBP770	B	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS733	CFBP2478	B	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS784	CFBP1036	B	Martinique	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS734	CFBP2972	B	Martinique	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS716	CFBP705	B	Guyana	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS837	UW90	E	Brazil	<i>Nicotiana tabacum</i>	1	
JS838	UW275	E	Costa Rica	<i>Melampodium perfoliatum</i>	1	
JS830	UW256	E	Costa Rica	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS770	CFBP712	B	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>	1	
JS779	CFBP715	B	Burkina Faso	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS912	CFBP3057	B	Burkina Faso	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	
JS740	CFBP1415	B	Colombia	<i>Solanum tuberosum</i>	1	III
JS788	CFBP1412	B	Columbia	<i>Musa sp. cv. plantain</i>	1	
JS847	CFBP1419	B	Costa Rica	<i>Musa sp.</i>	1	
JT509		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	IV
JT515		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JT512		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JT510		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JT511		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JT513		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JT514		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JT516		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS780	CFBP2148	B	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS931	NCPPB1049	C	Kenya	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JS948	NCPPB2088	C	Nigeria	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS780	CFBP2148	B	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS931	NCPPB1049	C	Kenya	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JS948	NCPPB2088	C	Nigeria	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS905	CFBP3582	B	Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS939	NCPPB1824	C	Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS908	CFBP3525	B	Morocco	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS902	CFBP3581	B	France	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS900	CFBP3671	B	France	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JS898	CFBP3672	B	France	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS895	CFBP3673	B	France	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS942	NCPPB1019	C	Portugal	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	
JS887	CFBP3785	B	Portugal	Unknown	2	
JS930	NCPPB1489	C	Madeira	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS937	NCPPB1789	C	Greece	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS935	NCPPB339	C	Israel	Unknown	2	
JS907	CFBP3858	B	The Netherlands	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS928	NCPPB2797	C	Sweden	<i>Solanum dulcamara</i>	2	
JS929	NCPPB2505	C	Sweden	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS792	CFBP1810	B	Haiti	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS943	NCPPB613	C	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS758	CFBP1420	B	Colombia	<i>Solanum phureja</i>	2	
JS774	CFBP1414	B	Colombia	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS897	CFBP3103	B	Peru	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS926	NCPPB1331	C	India	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS925	NCPPB1323	C	Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS932	NCPPB1614	C	Malaysia	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS738	CFBP1413	B	Australia	<i>Solanum tuberosum</i>	2	
JS737	CFBP1417	B	Australia	<i>Solanum tuberosum</i>	2	

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Strain	Other designation	Source <sup>a</sup>	Geographic origin	Host	Biovar	PCR-RFLP cluster and subcluster <sup>b</sup>
JS775	CFBP1409	B	Honduras	<i>Musa sp.</i>	1	V
JS730	CFBP1482	B	Panama	<i>Musa sp.</i>	1	
JS791	CFBP1416	B	Costa Rica	<i>Musa sp. cv. plantain</i>	1	
JS793	CFBP1183	B	Costa Rica	<i>Heliconia sp.</i>	1	
JS781	CFBP1185	B	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	VIa
JS945	MAFF301860	G	Japan	<i>Capsicum annuum</i>	3	
JS941	NCPBP3190	C	Malaysia	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS836	UW8	E	Costa Rica	<i>Eupatorium odoratum</i>	3	
JS842	UW119	E	Costa Rica	<i>Solanum tuberosum</i>	3	
JS940	NCPBP500	C	Mauritius	<i>Vicia faba</i>	3	
JS944	NCPBP501	C	Mauritius	<i>Brassica oleracea</i>	3	
JS954	NCPBP502	C	Mauritius	<i>Casuarina equisetifolia</i>	3	
JS955	NCPBP503	C	Mauritius	<i>Dahlia sp.</i>	3	
JS834	UW151	E	Australia	<i>Zingiber officinale</i>	4	
JS835	UW360	E	China	<i>Morus alba</i>	4	
JS839	UW369	E	China	<i>Arachis hypogaea</i>	4	
JS832	UW378	E	China	<i>Olea sp.</i>	4	
JTS17		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	3	Vib
JTS20		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	3	
JTS19		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	3	
JS766	CFBP726	B	Reunion Island	<i>Solanum melongena</i>	3	
JTS18		A	Reunion Island	<i>Solanum melongena</i>	3	
JTS23		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	3	
JS778	CFBP2041	B	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	3	
JTS21		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JTS22		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JTS24		A	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS841	MAFF301418	G	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	4	
JS933	UW74	E	Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>	4	
JS719	CFBP2970	B	Martinique	<i>Capsicum annuum</i>	3	VIc
JS715	CFBP2976	B	Martinique	<i>Ensete ventricosum</i>	3	
JS718	CFBP2480	B	Guadeloupe	<i>Solanum melongena</i>	3	
JS729	CFBP2965	B	Guadeloupe	<i>Solanum melongena</i>	3	
JS722	CFBP1813	B	Guyana	<i>Solanum melongena</i>	3	
JS753	GM11000	F	Guyana	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS764	GM11336	F	hrp mutant of GM11000	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS843	UW130	E	Peru	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS772	CFBP707	B	Tahiti	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	
JS773	CFBP1960	B	Algeria	<i>Capsicum annuum</i>	3	
JS759	CFBP1168	B	Trinidad and Tobago	<i>Musa sp.</i>	3	
JS840	UW147	E	Australia	<i>Nicotiana tabacum</i>	3	
JS947	NCPBP1123	C	Papua New Guinea	<i>Lycopersicon esculentum</i>	4	
JS953	MAFF301552	G	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	3	VId
JS936	NCPBP3181	C	Gambia	<i>Solanum nicanum</i>	3	VIe
JS950	NCPBP1018	C	Angola	<i>Solanum tuberosum</i>	1	VIIa
JTS26		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	1	VIIb
JTS27		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	1	
JTS29		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	1	
JTS30		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	1	
JTS28		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JTS31		A	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS756	CFBP2146	B	Reunion Island	<i>Pelargonium capitatum</i>	1	
JTS25		A	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	1	
JTS32		A	Reunion Island	Unknown	1	
JS767	CFBP734	B	Madagascar	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS949	NCPBP332	C	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS966	ICMP748	D	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>	1	
JS946	NCPBP283	C	Zimbabwe	<i>Solanum panduriforme</i>	1	
JS951	NCPBP505	C	Zimbabwe	<i>Symphytum sp.</i>	1	
JS952	NCPBP342	C	Zimbabwe	<i>Nicotiana tabacum</i>	1	

Continued on following page

TABLE 1—Continued

Strain	Other designation	Source <sup>a</sup>	Geographic origin	Host	Biovar	PCR-RFLP cluster and subcluster <sup>b</sup>
JS934	MAFF301558	G	Japan	<i>Solanum tuberosum</i>	3	VIII

<sup>a</sup> Strains were contributed as follows: A, this study; B, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; C, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, United Kingdom; D, International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; E, D. Cook and L. Sequeira, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin—Madison, Madison; F, M. Arlai and P. Barberis, CNRS-INRA, Auzeville, Castanet-Tolosan Cedex, France; G, K. Tsuchiya, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Resources, Tokyo, Japan.

<sup>b</sup> PCR-RFLP clusters and subclusters were defined by this study.

<sup>c</sup> Type strain.

EMBL-GenBank-DBJ databases) were designed with Oligo 5.0 software (32). Eleven pairs were selected in order to explore the whole region. They delineated fragments with sizes ranging from 213 to 2,456 bp. Primers were synthesized by Genosys Biotechnologies, Cambridge, England.

PCRs were carried out in a total volume of 50  $\mu$ l and performed in a thermocycler (GeneAmp PCR system 9600; Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, Conn.). Two kinds of enzymes were used for PCR amplifications, either *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL Life Technologies, Cergy Pontoise, France) used with the 10X buffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; pH 8.4) for an expected fragment length smaller than 1,000 bp, or a mix containing *Taq* and *Pwo* DNA polymerases used with buffer 3 (Expand Long Template PCR system; Boehringer Mannheim, Meylan, France) for a length over 1,000 bp. DNA, selected primers, MgCl<sub>2</sub> (GIBCO BRL), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Boehringer Mannheim), and water (high-pressure liquid chromatography grade; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were added to the reaction mixture. Optimal conditions of amplification were determined by using the Taguchi methods as modified by Cobb and Clarkson (11).

PCR products were electrophoresed onto agarose gels and visualized with UV light after ethidium bromide staining (37).

**Restriction fragment analysis.** The amplified DNA fragments considered to be specific to *R. solanacearum* were digested with restriction endonucleases according to the manufacturer's directions (GIBCO BRL; Boehringer Mannheim). Enzymes were chosen on the basis of the nucleotide sequence of the *hrp* gene region of strain GMI1000 by using Oligo 5.0 software (32). Among all considered enzymes, only 13 available in the laboratory were retained: *Ava*I, *Bgl*II, *Bss*HII, *Eco*XI, *Eco*RI, *Hae*II, *Hind*II, *Nsi*I, *Pst*I, *Pvu*I, *Pvu*II, *Sac*I, and *Sma*I. Restriction fragments were separated by electrophoresis and visualized as described previously (37).

**Data analysis.** Data derived from the different RFLP patterns exhibited by the tested strains (presence or absence of bands) were used for a hierarchical cluster analysis (HCA). With Statlab software (41), clustering was based on the Euclidean distance between strains (Ward's method [46]). The truncation level in the resulting dendrogram was thus determined to be that which provided the smallest number of clusters for which the variance within clusters was significantly ( $P = 0.05$ ) different from the variance between clusters.

## RESULTS

Specificity of primers to the *hrp* gene region of *R. solanacearum*. A suitable amplification pattern was obtained with only 6 of the 11 pairs of primers, giving fragments ranging from 213 to 1,993 bp (according to the sequence of the reference strain GMI1000). The amplified fragments were distributed along the *hrp* gene region and cover a variable number of genes (two to four) which have been previously defined: RS20-RS201, 1,452 bp over *hrpV*-*hrpU*-*hrpT*-*hrpQ*; RS30-RS31, 1,993 bp over *hrpO*-*hrpN*; RS50-RS501, 1,200 bp over *hrpN*-*hrpK*-*hrpJ*-*hrpI*; RS600-RS61, 905 bp, and RS80-RS81, 1,537 bp, both over *hrpC*-*hrpB* (Fig. 1); and RS90-RS91, 213 bp over *hrpB*-*hrpA*.

For each of the six pairs of primers which led to a suitable amplification and for all of the tested strains which belonged to *R. solanacearum*, a single band with the expected size was observed. However, the density of the band appeared to be variable depending upon the pair of primers and the bacterial DNA. In contrast, no amplification could be obtained for strains belonging to another bacterial species even for such closely related species as *R. europlora* or *R. pickettii* (data not shown).

**Restriction endonuclease analysis of specific amplified *hrp* sequences.** The six amplified DNA fragments, which were con-

sidered to be specific to *R. solanacearum*, were digested with the 13 selected restriction endonucleases. Different restriction patterns among the 120 strains of *R. solanacearum* were observed with different restriction endonucleases: *Ava*I (four patterns) and *Pvu*II (four patterns) for the RS20-RS201 sequence; *Hind*II (six patterns) for the RS30-RS31 sequence; *Sac*I (three patterns) for the RS50-RS501 sequence; *Hae*II (six patterns) for the RS600-RS61 sequence; *Bss*HII (six patterns), *Nsi*I (three patterns), and *Pst*I (four patterns) for the RS80-RS81 sequence (Fig. 2).

**Clustering of the PCR-RFLP profiles.** Among the 120 strains of *R. solanacearum*, 15 different profiles could be distinguished (Table 2). A profile was the result of the combination of the RFLP patterns given by the eight restriction endonucleases which generated polymorphism and which were selected for the data analysis. The HCA resulted in a dendrogram showing the genetic relatedness between strains (Fig. 3). The truncation level allowed separation of eight PCR-RFLP clusters designated clusters I to VIII. While five clusters (II, III, IV, V, and VIII) contained a unique profile, the three remaining contained two (cluster VII), three (cluster I), and five (cluster VI) different profiles. The number of strains in each cluster ranged from 1 to 40, but each cluster contained strains belonging to the same biovar, with the exception of cluster VI, which included strains of biovars 3 and 4. Biovar 1 strains were distributed over five clusters (I, II, III, V, and VII), biovar 3 was grouped into both cluster VI and cluster VIII (only one strain within the latter), and the 36 strains belonging to biovar 2 were grouped together in cluster IV.

Most restriction patterns were common to different clusters. However, the restriction patterns AA<sub>v1</sub>, BH<sub>i1</sub>, DH<sub>a1</sub> (one exception), and EB<sub>s1</sub> appeared to be specific to cluster VII whereas BH<sub>i4</sub> and DH<sub>a4</sub> characterized cluster I (pattern designations are explained in Table 2). In addition, BH<sub>i5</sub> and CS<sub>a3</sub> were characteristic of the unique strain within cluster VIII, and DH<sub>a6</sub>, EB<sub>s6</sub>, EN<sub>o3</sub>, and EP<sub>s4</sub> seemed to be specific to cluster V. Similarly, when the distribution of the restriction patterns within the biovars was analyzed DH<sub>a2</sub> was found only in biovar 2 strains and BH<sub>i3</sub>, DH<sub>a3</sub>, and EB<sub>s3</sub> were found only in biovars 3 and 4.

The restriction patterns generated by *Hae*II (DH<sub>a1</sub> to DH<sub>a6</sub>) and *Bss*HII (EB<sub>s1</sub> to EB<sub>s6</sub>) appeared to be the most useful for separating the eight clusters and distinguishing the three biovars (Table 3). Strains of biovars 2 and 3 or 4 had a unique distinctive profile, DH<sub>a2</sub>-EB<sub>s2</sub> and DH<sub>a3</sub>-EB<sub>s3</sub>, respectively, and were classified either in cluster IV or in clusters VI and VIII, while the biovar 1 strains displayed five different profiles which characterized the five remaining clusters.

In addition, the dendrogram obtained suggests that these *R. solanacearum* strains can be separated into two distinct groups, namely, clusters I to V (all biovar 2 strains and approximately 64% of biovar 1 strains) and clusters VI to VIII (all biovar 3

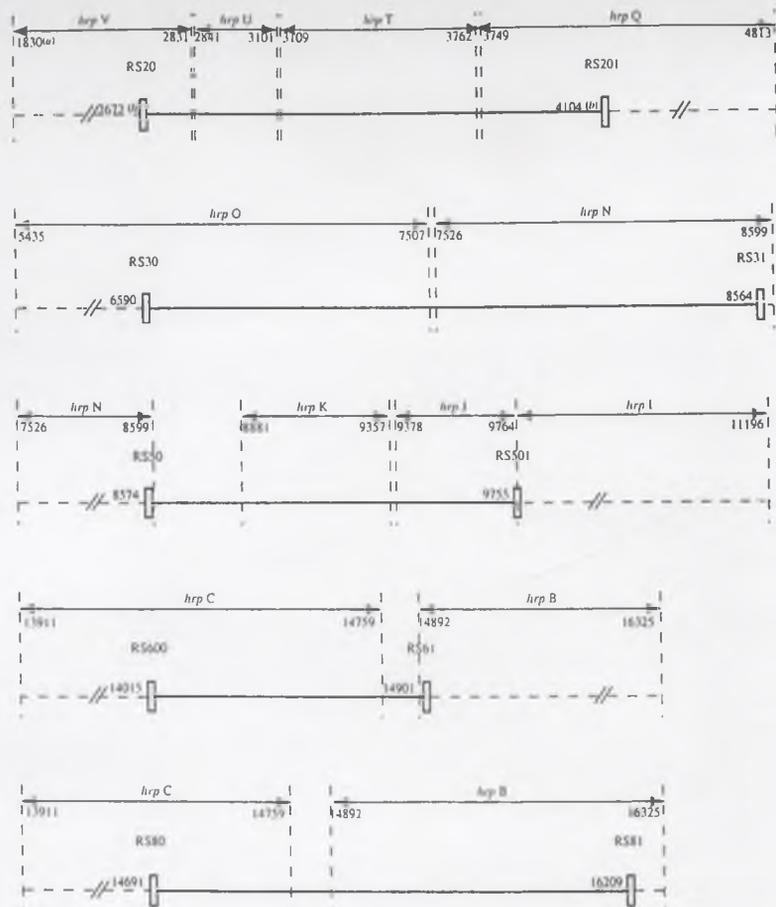


FIG. 1. Location of the five selected pairs of primers (RS20-RS201, RS30-RS31, RS50-RS501, RS60-RS61, and RS80-RS81) within the *hrp* genes of *R. solanacearum* (strain GMI1000). (a), number of the base on the 5'-3' DNA sequence; (b), number of the base at the 5' end of the primer.

and 4 strains and about 36% of biovar 1 strains). The diversity within biovar 1 appeared to be correlated with geographic origin since all strains belonging to cluster VII were isolated from Africa, mainly from the southern part (Angola, Zimbabwe, Madagascar, and Reunion Island), while most (85%) of those included in clusters I, II, III, and V originated from the Americas. Some strains isolated from northern Africa (Burkina Faso and Kenya) belonged, however, to clusters I and II. The 36 biovar 2 strains fell into cluster IV regardless of geographic origin: Africa, Americas, Asia, Europe, or Oceania. There were no differences in profile between biovar 3 and biovar 4 strains, and all (one exception) were gathered in one cluster (VI), but five profiles were identified, which separated five

subclusters. The subcluster VIa included many Asiatic strains (46%), VIb included most African strains (83%), and 69% of the American strains were included in subcluster VIc.

Cluster V contained four strains which were isolated from hosts of the *Musaceae* family and was characterized by a profile which included the specific restriction patterns DHa6, EB56, ENo3, and EPs4. It must be noted that the sum of sizes of the restriction fragments included in DHa6 and EPs4 appeared to be higher (41 and 30 bp, respectively) than the total size of the corresponding amplified fragment, suggesting that an inserted sequence may be present (Fig. 4). This was characteristic only of the strains belonging to cluster V. Three other strains isolated from *Musa* sp. were distributed either into cluster III or

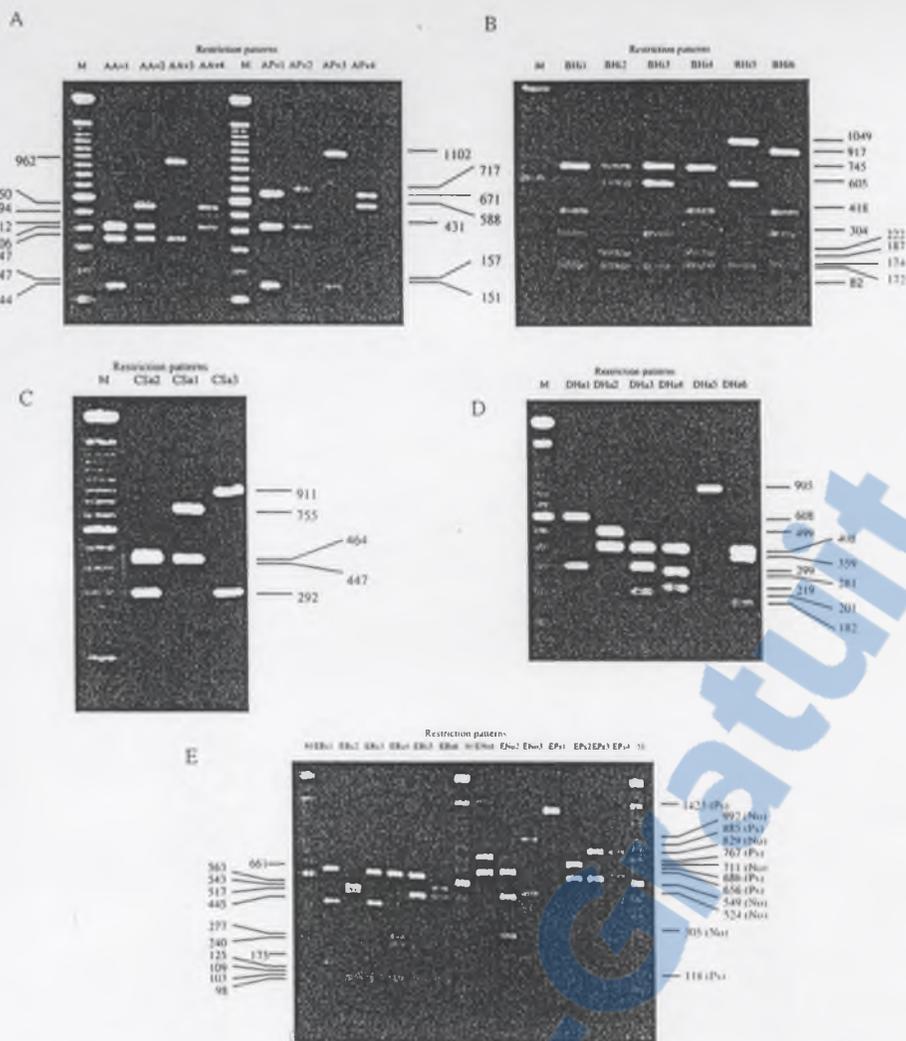


FIG. 2. Restriction patterns (see explanation in Table 2) of the five amplified fragments of the *hrp* gene region of *R. solanacearum* when digested by the designated enzymes. (A) RS20-RS301 *Aat*I (left side) and *Pvu*II (right side); (B) RS30-RS31 *Hma*II; (C) RS50-RS501 *Sac*I; (D) RS600-RS61 *Hae*II; (E) RS80-RS81 *Bsp*HI (left side), *Not*I (right side), and *Pst*I (right side). M, molecular size markers (100-bp ladder; GIBCO BRL). The size (in base pairs) of the bands was estimated from the sequence of the *hrp* gene region of the GM1000 strain.

into cluster VI. There was no obvious correlation between the host origin of strains and their distribution into clusters.

**Variability in restriction sites in the *hrp* gene region of *R. solanacearum*.** Thirty-six restriction sites were identified within the five amplified fragments when the eight selected enzymes

were used (Fig. 4). Eight sites appeared to be common to all 120 strains (A5, A7, B4, B5, E12, E13, E14, and E15). The occurrence of the 28 remaining sites was variable according to the RFLP clustering of the strains. However, 14 among them appeared to be particularly remarkable since they could sepa-

TABLE 2. Characterization of the 15 PCR-RFLP profiles identified among the 120 strains of *R. solanacearum*

PCR-RFLP profile*	Cluster or subcluster
AAv2; APv1; BH4; CSa2; DHa4; EBs4; ENo2; EPs3	Ia
AAv3; APv1; BH4; CSa2; DHa4; EBs4; ENo2; EPs3	Ib
AAv2; APv3; BH4; CSa2; DHa4; EBs4; ENo2; EPs3	Ic
AAv2; APv1; BH2; CSa1; DHa5; EBs5; ENo2; EPs3	II
AAv4; APv2; BH2; CSa2; DHa5; EBs2; ENo2; EPs2	III
AAv2; APv2; BH2; CSa2; DHa2; EBs2; ENo2; EPs2	IV
AAv2; APv2; BH2; CSa2; DHa6; EBs6; ENo3; EPs4	V
AAv2; APv1; BH3; CSa1; DHa3; EBs3; ENo1; EPs1	Vla
AAv3; APv1; BH3; CSa1; DHa3; EBs3; ENo1; EPs1	Vlb
AAv2; APv3; BH3; CSa1; DHa3; EBs3; ENo1; EPs1	Vlc
AAv3; APv4; BH3; CSa1; DHa3; EBs3; ENo1; EPs1	Vld
AAv2; APv1; BH6; CSa1; DHa3; EBs3; ENo1; EPs1	Vle
AAv1; APv4; BH1; CSa1; DHa1; EBs1; ENo1; EPs1	Vlla
AAv1; APv1; BH1; CSa1; DHa1; EBs1; ENo1; EPs1	Vllb
AAv4; APv2; BH5; CSa3; DHa1; EBs3; ENo1; EPs1	VIII

\* A profile was the combination of eight restriction patterns generated through the digestion of the five amplified fragments by the designated enzymes. Each pattern was given a code containing three letters and one number: the first letter refers to the amplified fragment (A as delineated by primers RS20-RS201, B by RS30-RS31, C by RS50-RS501, D by RS600-R61, and E by RS80-RS81), the following letters indicate the enzyme (*Ava*I, *Pvu*II, *Hind*III, *Sac*I, *Hae*II, *Bss*HII, *Not*I, and *Pst*I), and the number refers to the pattern generated by the enzyme.

rate the biovars and/or the geographic or botanical origins (Table 4).

A1 was identified within all but one biovar 3 or biovar 4 strain and within all biovar 1 strains except those isolated from musaceous plants. A2 characterized the African biovar 1 strains (cluster VII). In contrast, E11 was absent only from these African biovar 1 strains. B1 was present in all biovar 2 strains and also in all biovar 1 strains except those originating

TABLE 3. Distribution of the restriction patterns generated by *Hae*II on the RS600-RS61-amplified fragment and by *Bss*HII on the RS80-RS81-amplified fragment of the *hrp* gene region of *R. solanacearum* according to the PCR-RFLP cluster and to the biovar

Biovar	PCR-RFLP cluster	Restriction pattern with:	
		<i>Hae</i> II	<i>Bss</i> HII
1	I	DHa4	EBs4
1	II	DHa5	EBs5
1	III	DHa5	EBs2
1	V	DHa6	EBs6
1	VII	DHa1	EBs1
2	IV	DHa2	EBs2
3/4	VI	DHa3	EBs3
3	VIII	DHa1	EBs3

from Africa (cluster VII). D2 was found in biovar 3 (and biovar 4) strains and in the African biovar 1 strains (cluster VII). B2 and C1 were present in all strains except one strain (cluster VIII). D3 and E7 were characteristic of American biovar 1 strains (cluster I). E2 characterized all biovar 2 strains and also biovar 1 strains isolated from musaceous plants (clusters III and V). These musaceous clusters could be separated by four sites characterizing strains grouped in cluster V: D4, E5, E6, and E8.

An additional HCA, based on the presence or absence of discriminating restriction sites, gave a slightly different cluster distribution. The truncation then separated six groups, one joining the PCR-RFLP clusters I and II and the other joining clusters III and IV.

## DISCUSSION

The exploration of the *hrp* gene region with 11 selected pairs of primers gave six amplicons which were confirmed to be specific to *R. solanacearum*. Indeed, no amplification was observed with DNA from strains belonging to other bacterial species and even from such closely related species as *R. pickettii*, *R. eutropha*, and *B. cepacia*. Consequently, the *hrp* region seems to be useful for the identification and specific detection of strains of *R. solanacearum*. However, since we did not succeed in getting strains of *Pseudomonas celebense* and *Pseudomonas syzygii* from laboratory collections, which are also species close to *R. solanacearum*, the amplification within their *hrp* region when the selected primers were used was not checked. Nevertheless, since our main objective was to develop molecular tools for the detection of populations of *R. solanacearum* on Reunion Island and since these particular pathogenic species (*P. celebense* and *P. syzygii*) were recorded only in Indonesia on bananas and cloves, respectively, a lack of specificity in that case would be of no consequence.

Although we concentrated mainly on the strains originating from Reunion Island (28 strains), the remaining 92 isolates were chosen to represent the broad host range, wide geographic distribution, and metabolic diversity (biovars) of *R. solanacearum*. Although our analysis gave a lower resolution level than that seen after genomewide RFLP analysis (12-14), we found that it gave reliable estimates of phylogenetic relationships among strains of *R. solanacearum*. Whereas the 46 described RFLP profiles were correlated with geographic origin, biochemical typing, and host origin, we identified 15 PCR-RFLP profiles distributed into eight clusters, these clusters being correlated with biochemical typing and to a lesser degree with geographic origin. Since some PCR-RFLP patterns cor-

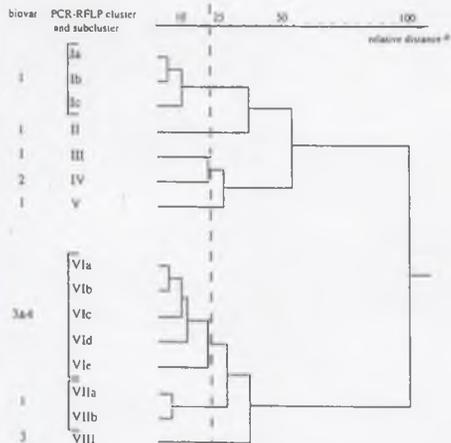


FIG. 3. Dendrogram resulting from an HCA based on the restriction patterns of the five amplified fragments within the *hrp* gene region of 120 strains of *R. solanacearum*. a, the relative distance between the farthest clusters was assumed to be 100.

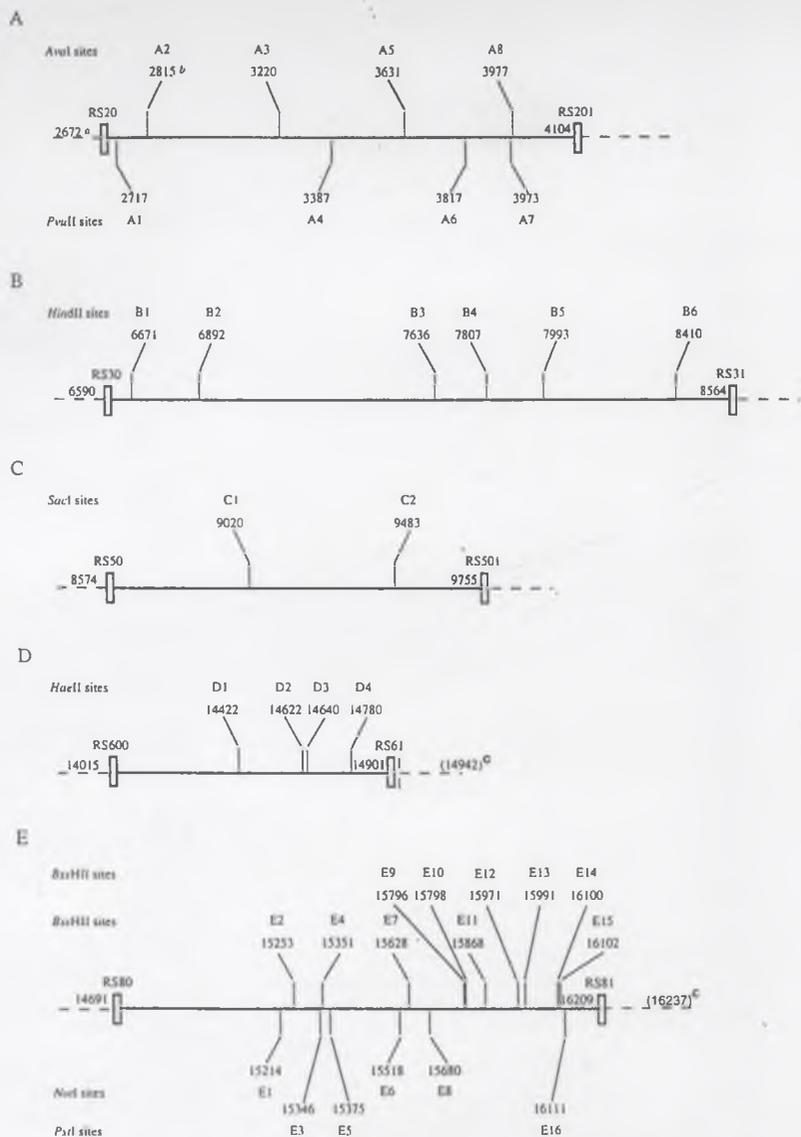


FIG. 4. Location of the 36 restriction sites identified in the five amplified fragments of the *hrp* gene region of *R. solanacearum* when digested by *Ava*I and *Pvu*II for RS20-RS201 (A); by *Hind*III for RS30-RS31 (B); by *Sac*I for RS50-RS501 (C); by *Hae*III for RS600-RS61 (D); and by *Bst*III, *Nco*I, and *Pvu*I for RS80-RS81 (E), as estimated from the DNA sequence of strain GM11000 and the size of the bands of the restriction patterns. a, number of the base at the 5' end of the primer; b, number of the base at left of the restriction site; c, the size of the amplified fragment was higher for the four strains of cluster V.

TABLE 4. Occurrence of 14 discriminating restriction sites identified within the five amplified fragments of the *hrp* gene region of *R. solanacearum* according to biovar typing, geographic or host origin, and PCR-RFLP clustering

Biovar	Origin	PCR-RFLP cluster	Result for restriction site:														
			A1 <sup>b,d</sup>	A2 <sup>d</sup>	B1 <sup>c,d</sup>	B2 <sup>d</sup>	C1 <sup>d,e</sup>	D2 <sup>d</sup>	D3 <sup>d</sup>	D4 <sup>d</sup>	E2 <sup>d,m</sup>	E5 <sup>d,m</sup>	E6 <sup>d,m</sup>	E7 <sup>d,m</sup>	E8 <sup>d,m</sup>	E11 <sup>d,m</sup>	
1	Americas <sup>a</sup>	I	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
1	Americas <sup>a</sup>	II	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
1	Africa	VII	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
1	Musaceae <sup>e</sup>	III	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
1	Musaceae	V	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
2	Worldwide	IV	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
3	Worldwide	VI	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3	Asia	VIII	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
4	Asia, Oceania	VI	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

<sup>a</sup> *Ava*I site.<sup>b</sup> *Pvu*II site.<sup>c</sup> *Hind*III site.<sup>d</sup> *Sac*I site.<sup>e</sup> *Hae*III site.<sup>f</sup> *Bss*III site.<sup>g</sup> *Nor*I site.<sup>h</sup> *Pst*I site.<sup>i</sup> Located between the RS20 and RS201 pair of primers.<sup>j</sup> Located between RS30 and RS31.<sup>k</sup> Located between RS50 and RS51.<sup>l</sup> Located between RS600 and RS61.<sup>m</sup> Located between RS80 and RS81.<sup>n</sup> All strains originated from the Americas except for one from Africa.<sup>o</sup> All strains originated from the Americas except for three from Africa.<sup>p</sup> All strains were isolated from musaceous plants except for one from potato.

related well with biovar typing, the PCR-RFLP procedure provides a complementary or alternative method for biovar determination.

The PCR-RFLP analysis confirmed the great variability within *R. solanacearum*. Biovar 1 strains showed the greatest diversity since they were distributed into five of the eight clusters. Six biovar 1 strains originating from the *Musaceae* family were distributed into two specific clusters, one (cluster V) including four of these strains and the other (cluster III) comprising the two remaining strains together with one strain isolated from potato. Among the 36 restriction sites identified on the five amplified fragments, only 25 were common to the musaceous strains, whereas there were 28 sites common to biovar 2 and biovar 3 strains. Moreover, among the 12 discriminating restriction sites located on the fragment delineated by the RS80-RS81 primer pair, only three were common to both clusters III and V while all were shared by clusters III and IV. These features suggest that there are important differences between the musaceous strains distributed in two separate clusters. All of these strains came from Central America or northern South America, but nothing was known of their pathogenicity, and no clear indication of the race to which they belonged was reported. The strains of cluster V could belong to race 2, whereas those of cluster III might be associated with race 1, which could explain the presence of the Colombian strain isolated from potato within the cluster. One particular strain isolated from *Musa* sp. and characterized as belonging to biovar 3 (36) fell into cluster VI, as most of the strains were related to the same biovar. Further studies incorporating more strains isolated from *Musaceae* and belonging either to race 1 or to race 2 are required.

Clusters I and II included all biovar 1 strains originating from the Americas, more specifically, either from North America for cluster I or from Central America for cluster II. The fact that four African isolates fell into these clusters suggests that they could have been introduced from the Americas. Most

biovar 1 strains isolated from African countries, however, were included in cluster VII. All of these strains originated from southern Africa, including Reunion Island, Madagascar, Zimbabwe, and Angola, whereas the African isolates from clusters I and II came from the northern part of Africa (Burkina Faso and Kenya). Thus, Africa may have two different biovar 1 populations, either endemic and commonly isolated in southern countries or introduced from the Americas through direct or indirect commercial exchanges. Although both populations belonged to the same biovar, there was no indication that they have similar host ranges (and/or similar virulence).

The 36 strains of biovar 2 displayed a similar profile which was characterized by the specific restriction pattern DHa2 and were included in cluster IV, close to those encompassing the biovar 1 strains of American origin. The consistent homogeneity of biovar 2 strains, although they were collected from 20 countries distributed worldwide, could be attributed to their narrow host range, including only potato and tomato plants. The result agrees with the commonly accepted hypothesis of a common origin for all the biovar 2 strains. South America is the presumed origin, and the wide distribution of these strains is probably due to the dissemination of latently infected plant material (particularly potato tubers) by humans (8, 10, 22). The biovar 2 strains (cluster IV) are closely related to cluster III strains, since 34 of the 36 restriction enzyme sites were common to both clusters, underlining the proximity of some musaceous isolates to race 3 strains.

Compared to biovar 1 strains, biovar 3 strains showed rather modest genetic diversity since they could be assigned to one major cluster. An additional cluster with a unique strain originating from Japan was also described. The few biovar 4 strains fell into the same cluster as most biovar 3 strains, indicating that there were only slight differences between the biovars. However, six different profiles more or less correlated with geographic origin (Asia, cluster VIa; Reunion Island, cluster VIb; America, cluster VIc) were identified.

The dendrogram resulting from an HCA revealed the separation of *R. solanacearum* into two major divisions. This result confirmed the conclusion of many previous studies on DNA homologies and physiological characterization of strains (20, 34) and more recently of RFLP analysis (12-14), of 16S rRNA sequencing (30, 40, 43), or of PCR amplification with tRNA consensus primers (39). The first division, Americanum sensu Cook et al. (12), contains biovar 1 and 2 strains, and the second division, Asiaticum sensu Cook et al. (12), includes biovar 3 and 4 strains. Thus, compared to other genomic regions (16S rRNA and tRNA), the *hrp* gene region, which is involved in host-pathogen interactions, revealed the same major trend of diversity, suggesting that *hrp* genes have evolved in parallel with 16S rRNA and tRNA.

The amplified fragment delineated by the RS80-RS81 pair of primers provided much more polymorphism than all the others: 12 discriminating restriction sites were identified and permitted separation of certain groups of strains. All of these polymorphisms were located within the *hrpB* regulatory gene (16). This observation confirms that regulatory systems of bacteria seem to be less conserved than those genes whose function they govern (5). Furthermore, this result suggests that the *hrp* regulatory gene may have other metabolic functions besides its role in pathogenic diversity of *R. solanacearum*. More precise analysis of the *hrpB* gene in different strains in the future might provide a useful way of relating pathogenicity gene function to genetic diversity.

Although the dendrogram confirms the separation of *R. solanacearum* into two groups, the distribution of biovar 1 strains, which displayed a rather wide variability, did not agree completely with the scheme proposed by Cook et al. (12). Clusters I, II, III, and V (American biovar 1 strains) were close to cluster IV, which included biovar 2 strains, and would thus belong to the Americanum division, whereas cluster VII (African biovar 1 strains) near cluster VI (biovar 3 and 4 strains) would be separated and connected rather to the Asiaticum division. The African strains included in cluster VII could have evolved separately as a result of geographic isolation and thereby have contributed to increasing the diversity of the species. Clearly, further analysis with other techniques such as DNA probes for RFLP analysis (12-14) and/or 16S rRNA sequencing (30, 40, 43) to confirm other characteristic features of these strains would be of interest. Preliminary results obtained with the *R. solanacearum*-specific primer pair PS96-H and PS96-I (38) support the hypothesis of separate evolution of these strains, since these primers never led to amplification of any biovar 1 strain originating from Reunion Island, Madagascar, Zimbabwe, or Angola (data not shown). Whatever the explanation, these African biovar 1 strains shared more sites with biovar 3 strains (23 sites) than with the American biovar 1 strains (13 to 19 sites according to the cluster), and the conclusion is that American and African biovar 1 strains are phylogenetically distinct, the latter being more closely related to Asiatic (biovar 3 and 4) strains.

Our study of the genetic diversity of the *hrp* gene region of *R. solanacearum* thus provides discriminating tools which besides being useful for fundamental research can also be used for diagnostic purposes. For example, biovars 1 and 2 and the combination of biovars 3 and 4 can easily be distinguished from each other by the restriction pattern generated after amplification with the RS600 and RS61 primers when digested by *Hae*III: DHa3 for biovars 3 and 4; DHa2 for biovar 2; and DHa1, DHa4, DHa5, or DHa6 for biovar 1. Moreover, the restriction pattern could give useful information about the geographic origin of the biovar 1 strain. As PCR amplification is known to be a very sensitive technique, such primers could

be used to detect the populations of *R. solanacearum* in plant, irrigation water, or soil extracts. They could also be employed to clarify some aspects of the epidemiology of bacterial wilt regarding, for instance, seed as a vehicle of disease spread or some weeds or resistant plants as possible carriers of low levels of infectious populations.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

We are grateful to A. Couteau and J. J. Chéron for technical assistance. We thank N. Grimsley, P. Prior, C. Boucher, and O. Pruvost for critical reading of the manuscript and L. Gardan, A. Aspin, J. Young, C. Allen, C. Boucher, and K. Tsuchiya for providing strains.

#### REFERENCES

- Arlat, M., C. L. Gough, C. Zischek, P. A. Barberis, A. Trigalet, and C. A. Boucher. 1992. Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:187-193.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1991. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates-Wiley Interscience, New York, N.Y.
- Beer, S. V., D. W. Bauer, X. H. Jiang, R. J. Laby, B. J. Sneath, Z. M. Wei, D. A. Wilcox, and C. H. Zumoff. 1991. The *hrp* cluster of *Erwinia amylovora*, p. 53-60. In H. Henneke and D. P. S. Verma (ed.), Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions, vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bonas, U., R. Schulte, S. Fenselau, G. V. Minsavage, B. J. Staskiewicz, and R. E. Stall. 1991. Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:81-88.
- Boucher, C. A. Personal communication.
- Boucher, C. A., C. L. Gough, and M. Artat. 1992. Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30:443-461.
- Buddenhagen, I. W., L. Sequeira, and A. Kelman. 1962. Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726.
- Buddenhagen, I. W. 1986. Bacterial wilt revisited. *ACIAR Proc.* 13:126-143.
- Clamp, L., and L. Sequeira. 1980. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in resistant potato plants and the establishment of latent infections. *Am. Potato J.* 57:307-316.
- Clamp, L., L. Sequeira, and E. R. French. 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 57:377-386.
- Cobb, B. D., and J. M. Clarkson. 1994. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res.* 22:3801-3805.
- Cook, D., E. Barlow, and L. Sequeira. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:113-121.
- Cook, D., E. Barlow, and L. Sequeira. 1991. DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*, p. 103-108. In H. Henneke and D. P. S. Verma (ed.), Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions, vol. 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Cook, D., and L. Sequeira. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods, p. 77-93. In A. C. Hayward and G. L. Hartman (ed.), Bacterial wilt, the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Dianese, J. C., and M. C. G. Dristig. 1994. Strain characterization of *Pseudomonas solanacearum* based on membrane protein patterns, p. 113-121. In A. C. Hayward and G. L. Hartman (ed.), Bacterial wilt, the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Genin, S., C. L. Gough, C. Zischek, and C. A. Boucher. 1992. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 6:3065-3076.
- Girard, J. C., J. F. Nicole, J. J. Chéron, A. M. Gaubic, O. Huvier, B. Oudard, and H. Suzor. 1993. Bacterial wilt due to *Pseudomonas solanacearum* in Reunion: general situation and current research. *ACIAR Proc.* 45: 343-347.
- Gopalan, S., and S. Y. He. 1996. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. *Plant Dis.* 80:604-610.
- Granada, G. A., and L. Sequeira. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67:1084-1088.
- Harris, D. C. 1972. Intraspecific variations in *Pseudomonas solanacearum*. p.

- 289-292. In *Proceedings of the 3rd International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, Wageningen, The Netherlands.
21. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.
  22. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-89.
  23. Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*, p. 9-25. In A. C. Hayward and G. L. Hartman (ed.), *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
  24. Hayward, A. C., H. M. El-Nashaar, U. Nydegger, and L. De Lindo. 1990. Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 69:269-280.
  25. He, L. Y., L. Sequeira, and A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
  26. Janse, J. D. 1991. Intra and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acid analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* 14:335-345.
  27. Laguerre, G., M. R. Allard, F. Revay, and N. Amarger. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:56-63.
  28. Leite, R. P., Jr., G. V. Minsavage, U. Bonas, and R. E. Stall. 1994. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hpa* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1068-1077.
  29. Lindgren, P. B., R. C. Peet, and N. J. Panopoulos. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J. Bacteriol.* 168:512-522.
  30. Li, X., M. Dorsch, T. Del Dot, L. I. Sly, E. Stackebrandt, and A. C. Hayward. 1993. Phylogeny of biovars of *Pseudomonas solanacearum* based on sequencing of 16S rRNA. *ACIAR Proc.* 45:93-95.
  31. Manceau, C., and A. Horvais. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:498-505.
  32. National Biosciences, Inc. 1996. Oligo, primer analysis software, version 5.0. National Biosciences, Inc., Plymouth, Minn.
  33. Olsson, K. 1976. Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in Sweden. *EPPO Bull.* 6:199-207.
  34. Palleroni, N. J., and M. Doudoroff. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 107:690-696.
  35. Pegg, K., and M. Moffett. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husband.* 11: 696-698.
  36. Prior, P., and H. Steva. 1990. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Dis.* 74:13-17.
  37. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  38. Seal, S. E., L. A. Jackson, and M. J. Daniels. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3751-3758.
  39. Seal, S. E., L. A. Jackson, and M. J. Daniels. 1992. Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3759-3761.
  40. Seal, S. E., L. A. Jackson, J. P. W. Young, and M. J. Daniels. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139:1587-1594.
  41. SLP Statistiques. 1994. *Statlab* software, version 2.0. SLP Statistiques, Monterey, Calif.
  42. Stead, D. E. 1993. Classification and identification of *Pseudomonas solanacearum* and other pseudomonads by fatty acid profiling. *ACIAR Proc.* 45:49-53.
  43. Taghavi, M., C. Hayward, L. I. Sly, and M. Fegan. 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:10-15.
  44. Urakawa, H., K. Kita-Teukamoto, and K. Ohwada. 1997. 16S rRNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 152:125-132.
  45. Valleys, T., F. Perrele-Cartieaux, N. Rouard, C. Lora, G. Laguerre, and G. Soulas. 1997. PCR-RFLP analysis of 16S rRNA, *hpaA* and *hpaB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Lett.* 24:269-278.
  46. Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Am. Stat. Assoc. J.* 58:236-244.
  47. Yabuuchi, E., Y. Kossko, I. Yano, H. Hotta, and Y. Nishiuchi. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal for *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia eutropha*. *Microbiol. Immunol.* 39:897-904.

### III.1.2. Identification d'une nouvelle subdivision d'origine africaine au sein de l'espèce *R. solanacearum*

L'analyse par PCR-RFLP des gènes *hrp* de *R. solanacearum* a permis de mettre en évidence l'existence d'un groupe de souches de biovar 1, originaires de la zone Sud de l'Afrique. Ce groupe de souches a donc probablement évolué séparément des autres souches de biovar 1 connues de par le monde. Nous avons cherché à vérifier cette hypothèse par d'autres approches moléculaires.

Tout d'abord, cette étude de la diversité par PCR-RFLP a été complétée par l'analyse de nouvelles souches. Puis, dans le cadre d'une collaboration menée avec l'équipe de Trigalet (Laboratoire de biologie moléculaire des relations plantes micro-organismes de l'INRA/CNRS de Toulouse), nous avons mis en œuvre l'AFLP, technique décrite comme très discriminante mais jamais testée auparavant sur une collection mondiale de souches de *R. solanacearum*. Enfin, le séquençage de l'ADNr 16S, gène cible pour déterminer les relations phylogénétiques des micro-organismes (Woese, 1987), de certaines souches africaines de biovar 1 a été effectué et les séquences comparées à celles de souches étudiées par Taghavi *et al.* (1996).

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une publication intitulée « 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 » parue en 2000 dans la revue internationale « Microbiology ». Les principales conclusions sont rapportées dans le résumé dont figure ci-dessous la traduction française.

« La diversité génétique d'une collection mondiale de souches de *R. solanacearum*, agent responsable du flétrissement bactérien, a été évaluée en utilisant trois différentes méthodes moléculaires. L'analyse par PCR-RFLP de la région des gènes *hrp* a été étendue par rapport à la précédente étude et a révélé que cinq amplifiats sont obtenus pour toutes les souches de *R. solanacearum* mais aussi pour les souches appartenant à des taxons proches, *Pseudomonas syzygii* et le blood disease bacterium (BDB). Toutefois, ces trois taxons bactériens peuvent être différenciés par des profils de restriction différents. Les groupes PCR-RFLP, corrélés à la classification en biovar ainsi qu'à l'origine géographique des souches, ont été confirmés par AFLP. De plus, l'AFLP a permis une discrimination très fine des isolats et la différenciation de souches qui étaient identiques par PCR-RFLP. Les analyses par AFLP et PCR-RFLP ont confirmé les résultats des précédentes recherches qui avaient scindé l'espèce en deux divisions, mais ont révélé une subdivision supplémentaire comprenant des souches de biovar 1 originaires de la partie Sud de l'Afrique. Cette observation fut par ailleurs confortée par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S. »

L'article est présenté dans les pages suivantes.

## 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

Stéphane Poussier,<sup>1</sup> Danielle Trigalet-Demery,<sup>2</sup> Peggy Vandewalle,<sup>1</sup> Bruno Goffinet,<sup>3</sup> Jacques Luisetti<sup>1</sup> and André Trigalet<sup>2</sup>

Author for correspondence: Stéphane Poussier. Tel: +33 262 35 76 30. Fax: +33 262 35 76 41. e-mail: poussier@cirad.fr

<sup>1</sup> Laboratoire de Phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97448 Saint-Pierre Cedex, La Réunion, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, INRA-CNRS, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

<sup>3</sup> Unité de Biométrie et d'Intelligence Artificielle, INRA, BP27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex, France

The genetic diversity among strains in a worldwide collection of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt, was assessed by using three different molecular methods. PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region was extended from previous studies to include additional strains and showed that five amplicons were produced not only with all *R. solanacearum* strains but also with strains of the closely related bacteria *Pseudomonas syzygii* and the blood disease bacterium (BDB). However, the three bacterial taxa could be discriminated by specific restriction profiles. The PCR-RFLP clustering, which agreed with the biovar classification and the geographical origin of strains, was confirmed by AFLP. Moreover, AFLP permitted very fine discrimination between different isolates and was able to differentiate strains that were not distinguishable by PCR-RFLP. AFLP and PCR-RFLP analyses confirmed the results of previous investigations which split the species into two divisions, but revealed a further subdivision. This observation was further supported by 16S rRNA sequence data, which grouped biovar 1 strains originating from the southern part of Africa.

Keywords: bacterial wilt, PCR-RFLP, *hrp*, AFLP, 16S rRNA

### INTRODUCTION

*Ralstonia solanacearum* causes bacterial wilt of a wide range of crops (potato, tomato, tobacco, banana, ginger, peanut, etc.) and is one of the most important plant diseases in tropical, subtropical and warm temperate regions of the world (Hayward, 1991). *R. solanacearum* shows great phenotypic and genotypic diversity, usually being divided into five races based on host range (Buddenhagen *et al.*, 1962; He *et al.*, 1983; Pegg & Moffett, 1971) and six biovars based on biochemical properties (Hayward, 1964; Hayward *et al.*, 1990; He *et al.*, 1983). The use of RFLP (Cook *et al.*, 1989; Cook & Sequeira, 1994) allowed division of the species into two groups correlated with the geographical origin of

strains: the 'Americum' division contains biovar 1, 2 and N2 strains whereas the 'Asiaticum' division comprises biovars 3, 4 and 5 strains. Sequence analysis of the 16S rRNA gene (Li *et al.*, 1993; Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996), the 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region, the polygalacturonase gene and the endoglucanase gene (Fegan *et al.*, 1998) have confirmed the two divisions and revealed a further subdivision including Indonesian isolates.

However, recent PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region (Poussier *et al.*, 1999), including many African strains, which were rarely included in previous analyses of the genetic diversity of *R. solanacearum*, was not totally consistent with the above classification scheme since an African biovar 1 strains group belonged to the 'Asiaticum' division instead of the 'Americum' division. Therefore, to clarify the relationships between these biovar 1 strains originating from the Southern part of Africa and other *R. solanacearum* isolates, three different approaches were compared and are presented

**Abbreviations:** AFLP, amplified fragment length polymorphism; BDB, blood disease bacterium; HCA, hierarchical cluster analysis; UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic averages.

The GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AF207891–AF207897.

Table 1. *R. solanacearum*, *P. syzygii*, *R. pickettii* and the BDB strains used in this study

Strain*	Other designation†	Biovar or taxon	PCR-RFLP cluster and subcluster	AFLP cluster and profile‡	Geographical origin	Host
JS796	CFBP 1180	1	Ia	I 1	Puerto Rico	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS927	NCBBP 1225	1	Ia		Puerto Rico	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS833	UW30	1	Ia		Trinidad and Tobago	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JR659	CFBP 2047	1	Ib	I 2	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS783	CFBP 1036	1	Ib		United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT645	UW27	1	Ib		United States	<i>Nicotiana tabacum</i>
JS967	ICMP 7963	1	Ib	I 3	Kenya	<i>Solanum tuberosum</i>
JS831	UW26	1	Ic	I 4	United States	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS716	CFBP 705	1	IIa		Guyana	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS733	CFBP 2478	1	IIa	II 6	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS734	CFBP 2972	1	IIa	II 7	Martinique	<i>Solanum tuberosum</i>
JS768	CFBP 767	1	IIa		Guadeloupe	<i>Solanum tuberosum</i>
JS777	CFBP 770	1	IIa		Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS784	CFBP 1036	1	IIa		Martinique	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS794	CFBP 1162	1	IIa		Guadeloupe	<i>Nicotiana tabacum</i>
JS837	UW90	1	IIa		Brazil	<i>Nicotiana tabacum</i>
JS838	UW275	1	IIa	II 8	Costa Rica	<i>Melampodium perfoliatum</i>
JS830	UW256	1	IIa		Costa Rica	<i>Solanum tuberosum</i>
JS779	CFBP 715	1	IIa	II 9	Burkina Faso	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS912	CFBP 3057	1	IIa		Burkina Faso	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS770	CFBP 712	1	IIa	II 10	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>
JS845	CFBP 1175	1	IIa		Trinidad and Tobago	<i>Solanum melongena</i>
JS903	CFBP 3104	1	IIa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JT649	UW181	1	IIa	II 11	Venezuela	<i>Musa</i> sp. cv. plantain
JT652	UW469	1	IIb		Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>
JS740	CFBP 1415	1	III	III 12	Colombia	<i>Solanum tuberosum</i>
JS788	CFBP 1412	1	III		Colombia	<i>Musa</i> sp. cv. plantain
JS847	CFBP 1419	1	III		Costa Rica	<i>Musa</i> sp.
JT648	UW162	1	III	III 13	Peru	<i>Musa</i> sp. cv. plantain
JT509		2	IVa	IV 16	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT510		2	IVa	5	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT511		2	IVa	IV 19	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT512		2	IVa	IV 19	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT513		2	IVa	IV 19	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT514		2	IVa	IV 17	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT515		2	IVa	IV 17	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT516		2	IVa	IV 17	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1102		2	IVa		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1120		2	IVa		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1084		2	IVa		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1041		2	IVa		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1051		2	IVa		Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JQ1056		2	IVa	IV 27	Reunion Island	<i>Cyphomandra betacea</i>
JS780	CFBP 2148	2	IVa	IV 18	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1144		2	IVa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JS738	CFBP 1413	2	IVa		Australia	<i>Solanum tuberosum</i>
JS737	CFBP 1417	2	IVa		Australia	<i>Solanum tuberosum</i>
JS758	CFBP 1420	2	IVa	IV 25	Colombia	<i>Solanum phurejii</i>
JS792	CFBP 1810	2	IVa	IV 20	Haiti	<i>Solanum tuberosum</i>
JS774	CFBP 1414	2	IVa		Colombia	<i>Solanum tuberosum</i>

Table 1 (cont.)

Strain*	Other designation†	Biovar or taxon	PCR-RFLP cluster and subcluster	AFLP cluster and profile‡	Geographical origin	Host
JS887	CFBP 3785	2	IVa		Portugal	Unknown
JS895	CFBP 3673	2	IVa	IV 19	France	<i>Solanum tuberosum</i>
JS897	CFBP 3103	2	IVa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JS898	CFBP 3672	2	IVa		France	<i>Solanum tuberosum</i>
JS900	CFBP 3671	2	IVa		France	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS902	CFBP 3581	2	IVa		France	<i>Solanum tuberosum</i>
JS905	CFBP 3582	2	IVa	IV 19	Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>
JS908	CFBP 3525	2	IVa	IV 19	Morocco	<i>Solanum tuberosum</i>
JS907	CFBP 3858	2	IVa	IV 19	The Netherlands	<i>Solanum tuberosum</i>
JS925	NCBBP 1323	2	IVa	IV 19	Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>
JS926	NCBBP 1331	2	IVa	IV 22	India	<i>Solanum tuberosum</i>
JS928	NCBBP 2797	2	IVa	IV 19	Sweden	<i>Solanum dulcamara</i>
JS929	NCBBP 2505	2	IVa		Sweden	<i>Solanum tuberosum</i>
JS930	NCBBP 1489	2	IVa	IV 21	Madeira	<i>Solanum tuberosum</i>
JS931	NCBBP 1049	2	IVa	IV 26	Kenya	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS932	NCBBP 1614	2	IVa	IV 23	Malaysia	<i>Solanum tuberosum</i>
JS935	NCBBP 339	2	IVa		Israel	Unknown
JS937	NCBBP 1789	2	IVa	IV 24	Greece	<i>Solanum tuberosum</i>
JS939	NCBBP 1824	2	IVa		Egypt	<i>Solanum tuberosum</i>
JS942	NCBBP 1019	2	IVa	IV 24	Portugal	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS943	NCBBP 613	2	IVa	IV 24	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>
JS948	NCBBP 2088	2	IVa	IV 24	Nigeria	<i>Solanum tuberosum</i>
JT572	NCBBP 752	2	IVa	IV 24	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>
JT573	NCBBP 8088	2	IVa	IV 24	Rwanda	<i>Solanum tuberosum</i>
JT646	UW73	2	IVa		Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>
JT650	UW257	2	IVa		Costa Rica	<i>Solanum tuberosum</i>
JT653	UW470	N2	IVa		Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>
JT658	R361	N2	IVa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JT660	R578	N2	IVa		Peru	<i>Solanum melongena</i>
JT683	R587	N2	IVa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JT662	R330	N2	IVa		Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>
JT676	NCBBP 3990	N2	IVa		Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JT686	R572	N2	IVa	IV 29	Brazil	<i>Solanum americanum</i>
JT687	R564	N2	IVb		Brazil	<i>Solanum sysynbri</i>
JT677	NCBBP 3987	N2	IVb	IV 31	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>
JT689	R574	N2	IVc	IV 30	Peru	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT673	NCBBP 3985	N2	IVc		Peru	<i>Solanum melongena</i>
JT654	UW477	N2	IVd	IV 28	Peru	<i>Solanum tuberosum</i>
JS730	CFBP 1482	1	V		Panama	<i>Musa</i> sp.
JS775	CFBP 1409	1	V	III 14	Honduras	<i>Musa</i> sp.
JS793	CFBP 1183	1	V		Costa Rica	<i>Heliconia</i> sp.
JS791	CFBP 1416	1	V		Costa Rica	<i>Musa</i> sp. cv. plantain
JS748	CFBP 1416	1	V		Costa Rica	<i>Musa</i> sp. cv. plantain
JT644	UW9	1	V	III 15	Costa Rica	<i>Heliconia</i> sp.
JS781	CFBP 1185	3	Via	VI 43	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS836	UW8	3	Via	VI 44	Costa Rica	<i>Eupatorium odoratum</i>
JS842	UW119	3	Via		Costa Rica	<i>Solanum tuberosum</i>
JS940	NCBBP 500	3	Via	VI 45	Mauritius	<i>Vicia faba</i>
JS944	NCBBP 501	3	Via		Mauritius	<i>Brassica oleracea</i>
JS945	MAFF 301860	3	Via		Japan	<i>Capsicum annum</i>
JS954	NCBBP 502	3	Via		Mauritius	<i>Casuarina equisetifolia</i>

Table 1 (cont.)

Strain*	Other designation†	Biovar or taxon	PCR-RFLP cluster and subcluster	AFLP cluster and profile‡	Geographical origin	Host
JS955	NCBBP 503	3	Via		Mauritius	<i>Dahlia</i> sp.
JS743	CFBP 1418	3	Via		Costa Rica	<i>Heliconia</i> sp.
JS763		3	Via		Indonesia	Unknown
JS941§	NCBBP 3190	4	Via	VI 46	Malaysia	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS832	UW378	4	Via		China	<i>Olea</i> sp.
JS834	UW151	4	Via	VI 56	Australia	<i>Zingiber officinale</i>
JS835	UW360	4	Via		China	<i>Morus alba</i>
JS839	UW369	4	Via		China	<i>Arachis hypogaea</i>
JT651	UW359	4	Via		China	<i>Zingiber officinale</i>
JT517		3	Vib	VI 47	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT518		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Solanum melongena</i>
JT519		3	Vib		Reunion Island	Unknown
JT520		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT521		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT522		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT523		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT524		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JQ1060		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1123		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1090		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1114		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1072		3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Allium cepa</i>
JQ1104		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1138		3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1024		3	Vib		Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JQ1129		3	Vib		Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JQ1134		3	Vib	VI 49	Reunion Island	<i>Anthurium andreanum</i>
JS766	CFBP 726	3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Solanum melongena</i>
JS778	CFBP 2041	3	Vib	VI 48	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JS747	CFBP 726	3	Vib		Reunion Island	<i>Solanum melongena</i>
JT571	ICMP 759	3	Vib		Kenya	<i>Solanum melongena</i>
JT674	NCBBP 1045	3	Vib	VI 48	Kenya	<i>Solanum melongena</i>
JT678	NCBBP 1486	3	Vib	VI 48	Uganda	<i>Arachis hypogaea</i>
JT675	NCBBP 1763	3	Vib	VI 48	Seychelles	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT574	NCBBP 7960	4	Vib		Kenya	<i>Capsicum annum</i>
JS841	UW74	4	Vib	VII 58	Sri Lanka	<i>Solanum tuberosum</i>
JS933	MAFF 301418	4	Vib		Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT690	MAFF 211266	1	Vib	40	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT691	MAFF 211267	1	Vib	40	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS722	CFBP 1813	3	Vic		Guyana	<i>Solanum melongena</i>
JS718	CFBP 2480	3	Vic		Guadeloupe	<i>Solanum melongena</i>
JS729	CFBP 2965	3	Vic	VI 50	Guadeloupe	<i>Solanum melongena</i>
JS719	CFBP 2970	3	Vic		Martinique	<i>Capsicum annum</i>
JS715	CFBP 2976	3	Vic		Martinique	<i>Ensete ventricosum</i>
JS753	GMI1000	3	Vic	VI 52	Guyana	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS759	CFBP 1168	3	Vic	VI 50	Trinidad and Tobago	<i>Musa</i> sp.
JS772	CFBP 707	3	Vic	VI 53	Tahiti	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS773	CFBP 1960	3	Vic	VI 50	Algeria	<i>Capsicum annum</i>
JS840	UW147	3	Vic	VI 54	Australia	<i>Nicotiana tabacum</i>
JS843	UW130	3	Vic	VI 51	Peru	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT647	UW152	3	Vic		Australia	<i>Solanum tuberosum</i>

Table 1 (cont.)

Strain*	Other designation†	Biovar or taxon	PCR-RFLP cluster and subcluster	AFLP cluster and profile‡	Geographical origin	Host
JS782	CFBP 1038	3	Vlc		Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS888	CFBP 3258	3	Vlc		Unknown	Unknown
JS947	NCBBP 1123	4	Vlc	VII 59	Papua New Guinea	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS953	MAFF 301552	3	Vld	VI 55	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JS936	NCBBP 3181	3	Vle	57	Gambia	<i>Solanum nicanum</i>
JS904	CFBP 3059	1	Vle	32	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>
JT661	R292	5	Vlf	VII 60	China	<i>Morus alba</i>
JT685	R322	5	Vlf	VII 61	China	<i>Morus alba</i>
JS950	NCBBP 1018	1	VIIa	V 33	Angola	<i>Solanum tuberosum</i>
JT525	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT526	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT527	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT528	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JT529	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT530	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>
JT531	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>
JQ1040	1	1	VIIb	V 34	Reunion Island	<i>Lycopersicon esculentum</i>
JT532	1	1	VIIb		Reunion Island	Unknown
JS756	CFBP 2146	1	VIIb	V 35	Reunion Island	<i>Pelargonium capitatum</i>
JS767	CFBP 734	1	VIIb	V 36	Madagascar	<i>Solanum tuberosum</i>
JS946	NCBBP 283	1	VIIb	V 37	Zimbabwe	<i>Solanum panduraforme</i>
JS949	NCBBP 332	1	VIIb	V 38	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>
JS951	NCBBP 505	1	VIIb	V 39	Zimbabwe	<i>Symphytum</i> sp.
JS952	NCBBP 342	1	VIIb		Zimbabwe	<i>Nicotiana tabacum</i>
JS966	ICMP 748	1	VIIb		Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>
JS934§	MAFF 301558	N2	VIIc	62	Japan	<i>Solanum tuberosum</i>
JT656	R604	BDB	IXb	42	Indonesia	<i>Musa</i> sp.
JT657	R230	BDB	IXb		Indonesia	<i>Musa</i> sp.
JT680	NCBBP 3726	BDB	IXb		Indonesia	<i>Musa</i> sp.
	R006	<i>P. syzygii</i>	IXc		Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>
JV1010	R024	<i>P. syzygii</i>	IXa		Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>
JV1011	R028	<i>P. syzygii</i>	IXa		Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>
JR660	CFBP 2459	<i>R. pickettii</i>		41	Unknown	Unknown

\* Designation of strains of the Laboratoire de Phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97448 Saint-Pierre, La Reunion, France.

† CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK; ICMP, International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; UW, D. Cook and L. Sequeira, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, USA; GMI, M. Arlat and P. Barberis, CNRS-INRA, Auzeville, Castanet-Tolosan Cedex, France; MAFF, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Resources, Japan; R, Institute of Arable Crops Research-Rothamsted, Harpenden, UK.

‡ Roman numerals indicate AFLP clusters and arabic numerals indicate AFLP profiles.

§ Strains described in our previous paper (Poussier *et al.*, 1999) and reclassified as the result of a new biovar determination.

in this paper. Firstly, 59 additional strains of *R. solanacearum*, including biovar N2 and 5 strains and new African strains, were analysed using PCR-RFLP. Two close relatives of *R. solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* (causal agent of Sumatra disease of cloves) and the blood disease bacterium (BDB, causal agent of blood disease of bananas) (Eden-Green, 1994; Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996) were also analysed, permitting the specificity of our PCR-RFLP test and the phylogenetic relationships between these three bacteria

to be assessed. Secondly, we have used the very powerful DNA fingerprinting technique AFLP (Vos *et al.*, 1995), which allows very fine whole genome analysis. AFLP methodology has already been used to study the diversity of race 3 isolates of *R. solanacearum* (Van der Wolf *et al.*, 1998) but has never been used to analyse a worldwide collection of *R. solanacearum* strains. Finally, we have determined nearly complete 16S rRNA gene sequences for seven (five African, one American and one Japanese) biovar 1 strains of *R. solanacearum*, and compared these

with 19 previously sequenced *R. solanacearum* 16S rRNA gene sequences (Taghavi *et al.*, 1996).

## METHODS

**Bacterial strains and culture conditions.** Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Culture conditions and biovar determination of *R. solanacearum* isolates were as described previously (Poussier *et al.*, 1999).

**DNA isolation.** Genomic DNA of strains was extracted using the hexadecyltrimethylammonium bromide method (Ausubel *et al.*, 1991).

**PCR-RFLP analysis.** DNA amplification conditions and digestion with eight restriction endonucleases of the five PCR products were as previously described (Poussier *et al.*, 1999). Each PCR-RFLP was duplicated to assure its reproducibility. Two different Hierarchical Cluster Analysis (HCA) methods were used to analyse the PCR-RFLP band data collected. Using STATLAB version 2.0 (SLP Statistiques, Monterey, CA, USA), clustering was based on the Euclidean distance between strains (Ward, 1963). The truncation level in the resulting dendrogram was thus determined to be that which provided the smallest number of clusters for which the variance within clusters was significantly ( $P = 0.05$ ) different from the variance between clusters. Using the PHYLIP software package (Felsenstein, 1995), a distance matrix was firstly constructed with the Nei (1973) genetic distance of the GENDIST program. A dendrogram was then constructed from genetic distance values by using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) contained in the NEIGHBOR program. Finally, the strength of the tree topology was assessed by the bootstrap method (Felsenstein, 1985) of the SEQBOOT program.

**AFLP analysis.** Ninety-six *R. solanacearum* strains, one BDB strain and one *Ralstonia pickettii* strain were analysed using AFLP as described by Janssen *et al.* (1996) and Vos *et al.* (1995) with slight modifications. We used *Msp*I and *Sac*I to digest DNA instead of *Eco*RI and *Mse*I.

Genomic DNA (200 ng per sample) was digested for 2 h at 37 °C in 50 µl (final volume) containing 5 U *Msp*I, 5 U *Sac*I (Amersham Pharmacia Biotech), 0.125 µl BSA (10 µg µl<sup>-1</sup>) and 2.5 µl 10× 'One Phor All' buffer (Amersham). Next, 50 pmol double-stranded *Msp*I-adaptor (5'-GACGATGAGTCCTG-AA-3', 5'-CGTTCAGGACTCATC-3') (50 pmol µl<sup>-1</sup>), 5 pmol double-stranded *Sac*I-adaptor (5'-CTCGTAGACTCGCT-ACAAGCT-3', 5'-TGTACGCAGTCTAC-3') (5 pmol µl<sup>-1</sup>) (Genset), 1 µl ATP (10 mM), 1 U T4 DNA ligase (5 U µl<sup>-1</sup>) (Appligene) and 2.5 µl 10× 'One Phor All' buffer were added to the digested DNA and the ligation reactions were performed for 3 h at 20 °C. Digested (D) and ligated (L) DNA were diluted (D) eightfold and the resulting DLD DNA was then stored at 4 °C until used.

Selective amplifications were done with two primers (*Msp*I-primer and *Sac*I-primer) (Genset) complementary to the adaptor sequences, and the *Msp*I and *Sac*I restriction sites respectively, with additional selective nucleotides at their 3' ends (cytosine for the *Sac*I-primer and cytosine plus guanine for the *Msp*I-primer). The *Sac*I-primer was labelled with [<sup>32</sup>P] dATP (370 kBq) per DNA amplification; NEN Life Science Products and T4 polynucleotide kinase (Gibco-BRL).

DNA amplifications were carried out in a 50 µl reaction mixture. DLD DNA (5 µl) was added to 45 µl mixture containing 5 µl 10× PCR buffer (Gibco-BRL), 1.5 µl labelled *Sac*I-primer (50 µg µl<sup>-1</sup>), 1 µl unlabelled *Msp*I-primer (30 µg µl<sup>-1</sup>), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 8 µl of each dNTP (1.25 mM) and

0.6 µl *Taq* polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>; Gibco-BRL). Amplifications were performed with a thermocycler (Mastercycler gradient Eppendorf) by using the following protocol: 30 cycles consisting of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 56 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min.

Amplified fragments were separated by electrophoresis on 5% polyacrylamide gels and fingerprint patterns were visualized as described by Vos *et al.* (1995). The reproducibility of AFLP was assessed by comparing the DNA fingerprinting obtained from duplicate assays of 14 strains. Duplicate DNA fingerprints were produced using two aliquots from two different DNA amplifications that were run in different gels. AFLP data analysis was performed as described above for PCR-RFLP.

**16S rRNA sequencing.** Seven biovar 1 strains of *R. solanacearum* were used: CFBP 1036, CFBP 712, NCCPB 1018, CFBP 2146, CFBP 734, NCCPB 342 and MAFF 211266. 16S rRNA genes were amplified using the PCR as detailed by Taghavi *et al.* (1996) with slight modifications. PCR amplifications were carried out in a thermocycler (GeneAmp PCR system 9600; Perkin-Elmer) in a 50 µl (total volume) reaction mixture containing 10× buffer (200 mM Tris/HCl, 300 mM KCl, pH 8.4; Gibco-BRL), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Gibco-BRL) 200 µM of each dNTP (Boehringer Mannheim), 0.25 µM primer 27f, 0.25 µM primer 1523r (Genosys Biotechnologies) (Taghavi *et al.*, 1996), 1 U *Taq* polymerase (Gibco-BRL) and 100 ng template DNA. The following PCR profile was used: initial denaturation at 96 °C for 2 min; 30 cycles consisting of 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and final extension at 72 °C for 10 min.

PCR products were electrophoresed using 1% agarose gels at 5 V cm<sup>-1</sup> for 1 h and visualized with UV light after ethidium bromide staining. Amplification products were purified from the agarose gel slice by using the QIAquick purification kit PCR (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

PCR product sequences were determined by Cambridge Bioscience, Cambridge, UK. The GenBank accession numbers of the seven resulting 16S rRNA gene sequences are shown in Table 3. They were aligned using the 'gap proceed' program of the Genetics Computer Group software package (Genetics Computer Group, 1999) with the published 16S rRNA gene sequences of *R. solanacearum*, BDB and *P. syzygii* isolates studied by Taghavi *et al.* (1996). Data analysis was performed using the DNADIST (Jukes & Cantor, 1969) and NEIGHBOR (UPGMA method) programs of the PHYLIP software package, and using the STATLAB software.

## RESULTS

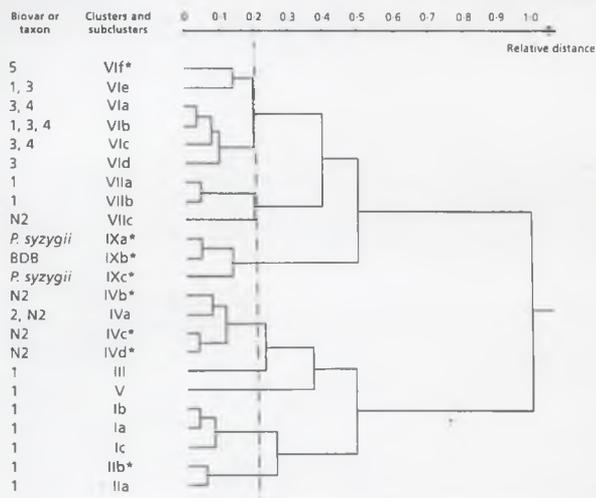
### PCR-RFLP analysis

Both of the bacteria closely related to *R. solanacearum* that were examined, *P. syzygii* and the BDB, which were not included in our previous study (Poussier *et al.*, 1999), gave a single band of the expected size after amplification using each of the five pairs of primers. After suitable digestion of the amplicons, the BDB and *P. syzygii* strains could be separated from the *R. solanacearum* strains. Indeed, their resulting profiles displayed specific restriction patterns (Table 2). Pattern DHa7 (band sizes 608 and 281 bp) was common to the BDB and *P. syzygii* strains whereas APv5 (band size 1452 bp; no *Pvu*II restriction site within the amplified fragment) was specific to *P. syzygii* strains. EBs7 (band sizes visible on gel 1106, 125, 109 bp) was produced by only one *P. syzygii* strain, R006. In addition, two restriction

**Table 2.** Characterization of the eight new PCR-RFLP profiles identified within the 59 additional strains of *R. solanacearum*, three BDB strains and three *P. syzygii* strains

PCR-RFLP profile*	Subcluster	Organism
AAv2, APv1, BHi2, CSa1, DHa2, EBs5, ENo2, EPs3	IIb	<i>R. solanacearum</i>
AAv2, APv2, BHi2, CSa2, DHa2, EBs5, ENo2, EPs2	IVb	<i>R. solanacearum</i>
AAv2, APv2, BHi2, CSa2, DHa2, EBs5, ENo3, EPs2	IVc	<i>R. solanacearum</i>
AAv2, APv2, BHi2, CSa2, DHa2, EBs2, ENo3, EPs3	IVd	<i>R. solanacearum</i>
AAv2, APv1, BHi7, CSa1, DHa3, EBs3, ENo1, EPs1	VIi	<i>R. solanacearum</i>
AAv2, APv5, BHi5, CSa3, DHa7, EBs3, ENo1, EPs1	IXa	<i>P. syzygii</i>
AAv2, APv2, BHi5, CSa3, DHa7, EBs3, ENo1, EPs1	IXb	BDB
AAv2, APv5, BHi5, CSa3, DHa7, EBs7, ENo1, EPs1	IXc	<i>P. syzygii</i>

\* A profile is the combination of eight restriction patterns generated through the digestion of the five amplified fragments by the designated enzymes. Each pattern was given a code containing three letters and one number; the first letter refers to the amplified fragment (A as delineated by primers RS20-RS201, B by RS30-RS31, C by RS50-RS501, D by RS600-R61 and E by RS80-RS81); the following letters indicate the enzyme (*Ava*I, *Pvu*II, *Hind*III, *Sac*I, *Hae*III, *Bes*HI, *Nor*I and *Pst*I); and the number refers to the pattern generated by the enzyme.

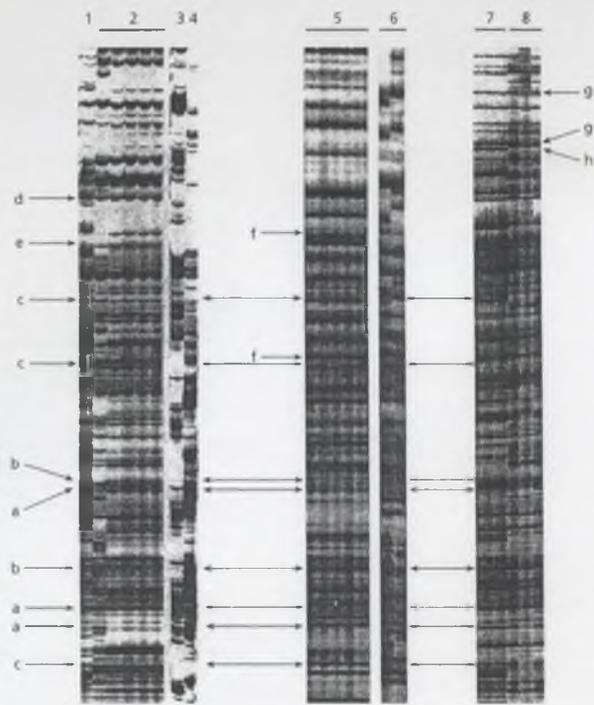


**Fig. 1.** Dendrogram resulting from a HCA (Ward, 1963) based on the restriction patterns of the five amplified fragments within the *hrp* gene region of the 184 strains of *R. solanacearum* and closely related bacteria (*P. syzygii* and the BDB). Asterisks indicate new subclusters as compared to those of Poussier et al. (1999). The relative distance between the farthest clusters is assumed to be 1. The biovar N2 strain MAFF 301558 was previously included in cluster VIII (Poussier et al., 1999) but according to the new HCA, it was included in subcluster VIIc.

patterns, BHi5 and CSa3, produced by the BDB and *P. syzygii* strains were shared with the unique *R. solanacearum* strain MAFF 301558.

The dendrogram resulting from a HCA (Fig. 1), produced by STATLAB or PHYLIP software packages, showed that *R. solanacearum* could be separated into two divisions. The first division comprised about 64% of biovar 1 strains and all of the biovar 2 and N2 strains; the second division contained about 36% of biovar 1 strains, all of the biovar 3, 4 and 5 strains and one biovar N2 strain MAFF 301558. The BDB and *P. syzygii* isolates fell into the second division. No significant difference was observed between clusterings resulting from either

of the two different software packages (results not shown). The dendrogram generated by the STATLAB software (Fig. 1) agreed with previous results (Poussier et al., 1999). However, amongst the additional strains, five new profiles and one new restriction pattern were identified (Table 2). In particular, the biovar 1 strain UW469 gave a new profile (IIb), whilst the Japanese and Burkina Faso biovar 1 strains (MAFF 211266, MAFF 211267 and CFBP 3059) were grouped with biovar 3 strains into subclusters VIIb and VIIc. Three of the identified biovar 1/race 2 isolates, UW9, UW162 and UW181, were distributed into three different clusters: subcluster IIa, cluster III and cluster V. Five of the twelve biovar N2 strains used generated three new profiles



**Fig. 2.** A selection of AFLP fingerprints of *R. solanacearum* strains and related bacteria. Lanes: 1, Japanese biovar 1, MAFF 211267; 2, African biovar 1, NCPBP 1018, JTS25, JTS26, JTS27, JTS28; 3, *R. pickettii*, JR660; 4, BDB, JTS57; 5, biovar 2, CFBP 3673, CFBP 3582, CFBP 3525, CFBP 3858, NCPBP 1323; 6, biovar N2, R572, R574; 7, African biovar 3, NCPBP 1045, NCPBP 1486, NCPBP 1763; 8, non-African biovar 3, CFBP 2965, GM1000, CFBP 1168. Arrows indicate examples of polymorphic and specific fragments. Fragments are specific to (a) *R. solanacearum* and the BDB; (b) *R. solanacearum*, *R. pickettii* and the BDB; (c) *R. solanacearum*; (d) African and Japanese biovar 1; (e) African biovar 1; (f) biovar 2 and N2; (g) biovar 3, 4 and 5; (h) African biovar 3. Since five images derived from three different gels were associated to make this figure, exact alignment was not always possible (symbolized by double-headed arrows).

(IVb, IVc and IVd) and thus could be distinguished from biovar 2 strains whereas the seven remaining biovar N2 strains could not be separated (subcluster IVa). All of the new African biovar 3 strains fell into a single subcluster (VIb). Two strains belonging to biovar 5 were characterized by a new profile, VI f, and a new restriction pattern, BHi7 (band sizes 779, 745, 304 and 172 bp).

#### AFLP analysis

One hundred and fifty-nine DNA fragments which were reproducibly detected, ranging from 50 to 350 bp, were selected for the analysis of 96 *R. solanacearum* strains and two isolates belonging to two closely related taxa: the BDB and *R. pickettii*. Amongst these, 62 different DNA fingerprints were identified. Different DNA fingerprints were generated from strains belonging to the same biovar (for example 23, 12 and 13 from biovars 1, 2 and 3, respectively), but also originating from the same geographical area (for instance 6 from biovar 2 strains from Reunion Island). Identical DNA patterns could be produced by strains originating from different countries (for example IV 19 was found in strains from 7 countries).

Depending on the strain, DNA patterns contained 50–80

different DNA bands (Fig. 2). Comparison of AFLP fingerprints revealed that 95% of the fragments were polymorphic. Three fragments appeared to be specific to *R. solanacearum* species. Moreover, five AFLP fragments were common to all *R. solanacearum* strains: three of them were shared with the BDB and *R. pickettii* strains and two of them were shared with only the BDB strains. One fragment was specific to the BDB isolate. Many of the DNA fragments were useful in distinguishing subgroups within *R. solanacearum* species. For instance, one fragment was found only in all of the biovar 1, 2 and N2 strains (except for the biovar N2 strain MAFF 301558). Eight fragments were produced by all of the biovar 3, 4 and 5 strains (with one, two or three exceptions depending on the fragment). No DNA band appeared to be specific to all biovar 1 strains; however one fragment was common to all *R. solanacearum* strains other than biovar 1 strains. African and Japanese biovar 1 isolates were characterized by three and two fragments, respectively. Six particular DNA bands were specific to biovar 2 and N2 isolates, except for strains JTS10 and MAFF 301558. Strain JTS10 (biovar 2) was unusual since it shared less than 60% of the AFLP fragments with other biovar 2 isolates. One fragment was common to all biovar N2 strains, except

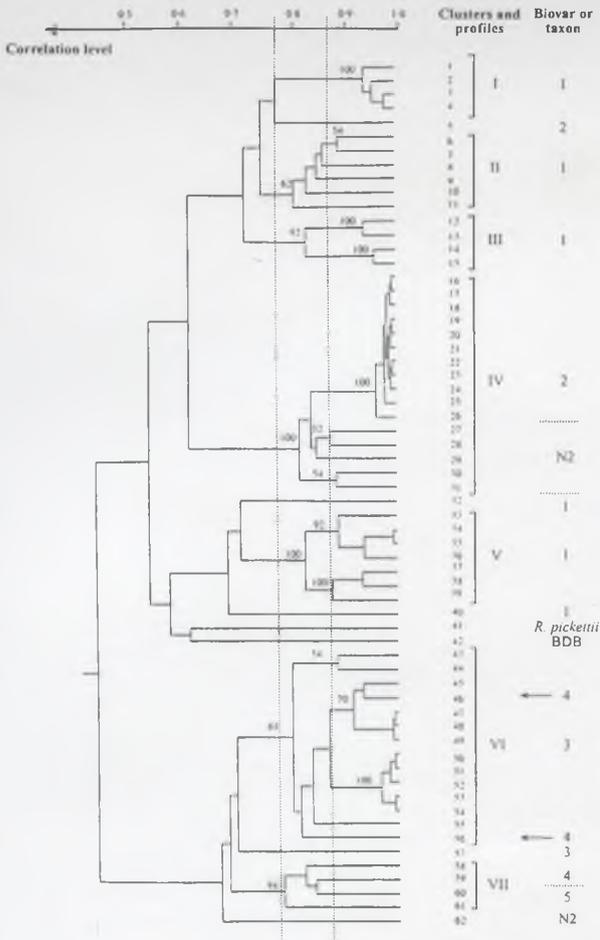


Fig. 3. Dendrogram constructed by using UPGMA showing correlation between AFLP fingerprints of 98 *R. solanacearum* strains and related bacteria (the BDB and *R. pickettii*). Roman numerals indicate clusters and arabic numerals indicate profile types. Numbers at the branch points are the percentages of bootstrap replicates in which the clusters were found.

for strains JT510, JQ1056 and MAFF 301558. Seventeen AFLP fragments could discriminate between the two similar biovars 2 and N2. One fragment was specific for biovar 3 strains (two exceptions) and one only for African biovar 3 strains. No fragments discriminating biovar 4 or 5 isolates were obtained, but these isolates were distinguished from biovar 3 strains by 14 DNA bands.

The dendrogram generated by the PHYLIP software package (Fig. 3) showed that *R. solanacearum* could be split into two divisions: the first division contained biovar 1, 2 and N2 isolates and the second division

contained biovar 3, 4 and 5 isolates (except for one particular biovar N2 strain, MAFF 301558). The truncation level, at 0.78 correlation, allowed separation of seven AFLP clusters designated clusters I–VII. High bootstrap values indicated that this clustering was well supported and the tree was robust. The close relatives of *R. solanacearum*, *R. pickettii* and the BDB, were found to be in the first division and exhibited specific AFLP profiles. Clusters appeared to be grouped according to biovar, geographical origin or host origin. Clusters I, II and III included biovar 1 strains originating from the Americas (three coming from Northern Africa) whilst cluster V contained biovar 1 strains originating from the

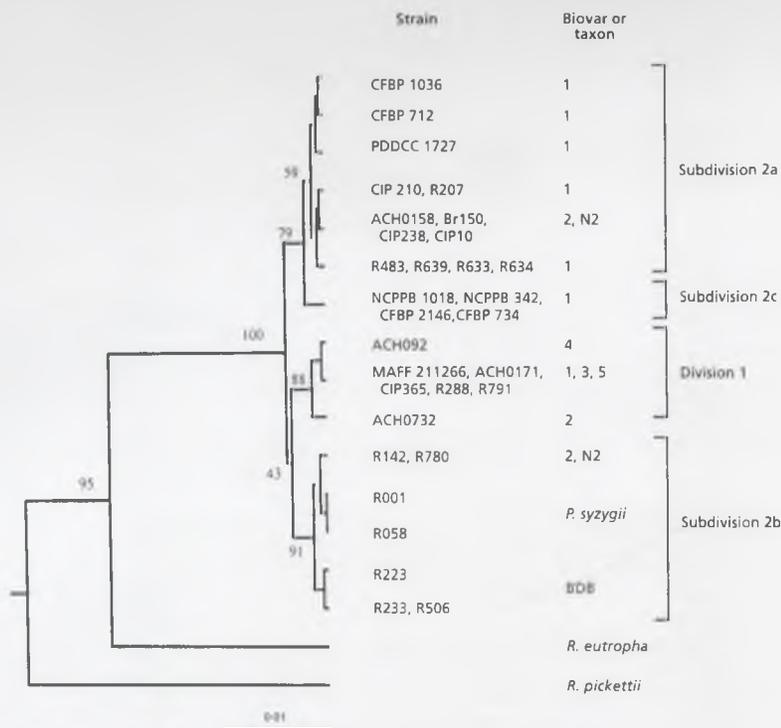


Fig. 4. Dendrogram constructed by using UPGMA showing the phylogenetic relationships of *R. solanacearum* strains and strains of closely related bacteria (*P. syzygii* and the BDB), based on 16S rDNA sequence comparisons. *Ralstonia eutropha* and *R. pickettii* were used as outgroups in this analysis. The numbers at the branch points are the percentages of bootstrap replicates in which the clusters were found. The GenBank accession numbers for the 16S rDNA sequences of the *R. eutropha* and *R. pickettii* strains are AF027407 and X67042, respectively.

Southern part of Africa. Strains belonging to cluster III were isolated from musaceae plants, except for one from potato. Cluster IV grouped biovar 2 and N2 isolates. Biovar 3 strains were assigned to cluster VI. Isolates belonging to biovars 4 and 5 were grouped together in cluster VII, except for two biovar 4 strains in cluster VI. Strains JT510, CFBP 3059, MAFF 211266, MAFF 211267, NCPBP 3181 and MAFF 301558 were unusual since they were members of unique branches. Moreover, a second truncation level (Fig. 3), at 0.87 correlation, could be used to make a more precise discrimination of strains, particularly between biovar 2 strains and biovar N2 strains, and between biovar 3 strains originating from Africa and biovar 3 strains from the other continents. This clustering was also well supported by high bootstrap values, 54% and 32%. The clustering obtained with the STATLAB software was approximately the same as that obtained with the PHYLIP software package

except that certain strains which were not well separated from the other strains using STATLAB were separated using PHYLIP (result not shown).

#### 16S rRNA sequence analysis

Nearly complete sequences of 16S rRNA genes were determined for 7 biovar 1 isolates of *R. solanacearum* and compared to 24 published sequences of *R. solanacearum* isolates and the closely related bacteria, *P. syzygii* and the BDB.

A phylogenetic tree was produced using the PHYLIP software package by comparing 1431 nucleotide positions, omitting all of the ambiguous nucleotides, and revealed two divisions, each of which was split into two subdivisions (Fig. 4). This tree was not completely consistent with that obtained by Taghavi *et al.* (1996) since the subdivision 2b appeared to be more closely related to division 1 than to subdivision 2a. However,

Table 3. The 16S rRNA sequence differentiation among 31 isolates of *R. solanacearum* and related bacteria

Organism	Strain*	Country	Host	Biovar	Division or subdivision	GenBank accession no.	Nucleotide(s) at position(s)†																				
							165	167	204	205	264	269	328	458-460	474	649	669	737	848	1208	1402	1424	1428	1441	1451	1456	1472
<i>R. solanacearum</i>	CFBP 1036	Martinique	Tomato	1	2a	AF207891	C	A	G	A	A	U	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	CFBP 712	Burkina Faso	Eggplant	1	2a	AF207892	C	A	G	A	A	U	C	UUC	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	NCIPH 1018	Angola	Potato	1	2c	AF207893	U	A	G	A	A	C	C	UCU	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	CFBP 2146	Reunion Island	<i>Pelargonium caput-medusae</i>	1	2c	AF207894	U	A	G	A	A	C	C	UCU	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	CFBP 734	Madagascar	Potato	1	2c	AF207895	U	A	G	A	A	C	C	UCU	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	NCIPH 342	Zimbabwe	Tobacco	1	2c	AF207896	U	A	G	A	A	C	C	UCU	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C
	MAFF 211266	Japan	Tomato	1	1	AF207897	C	A	G	A	A	C	C	ACU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U
	R288	China	Mulberry	5	1	U27984	C	A	G	A	A	C	C	ACU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U
	ACH092	Australia	Ginger	4	1	U27985	C	A	G	A	A	C	C	ACU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U
	ACH0171	Australia	Eggplant	3	1	U27986	C	A	G	A	A	C	C	ACU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U
R791	Indonesia	Tomato	3	1	U27987	C	A	G	A	A	C	C	ACU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
CH363	Philippines	Potato	5	1	U28220	C	A	G	A	A	C	C	UCU	U	G	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
ACH0732	Australia	Tomato	2	1	U27983	C	A	G	A	A	U	C	UCU	G	A	A	U	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
PDDCC 1727	United States	Tomato	1	2a	U28221	C	G	G	A	A	U	C	UUC	A	G	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	
CIP210	Brazil	Potato	1	2a	U28222	C	A	G	A	A	U	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R207	Belice	Musa AAB	1	2a	U28223	C	A	G	A	A	U	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	U	G	C	
ACH0158	Australia	Potato	2	2a	U28224	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
Br150	United Kingdom	<i>Solanum dulcamara</i>	2	2a	U28225	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
CIP238	Chile	Potato	2	2a	U28226	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
CIP10	Peru	Potato	N2	2a	U28227	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R481	Philippines	Banana	1	2a	U28228	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R634	Philippines	Banana	1	2a	U28229	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R633	Philippines	Banana	1	2a	U28230	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R639	Philippines	Banana	1	2a	U28231	C	A	G	A	A	C	C	UUC	A	A	A	U	C	C	C	U	G	A	C	G	C	
R780	Indonesia	Potato	N2	2b	U28232	C	G	G	A	A	C	C	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
R142	Indonesia	Clove	2	2b	U28233	C	G	G	A	A	C	C	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
R106	Indonesia	Banana	2b	2b	U28234	C	G	G	A	A	C	C	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	G	C	A	U	
R233	Indonesia	Banana	2b	2b	U28235	C	G	G	A	A	C	C	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	G	C	A	U	
R223	Indonesia	Banana	2b	2b	U28236	C	G	G	A	A	C	C	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	G	C	A	U	
P. sv2gzi	R001	Indonesia	Clove	2b	U28237	C	G	C	A	A	C	G	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	A	C	A	U	
	R058	Indonesia	Clove	2b	U28238	C	G	C	A	A	C	G	UUC	A	G	G	C	C	C	C	C	A	A	C	A	U	

\* Except for the first seven strains, all of these data were described in the study of Taghavi *et al.* (1996). CIP, International Potato Center, Lima, Peru; ACH, A. C. Hayward, Department of Microbiology, Centre for Bacterial Diversity and Identification, University of Queensland, St Lucia, Australia; PDDCC, Culture Collection of Plant Diseases Division, DSIR, Auckland, New Zealand.

† *Escherichia coli* numbering (Woese *et al.*, 1983).

this result could be explained by the branch point separating division 1 and subdivision 2b, which was not as well supported (bootstrap value only 43%) as the branch point between subdivisions 2a and 2b (bootstrap value 59%) in the study of Taghavi *et al.* (1996). Moreover, the latter was supported by the dendrogram generated by the STATLAB software (result not shown). The four African biovar 1 strains originating from Angola, Madagascar, Reunion Island and Zimbabwe were included in a new subdivision, which was designated subdivision 2c. The branch point between subdivisions 2a and 2c was stable (bootstrap value 79%). The three other biovar 1 strains were distributed either into subdivision 2a (strains CFBP 712 and CFBP 1036), containing *R. solanacearum* biovar 1, 2 and N2 strains, or into division 1 (strain MAFF 211266), containing *R. solanacearum* biovars 3, 4 and 5 and a biovar 2 isolate.

As shown in Table 3, comparison of the differences between the seven analysed strains and with existing data gave useful new data. As expected (Taghavi *et al.*, 1996), the major sequence differences between the two divisions were in positions 458-460 (ACU for division 1

and UUC for division 2) and 474 (U for division 1 and A for division 2). However, four African strains were characterized at positions 458-460 by UCU and so differed from all other isolates, except for one biovar 2 strain, ACH0732. These four African isolates also differed from all other isolates at position 165 where U was substituted for C. The Burkina Faso strain, CFBP 712, was distinguished from the four other African strains particularly at positions 165, 269 and 458-460, and had the same nucleotide sequence as that of the American isolate, CFBP 1036, except at position 649. The sequence of the biovar 1 Japanese strain, MAFF 211266, was different from that of other biovar 1 isolates, especially at positions 458-460, 474, 1424, 1428, 1451, 1456 and 1472, but was not different from that of biovar 3, 4 and 5 strains.

## DISCUSSION

Genomic diversity of *R. solanacearum* was evaluated by using different molecular approaches, extending the previous PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region (Poussier *et al.*, 1999). AFLP and PCR-RFLP analyses led

to comparable clustering but AFLP revealed more differences in the identification of clonal lines at the infraspecific level.

#### Clustering of the PCR-RFLP and AFLP profiles

Five PCR products were shown to be specific to *R. solanacearum*, *P. syzygii* and the BDB strains. This result is consistent with many other studies showing the close relationships between these three bacterial taxa (Eden-Green, 1994; Eden-Green & Sasraatmadja, 1990; Roberts *et al.*, 1990; Seal *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996). Nevertheless, *P. syzygii* as well as the BDB strains were distinguished from *R. solanacearum* strains since specific PCR-RFLP profiles, including specific restriction patterns, were obtained for these bacteria. To our knowledge, this is the first report of a simple and rapid method for discriminating *R. solanacearum* strains from *P. syzygii* and the BDB strains. New PCR-RFLP profiles were also obtained with new strains of *R. solanacearum*, particularly biovar N2 and 5 isolates. Biovar N2 strains generated five different subclusters demonstrating and confirming that biovar N2 is a genetically heterogeneous group of strains (Cook & Sequeira, 1994; Gillings & Fahy, 1994). Notably, the very similar biovars 2 and N2 (Hayward *et al.*, 1990) showed a polymorphism within the RS80-RS81 amplified fragment spanning the *hrpB* regulatory gene (Genin *et al.*, 1992). Since other groups of *R. solanacearum* strains are distinguishable by polymorphism in this gene (Poussier *et al.*, 1999), the *hrpB* gene may be considered as a target for further phylogeny purposes, and for relating pathogenicity gene function with genetic variability. The PCR-RFLP and AFLP profiles were distributed into clusters which agreed well with biovar and geographical origin classifications, confirming the results obtained in the previous investigation (Poussier *et al.*, 1999). In addition, this clustering was conserved using two different software packages which use different genetic distance methods, underlining its robustness. Biovar 1 and biovar 2 strains displayed the highest and the lowest diversity, respectively. Biovar 3 strains showed lower genetic diversity than biovar 1 strains. AFLP allowed very fine discrimination, close to the strain level, and reliable determination of genetic relationships between strains. This result is consistent with many previous investigations showing the usefulness of the AFLP procedure in strain identification, and for epidemiology and phylogeny purposes (Aarts *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 1997; Blears *et al.*, 1998; Clerc *et al.*, 1998; Folkertsma *et al.*, 1996; Hermans *et al.*, 1995; Janssen *et al.*, 1996, 1997; Keim *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1996; Restrepo *et al.*, 1999). The BDB and *R. pickettii* strains, which showed specific AFLP profiles, could be distinguished from *R. solanacearum* strains. However, the overall level of polymorphism between these bacterial taxa was low, confirming their close relationship.

#### AFLP reveals a high level of polymorphism

The AFLP analysis revealed great variability within *R. solanacearum* since 60 different AFLP fingerprints were

observed for the 96 strains. Thus, with 60 AFLP fingerprints (95% of fragments were polymorphic), AFLP has a higher resolution level for intraspecific differentiation of *R. solanacearum* strains than PCR-RFLP (20 profiles for 178 strains tested) and RFLP (46 profiles for 164 strains tested) (Cook *et al.*, 1989, 1991; Cook & Sequeira, 1994). Several DNA fragments were common to all *R. solanacearum* species. Other DNA fragments could distinguish the divisions defined by Cook *et al.* (1989) within *R. solanacearum* species or differentiate strains according to their biovar or geographical origin and are therefore useful for the development of diagnostic tools and epidemiological studies. Although AFLP clustering was approximately the same as PCR-RFLP clustering, the AFLP procedure was more efficient for assessing intraspecific diversity since it permitted a clearer separation between biovar 2 and N2 and also between biovars 3, 4 and 5. AFLP and PCR-RFLP confirmed that biovar 2 strains are the least genetically diverse of all biovars (Cook *et al.*, 1989; Cook & Sequeira, 1994; Smith *et al.*, 1995; Van der Wolf *et al.*, 1998); nevertheless AFLP, in contrast to PCR-RFLP, demonstrated genetic diversity among biovar 2 strains. In contrast, PCR-RFLP permitted strains isolated from musaceous plants to be grouped into two main clusters whereas AFLP grouped them into only one cluster.

#### New or unexpected groups

Trees resulting from PCR-RFLP analysis of the *hrpB* gene region, AFLP and 16S rRNA sequencing showed the separation of *R. solanacearum* into two major groups, confirming and extending the conclusions of previous investigations using DNA-DNA hybridization (Palleroni & Doudoroff, 1971), and more recently of RFLP analyses (Cook *et al.*, 1989, 1991; Cook & Sequeira, 1994), of PCR amplification with rRNA consensus (Seal *et al.*, 1992), of 16S rRNA sequencing (Li *et al.*, 1993; Taghavi *et al.*, 1996), and of sequencing of the 16S-23S rRNA gene spacer region, the endoglucanase gene and the polygalacturonase gene (Fegan *et al.*, 1998). The first division, named 'Americum' by Cook *et al.* (1989), includes biovars 1, 2 and N2; and the second division named 'Asiaticum' contains biovars 3, 4 and 5.

However, our analyses revealed that there are numerous exceptions. Indeed, our extended PCR-RFLP analysis showed that an African biovar 1 strains group was associated with the 'Asiaticum' division rather than the 'Americum' division, and so supported the conclusion of the first PCR-RFLP analysis (Poussier *et al.*, 1999). The conclusions of AFLP and 16S rRNA sequencing were different to those of PCR-RFLP and appeared to be in complete agreement with the classification scheme proposed by Cook *et al.* (1989). Indeed, biovar 1 strains originating from the Southern part of Africa (Angola, Madagascar, Reunion Island, Zimbabwe) appeared to be more closely related to American strains even though they constituted a clearly separable group from American biovar 1 strains, and these were thus included in subdivision 2c, a new

subdivision compared to the work of Taghavi *et al.* (1996). The differentiation between American and African biovar 1 strains is more remarkable within the *hrp* gene region (PCR-RFLP analysis). To further clarify whether the discrimination between these two biovar 1 populations is clearer using regions of the genome involved in pathogenicity, other genes such as those encoding endoglucanase or polygalacturonase should be sequenced. The most probable explanation for the distinction between African and American biovar 1 isolates is separate evolution of the two populations due to geographical isolation. The two populations may have diverged under different natural selection pressures. The observation that other African isolates (three coming from Burkina Faso and one from Kenya) fell into clusters containing only American members may result from their introduction from the Americas through commercial exchanges.

The Japanese strains, MAFF 211266 and MAFF 211267, confirmed to be biovar 1 in our laboratory, were considered to be atypical. Both PCR-RFLP analysis and 16S rRNA sequence analysis indicated that these Japanese isolates appeared to be closely related to strains belonging to the 'Asiaticum' division, confirming the findings of Tsuchiya & Horita (1998). The peculiarity of these strains, which underlines the level of heterogeneity existing in the *R. solanacearum* species, may result from horizontal genetic transfers from biovar 3 or 4 members, which predominate in Japan. Moreover, another Japanese strain, MAFF 301558, was also unusual since PCR-RFLP and AFLP analyses showed that this biovar N2 strain was distantly related to all other biovar N2 strains and closely related to biovars 3, 4 and 5. This is not the first report of atypical isolates since Li & Hayward (1994) and Taghavi *et al.* (1996) also mentioned one atypical (ACH0732) biovar 2 strain. Furthermore, the two strains JT510 and JQ1056, which were identified as biovar 2 on several independent examinations, were unusual in AFLP grouping. It is possible that limited genomic rearrangements or genetic exchanges which do not modify the biovar typing occur. These considerations reinforce the need for a classification system that is based upon polymorphism between genes encoding pathogenicity functions. This would in turn permit more meaningful comparisons with specific phenotypic characteristics such as host specificity and survival in natural settings to be made.

Clearly the species *R. solanacearum* comprises two divisions, which may represent subspecies as suggested by Li *et al.* (1993). However, the 'Americium' and 'Asiaticum' designations of these divisions proposed by Cook *et al.* (1989) in relation to the presumed geographical origin of strains could be reconsidered since our analyses reveal an African biovar 1 subdivision, which may have its own centre of genetic diversity, and thus likely evolutionary origin, in Africa.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Nigel Grimsley for reviewing the manuscript and all colleagues that have contributed strains to this

study. This work was supported in part by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

#### REFERENCES

- Aarts, H. J. M., Van Lith, L. A. J. T. & Keijer, J. (1998). High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Letts Appl Microbiol* 26, 131-135.
- Arias, C. R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E. & Aznar, R. (1997). Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Appl Environ Microbiol* 63, 2600-2606.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1991). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates-Wiley Interscience.
- Bleas, M. J., De Grandis, S. A., Lee, H. & Trevors, J. T. (1998). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21, 99-114.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L. & Kelman, A. (1962). Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726.
- Clerc, A., Manceau, C. & Nesme, X. (1998). Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within Genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 64, 1180-1187.
- Cook, D. & Sequeira, L. (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. In *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 77-93. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford: CAB International.
- Cook, D., Barlow, E. & Sequeira, L. (1989). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* 2, 113-121.
- Cook, D., Barlow, E. & Sequeira, L. (1991). DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 103-108. Edited by H. Henneke & D. P. S. Verma. Dordrecht: Kluwer.
- Eden-Green, S. J. (1994). Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for moko disease. In *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 25-34. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford: CAB International.
- Eden-Green, S. J. & Sastraamadja, H. (1990). Blood disease present in Java. *FAO Plant Protein Bull* 38, 49-50.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I. & Hayward, A. C. (1998). Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, pp. 19-33. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (1995). PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.55. Seattle: Department of Genetics, University of Washington.
- Folkertsma, R. T., Rouppe Van der Voort, J. N. A. M., de Groot, K. E., Van Zandvoort, P. M., Schots, A., Gommers, F. J., Helder, J. & Bakker, J. (1996). Gene pool similarities of potato cyst nematode

- populations assessed by AFLP analysis. *Mol Plant-Microbe Interactions* 9, 47–54.
- Genetics Computer Group (1999). Wisconsin package, version 10.0. Madison, WI: Genetics Computer Group.
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C. & Boucher, C. A. (1992). Evidence that the *hrpB* encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* 6, 3065–3076.
- Gillings, M. R. & Fahy, P. (1994). Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 95–112. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford: CAB International.
- Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 27, 265–277.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29, 65–87.
- Hayward, A. C., El-Nashaar, H. M., Nydegger, U. & De Lindo, L. (1990). Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 69, 269–280.
- He, L. Y., Sequeira, L. & Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 67, 1357–1361.
- Hermans, P. W. M., Sluijter, M., Hoogenboezem, T., Heersma, H., Vanbelkum, A. & De Groot, R. (1995). Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol* 33, 1606–1612.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabau, M. & Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142, 1881–1893.
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K. & Dijkshoorn, L. (1997). Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1179–1187.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Keim, P., Kalif, A., Schupp, J. & 7 other authors (1997). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 179, 818–824.
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stackebrandt, E. & Hayward, A. C. (1993). Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Bacteriol* 74, 324–329.
- Li, X. & Hayward, A. C. (1994). Bacterial whole cell protein profiles of the rRNA group II pseudomonads. *J Appl Bacteriol* 77, 308–318.
- Lin, J.-J., Kuo, J. & Ma, J. (1996). A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Res* 24, 3649–3650.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci* 70, 3321–3323.
- Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. (1971). Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 107, 690–696.
- Pegg, K. & Moffett, M. (1971). Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 11, 696–698.
- 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. *Appl Environ Microbiol* 65, 2184–2194.
- Restrepo, S., Duque, M., Tohme, J. & Verdier, V. (1999). AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* 145, 107–114.
- Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P. & Ambler, D. J. (1990). *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst Appl Microbiol* 13, 34–43.
- Seal, S. E., Jackson, L. A. & Daniels, M. J. (1992). Use of rRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl Environ Microbiol* 58, 3759–3761.
- Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P. W. & Daniels, M. J. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J Gen Microbiol* 139, 1587–1594.
- Smith, J. J., Offord, L. C., Holderness, M. & Saddler, G. S. (1995). Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Appl Environ Microbiol* 61, 4263–4268.
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I. & 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. *Int J Syst Bacteriol* 46, 10–15.
- Tsuchiya, K. & Horita, M. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, pp. 61–73. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Van der Wolf, J. M., Bonants, P. J. M., Smith, J. J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J. R. C. M., Saddler, G. S., Trigalet, A. & Feuillade, R. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RCFGE and Rep-PCR. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, pp. 44–49. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M. & 8 other authors (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407–4414.
- Ward, J. H. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Am Stat Assoc J* 58, 236–244.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. & Noller, H. F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev* 47, 621–669.

Received 2 December 1999; revised 1 March 2000; accepted 27 March 2000.

### III.1.3. Confirmation d'une subdivision africaine au sein de l'espèce *R. solanacearum*

Comme la position taxonomique de la subdivision incluant des souches africaines de biovar 1 se révèle variable selon l'outil moléculaire employé, nous avons cherché à approfondir notre analyse de la diversité de *R. solanacearum* par le séquençage de deux régions du génome impliquées dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Le séquençage du gène *hrpB* (gène régulateur du cluster des gènes *hrp* où une grande variabilité a été mise en évidence par PCR-RFLP) et du gène codant pour l'endoglucanase a été entrepris et réalisé en collaboration avec Prior, Fegan et Hayward du département de microbiologie et parasitologie à l'Université du Queensland, Brisbane, Australie.

Les méthodologies et les résultats sont présentés dans l'article intitulé « Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex » accepté pour publication en Octobre 2000 dans la revue internationale « Systematic and Applied Microbiology ». Les principales conclusions sont rapportées dans le résumé dont figure ci-dessous la traduction française.

« Nous avons effectué le séquençage partiel du gène *hrpB* et du gène codant pour l'endoglucanase pour 30 souches de *R. solanacearum* et une souche de BDB, un taxon proche de *R. solanacearum*. Les comparaisons de séquences ont montré une très large variabilité au sein de ces deux régions du génome impliquées dans le pouvoir pathogène de la bactérie. L'analyse phylogénétique basée sur les comparaisons de séquences de ces deux régions a révélé l'existence de trois groupes génétiques majeurs comprenant l'ensemble des isolats de *R. solanacearum*, la souche de BDB constituant une entité phylogénétique distincte. Les groupes 1 et 2 correspondent aux divisions 1 et 2 de *R. solanacearum* définies par Cook *et al.*, (1989). De plus, deux sous-groupes peuvent être séparés au sein du groupe 2. Le dernier groupe, nommé groupe 3 dans cette étude, inclut des souches de biovars 1 et N2 originaires d'Afrique. Ce groupe de souches récemment décrit (Poussier *et al.*, 2000) apparaît clairement différent des autres souches suggérant une évolution séparée de celles appartenant aux divisions 1 et 2. »

L'article est présenté dans les pages suivantes.

**Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex.**

Stéphane Poussier<sup>1</sup>, Philippe Prior<sup>2-3</sup>, Jacques Luisetti<sup>1\*</sup>, Chris Hayward<sup>3</sup>, and Mark Fegan<sup>3</sup>

\* Corresponding author: Tel: +262 35 76 34; Fax: +262 35 76 41; e-mail: luisetti@cirad.fr.

<sup>1</sup> Laboratoire de Phytopathologie, Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, 97448 Saint-Pierre Cedex, La Réunion, France.

<sup>2</sup> Station de Pathologie Végétale, Institut National de la Recherche Agronomique, BP94, 84143 Montfavet Cedex, France.

<sup>3</sup> Cooperative Research Centre for Tropical Plant Protection, Department of Microbiology and Parasitology, The University of Queensland, Brisbane Qld 4072, Australia.

running title: Genetic diversity within *Ralstonia solanacearum*

### Summary

We determined partial *hrpB* and endoglucanase genes sequences for 30 strains of *Ralstonia solanacearum* and one strain of the blood disease bacterium (BDB), a close relative of *Ralstonia solanacearum*. Sequence comparisons showed high levels of variability within these two regions of the genome involved in pathogenicity. Phylogenetic analysis based upon sequence comparisons of these two regions revealed three major clusters comprising all *Ralstonia solanacearum* isolates, the BDB strain constituted a phylogenetically distinct entity. Cluster 1 and cluster 2 corresponded to the previously defined divisions 1 and 2 of *Ralstonia solanacearum*. Moreover, two subclusters could be identified within cluster 2. The last cluster, designated cluster 3 in this study, included biovar 1 and N2 strains originating from Africa. This recently described group of strains was confirmed to be clearly different from the other strains suggesting a separate evolution from those of both divisions 1 and 2.

Key words: *Ralstonia solanacearum* - bacterial wilt - *hrpB* gene sequences - endoglucanase gene sequences - genetic diversity - phylogeny - African strains.

## Introduction

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most important bacterial plant diseases worldwide (Hayward, 1991). *R. solanacearum* is a heterogeneous species traditionally classified into five races on the basis of differences in host range (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983; Pegg and Moffett, 1971) and six biovars on the basis of biochemical properties (Hayward, 1964, 1991, 1994). Studies of DNA-DNA homology of *R. solanacearum* strains have revealed that the relatedness between isolates of this species is often less than the 70% threshold level commonly expected within a species (Palleroni and Doudoroff, 1971; Roberts et al., 1990). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis (Cook et al., 1989; Cook and Sequeira, 1994) has shown that *R. solanacearum* is divided into two divisions: division 1 grouping strains belonging to biovars 3, 4 and 5 and division 2 comprising strains belonging to biovars 1, 2 and N2. These two divisions distinguish strains mainly originating in the Old and the New World respectively. Several other investigations have confirmed this dichotomy within *R. solanacearum*: PCR amplification with tRNA consensus primers (Seal et al., 1992), PCR-RFLP of a polygalacturonase gene fragment (Gillings et al., 1993) and partial and complete sequencing of the 16S rRNA gene (Li et al., 1993; Seal et al., 1993; Taghavi et al., 1996; Poussier et al., 2000). Taghavi et al. (1996) also revealed the existence of a subdivision within division 2 comprising isolates of *R. solanacearum* from Indonesia including the closely related organisms the blood disease bacterium (BDB) and *Pseudomonas syzygii*. Further sequencing of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region, the polygalacturonase gene and the endoglucanase gene (Fegan et al., 1998) has supported the existence of the two divisions and the existence of the group of strains originating in Indonesia.

To accurately assess the phylogenetic variation amongst closely related bacterial populations, markers with greater resolving power than the commonly used rRNA genes are required. For instance, transposable elements, avirulence genes (Nelson et al., 1994; Adhikari et al., 1995), *hrp* genes (Leite et al., 1994) or polygalacturonase genes (Gillings et al., 1993) were successfully investigated. A recent PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region, which is involved in hypersensitive reaction and pathogenicity of most plant pathogenic bacteria, showed that certain African biovar 1 strains did not cluster with other biovar 1 isolates as expected, these isolates were more closely related to division 1 (biovars 3, 4 and 5) isolates rather than to division 2 isolates (Poussier et al., 1999). An extended PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region complemented by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and sequencing of the 16S rRNA gene (Poussier et al., 2000) has provided further evidence for the existence of this group of strains. However, the relationship of this group of strains to strains of divisions 1 and 2 was not clear since the strains either fell close to *R. solanacearum* strains of division 1 or division 2 depending on the method employed to measure diversity (Poussier et al., 2000). Sequencing of the endoglucanase gene has already provided phylogenetically valuable information (Fegan et al., 1998) and the *hrpB* gene, the regulatory gene of the *hrp* gene region (Genin et al., 1992) has already revealed great variability (Poussier et al., 1999; Poussier et al., 2000). The sequence analysis of the *hrpB* and endoglucanase genes in this study were undertaken to clarify the relationships between strains belonging to the "African" group of strains and other strains of *R. solanacearum*.

## Materials and Methods

**Bacterial strains:** All *R. solanacearum* and blood disease bacterium (BDB) isolates used in this study are listed in Table 1 and were cultured as described previously (Hayward, 1964; Poussier et al., 1999).

**DNA isolation:** Genomic DNA was isolated and purified following three different methods: the hexadecyltrimethylammonium bromide method (Ausubel et al., 1991), the method of Boucher et al. (1987) or the method of Marmur (1961).

### Sequencing:

***hrpB* gene.** PCR amplification of the *hrpB* gene was performed with the forward primer RShrpBf (5'-TGCCATGCTGGGAAACATCT-3') and the reverse primer RShrpBr (5'-GGGGCTCGTTGAACTGC-3'). Primers directed the amplification of a 1417 bp fragment on

**Table 1.** *Ralstonia solanacearum* and the BDB strains used in this study.

Strain <sup>a</sup>	Other designation <sup>b</sup>	Biovar or species	Geographic origin	Host	Cluster/ Subcluster <sup>c</sup>	<i>hrpB</i> gene sequence, GenBank accession no.	Endoglucanase gene sequence, GenBank accession no.
MAFF 211266	JT690	1/4	Japan	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	AF295603	AF295250
GMI 1000	JS753	3	Guyana	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	AF295604	AF295251
JT 523		3	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	1	AF295605	AF295252
NCPBP 3190	JS941	4	Malaysia	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1	AF295606	AF295253
UW 151	JS834	4	Australia	<i>Zingiber officinale</i>	1	AF295607	AF295254
R 292	JT661	5	China	<i>Morus alba</i>	1	AF295608	AF295255
UW 162	JT648	1	Peru	<i>Musa sp. cv. plantain</i>	2a	AF295609	AF295256
UW 9	JT644	1	Costa Rica	<i>Heliconia sp.</i>	2a	AF295610	AF295257
JT 516		2	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	2a	AF295611	AF295258
CFBP 3858	JS907	2	The Netherlands	<i>Solanum tuberosum</i>	2a	AF295612	AF295259
UW 477	JT654	N2	Peru	<i>Solanum tuberosum</i>	2a	AF295613	AF295260
NCPBP 3987	JT677	N2	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>	2a	AF295614	AF295261
CFBP 2047 <sup>d</sup>	JR659	1	United-States	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2b	AF295615	AF295262
ICMP 7963	JS967	1	Kenya	<i>Solanum tuberosum</i>	2b	AF295616	AF295263
CFBP 2972	JS734	1	Martinique	<i>Solanum tuberosum</i>	2b	AF295617	AF295264
CFBP 2957	JS717	1	Martinique	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2b	AF295618	AF295265
CFBP 2958	JS728	1	Guadeloupe	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2b	AF295619	AF295266
CFBP 712	JS770	1	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>	2b	AF295620	AF295267
CFBP 715	JS779	1	Burkina Faso	<i>Lycopersicon esculentum</i>	2b	AF295621	AF295268
UW 469	JT652	1	Brazil	<i>Solanum tuberosum</i>	2b	AF295622	AF295269
CFBP 3059	JS904	1	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>	3	AF295623	AF295270
NCPBP 1018	JS950	1	Angola	<i>Solanum tuberosum</i>	3	AF295624	AF295271
JT 525		1	Reunion Island	<i>Pelargonium asperum</i>	3	AF295625	AF295272
JT 528		1	Reunion Island	<i>Solanum tuberosum</i>	3	AF295626	AF295273
CFBP 734	JS767	1	Madagascar	<i>Solanum tuberosum</i>	3	AF295627	AF295274
NCPBP 283	JS946	1	Zimbabwe	<i>Solanum panduriforme</i>	3	AF295628	AF295275
NCPBP 332	JS949	1	Zimbabwe	<i>Solanum tuberosum</i>	3	AF295629	AF295276
NCPBP 505	JS951	1	Zimbabwe	<i>Symphytum sp.</i>	3	AF295630	AF295277
NCPBP 342	JS952	1	Zimbabwe	<i>Nicotiana tabacum</i>	3	AF295631	AF295278
J 25		N2	Kenya	<i>Solanum tuberosum</i>	3	AF295632	AF295279
R 230	JT657	BDB	Indonesia	<i>Musa sp.</i>		AF295633	AF295280

<sup>a</sup> Abbreviations: CFBP, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; NCPBP, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, UK; ICMP, International Collection of Microorganisms from Plants, Auckland, New Zealand; UW, D Cook and L. Sequeira, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, USA; GMI, M. Arlat and P. Barberis, CNRS-INRA, Auzeville, Castanet-Tolosan Cedex, France; MAFF, Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Resources, Japan; R, Institute of Arable Crops Research-Rothamsted, Harpenden, UK.

<sup>b</sup> Designation of strains of the laboratoire de phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97448 Saint-Pierre, La Réunion, France.

<sup>c</sup> Clusters and subclusters as defined in Figures 1 and 2.

<sup>d</sup> Type strain of *Ralstonia solanacearum*.

**Table 2.** Number of nucleotides specific to the BDB strain and clusters or subclusters of *Ralstonia solanacearum* isolates identified within *hrpB* and endoglucanase genes sequences.

Clusters and subclusters as per Table 1 and Figures 1 and 2	Number of unique nucleotide positions for the genes indicated	
	<i>hrpB</i>	endoglucanase
<b>Cluster 1</b>	<b>4</b>	<b>13</b>
<b>Cluster 2</b>	<b>7</b>	<b>9</b>
subcluster 2a	1	2
subcluster 2b	9	2
<b>Cluster 3</b>	<b>3</b>	<b>7</b>
<b>BDB</b>	<b>20</b>	<b>22</b>

the basis of the nucleotide sequence of the *hrp* genes cluster of the strain GMI 1000 of *R. solanacearum* (accession no.: Z14056; EMBL/GenBank/DBJ databases). Primers were selected with the aid of the Oligo 5.0 software package (National Biosciences, 1996) and synthesized by Genosys Biotechnologies, Cambridge, United Kingdom. The PCR mixture (50  $\mu$ l, total volume) contained 0.7 U of *Taq* and *Pwo* DNA polymerases used with buffer 3 (Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR System; Boehringer Mannheim, Meylan, France), 100  $\mu$ M of each dNTP (Boehringer Mannheim), 0.25  $\mu$ M of each primer and 50 ng of template DNA. PCR amplifications were carried out in a GeneAmp PCR system 9600 thermocycler (Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA) programmed for an initial denaturation step of 95 °C for 5 min, followed by 10 cycles of 95°C for 30 s, 64°C for 30 s, 68°C for 2 min. The final 20 cycles were the same as the first 10 except that an additional 20 s was added to the elongation step for each new cycle, and a final extension step at 68°C for 7 min.

PCR products were electrophoresed onto 1% agarose gels at 5V/cm and visualized with UV light after ethidium bromide staining. Amplification products were purified from agarose gel slice by using the QIAquick purification kit PCR (Qiagen S. A., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The sequences of the PCR products were determined using BigDye<sup>TM</sup> terminator chemistry by Cambridge Bioscience, Cambridge, United Kingdom. All *hrpB* gene sequences have been deposited in the GenBank data library under the accession numbers shown in Table 1.

**Endoglucanase gene.** A 750 bp region of the endoglucanase gene was amplified using the primer pair Endo-F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') and Endo-R (5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3'). The reaction mixture (100  $\mu$ l, total volume) contained PCR buffer (67 mM Tris-HCl, pH 8.8; 16.6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.45% (vol/vol) Triton X-100; 200  $\mu$ g of gelatin per ml), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP; 0.25  $\mu$ M of each primer; 100 ng DNA or 2  $\mu$ l of a turbid bacterial suspension as template and 1.1U of *Tth* Plus DNA polymerase (Biotech International Ltd., Perth, Australia). PCR was performed on a MJ Research PTC100 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) by using the following protocol: initial denaturation at 96 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 1 min, 70°C for 1 min, 72°C for 2 min, with a final extension step of 72°C for 10 min. PCR products were electrophoresed onto 2% agarose gels at 5V/cm and visualized with UV light after ethidium bromide staining.

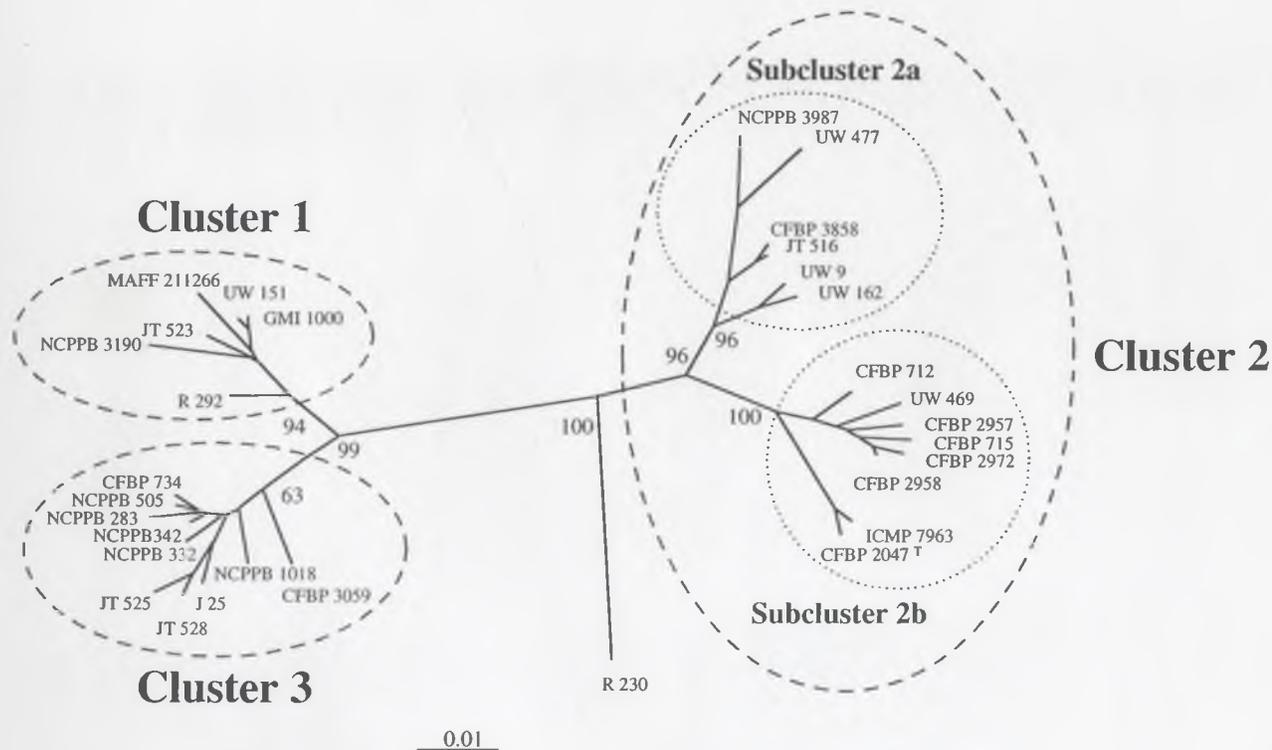
PCR products were purified using the Promega Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System according to the manufacturer's instructions, then sequenced using BigDye<sup>TM</sup> terminator chemistry (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer's instructions. Primers used for sequencing were Endo-F and Endo-R. Sequencing products were purified as recommended by the manufacturer and sequences determined at the Australian Genome Research Facility, The University of Queensland, St. Lucia, Australia. All endoglucanase gene sequences have been deposited in the GenBank data library under the accession numbers shown in Table 1.

**Sequence data analysis:** The sequences of the *hrpB* gene and the endoglucanase gene were analysed using the PHYLIP (Felsenstein, 1995) software package. Sequences were aligned with the aid of the CLUSTAL W software package (Thompson et al., 1994). Evolutionary distances between sequences were computed by using the algorithm of Jukes and Cantor (1969) of the DNADIST program of the PHYLIP package. Phylogenetic trees were constructed from genetic distance values by using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) of the NEIGHBOR program of the PHYLIP package. Finally, the strength of tree topologies was tested by 100 bootstrap resamplings of the data.

## Results

### *hrpB* gene sequences

The *hrpB* gene sequences of 30 isolates of *R. solanacearum* representing all biovars and one isolate of the BDB, a closely related bacterium, were determined and compared to the published sequence of reference strain GMI 1000. A phylogenetic tree (Fig. 1) was generated by comparing 1049 nucleotides, representing approximately 75% of the whole *hrpB* gene sequence, omitting all ambiguous nucleotides. This tree revealed four phylogenetically distinct groups. High bootstrap values indicated that these groups were well supported and the tree was robust. All *R. solanacearum* isolates of biovar 3, 4 and 5 formed a monophyletic cluster designated cluster 1. All *R. solanacearum* strains of biovar 1 from the Americas, three biovar 1 strains from Africa (ICMP 7963, CFBP 712, CFBP 715), and all biovar 2 and N2 strains, with the exception of



**Fig. 1.** Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of the BDB strain and clusters or subclusters of *Ralstonia solanacearum* strains based on partial *hrpB* gene sequence comparisons. The numbers at the branch points are the percentages of bootstrap replicates in which the clusters or subclusters were found.

† Type strain of *Ralstonia solanacearum*.

isolate J 25, grouped together in a monophyletic cluster designated as cluster 2. Cluster 2 is further separable into two subclusters; one subcluster, 2a, was comprised of biovar 2 and N2 strains isolated from potato and biovar 1 strains isolated from Musaceous hosts; the second subcluster, 2b, consisted of biovar 1 strains not isolated from Musaceous plants. Other biovar 1 isolates of *R. solanacearum* mainly originating from Southern Africa and a biovar N2 isolate from Kenya were gathered into another group, which has been termed cluster 3. The BDB strain fell outside of the 3 major clusters.

Based on the genetic distance matrix, strains included in cluster 1 were almost identical, showing greater than 97.1% sequence similarity, whereas strains of cluster 2 were the most diverse in some cases sharing less than 94% sequence similarity. Strains belonging to cluster 3 showed greater than 96.8% sequence similarity. Clusters 1 and 3 shared an average sequence homology of 94.3%, clusters 1 and 2 shared 89.2% similarity, and clusters 2 and 3 shared 89.5% similarity.

*hrpB* gene sequences displayed a high degree of polymorphism with approximately 20% of the nucleotide positions of the *hrpB* sequences (206 of 1049 nucleotide positions) exhibiting variation. Many nucleotide positions were useful in differentiating between the clusters and subclusters (Table 2). For instance, 4, 7 and 3 nucleotide positions were specific to clusters 1, 2 and 3, respectively (Table 2). The sequence of the BDB strain had 20 unique nucleotide positions. Strains of cluster 1 and the BDB strain shared one nucleotide position whereas 16 nucleotide positions were shared by cluster 2 strains and the BDB strain suggesting a close link between cluster 2 strains and the BDB (results not shown). Biovar 1 strains of sub-cluster 2a, originating from French West Indies, Burkina Faso and South America, shared 9 unique nucleotide positions.

#### Endoglucanase gene sequences

The endoglucanase gene sequences were completed for the same strains for which the *hrpB* gene sequences were determined. The phylogenetic tree (Fig. 2) was obtained by comparing 694 nucleotides, representing approximately 45% of the complete endoglucanase gene sequence, omitting all ambiguous nucleotides. The sequences belonging to the strains MAFF 211266, GMI 1000, JT 523, NCPPB 3190, UW 151 and R 292 were six bp shorter than those of all other strains since they have a 6-base deletion at the beginning of the area sequenced. The tree was very similar to the *hrpB* gene sequence-based tree with the same isolates belonging to the same clusters and sub-clusters as observed in the *hrpB* gene tree. This clustering was also well supported by high bootstrap values.

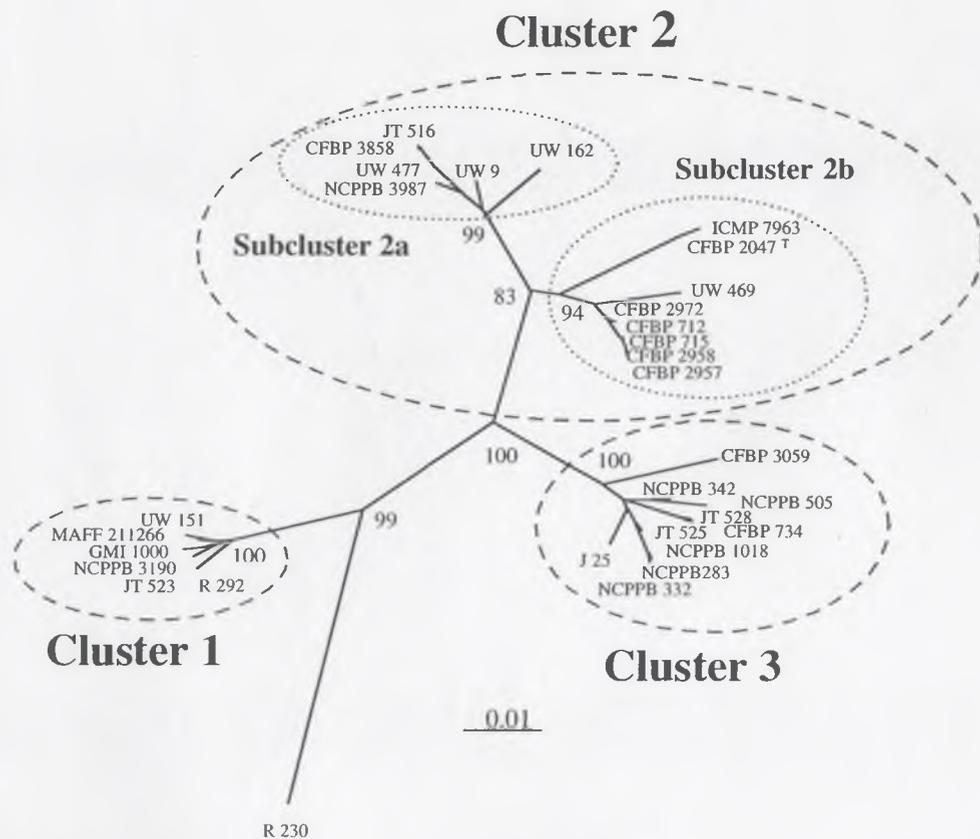
The genetic distance matrix showed that isolates of cluster 1 shared the greatest sequence similarity (98.5%) and isolates of cluster 2 shared the least similarity (95%). Strains belonging to cluster 3 shared 96.8% sequence similarity or greater. Cluster 3 shared similar sequence similarities with both clusters 1 and 2 (91.6% sequence similarity with cluster 1 and 91.4% sequence similarity with cluster 2). Cluster 1 and cluster 2 shared only 88.5% sequence similarity.

As for the *hrpB* gene sequences, endoglucanase gene sequencing revealed many polymorphisms with 22% of the nucleotide positions in the endoglucanase gene sequence (154 of 694 nucleotide positions) being variable. Many of the polymorphic nucleotides were specific for clusters and subclusters seen in the tree (Table 2). Cluster 1, 2 and 3 were characterized by 13, 9 and 7 unique nucleotide positions, respectively and 22 nucleotide positions were unique for the BDB strain (Table 2). In contrast to *hrpB*-based results, the BDB shared the same number (7) of nucleotide positions in common with clusters 1 and 2 (results not shown). Furthermore, only two nucleotide positions were unique to all strains of subcluster 2b (Table 2).

## Discussion

Partial sequences of the *hrpB* and endoglucanase genes were generated for one isolate of the BDB and for 30 isolates of *R. solanacearum*, including the type strain CFBP 2047, selected to take account of the known diversity of the organism including host range, geographic distribution and phenotype.

Phylogenetic analysis of both the endoglucanase and *hrpB* gene sequences showed that the *R. solanacearum* isolates examined grouped into three major clusters (clusters 1-2-3; Fig. 1 and 2), and the BDB isolate formed a single isolate cluster. Cluster 1 contains all isolates of biovars 3, 4 and 5 and is equivalent to division 1 as defined by Cook et al. (1989); cluster 2 contains isolates of biovars 1, 2 and N2 from Africa, the Antilles, USA and Central and South America, and is equivalent to division 2 as defined by Cook et al. (1989); cluster 3 contains isolates of biovars 1



**Fig. 2.** Neighbor-joining tree showing the phylogenetic relationships of the BDB strain and clusters or subclusters of *Ralstonia solanacearum* strains based on partial endoglucanase gene sequence comparisons. The numbers at the branch points are the percentages of bootstrap replicates in which the clusters or subclusters were found.

<sup>†</sup> Type strain of *Ralstonia solanacearum*.

and N2 from Africa and the islands of Reunion and Madagascar and is equivalent to the "African" group of strains identified by Poussier et al. (1999, 2000). The BDB isolate is the only representative of 16S-subdivision 2b described by Taghavi et al. (1996), a group of *R. solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and BDB strains all originating in Indonesia.

The "African" group of strains (cluster 3), first described by Poussier et al. (1999; 2000) using PCR-RFLP analysis of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rDNA sequencing has previously been found to fall close to either *R. solanacearum* strains of division 1 or division 2 depending on the method employed to measure diversity (Poussier et al., 2000). The tree based upon *hrpB* sequence data supports the results of the recent PCR-RFLP of the *hrp* gene region (Poussier et al., 1999; 2000) suggesting a close link between cluster 3 and division 1. In contrast, the tree based upon endoglucanase sequence data, places cluster 3 more closely related to division 2 confirming previous AFLP analysis and 16S rDNA sequence comparisons (Poussier et al., 2000). Although the phylogenetic position of this cluster of *R. solanacearum* strains remains unclear, it is evident from the present study and the work of Poussier et al. (1999; 2000) that this cluster of "African" strains does not belong to division 1 (cluster 1) nor to division 2 (cluster 2) but constitutes a phylogenetically distinct group of isolates. A representative of this group of organisms was not included in the analysis of Cook and Sequeira (1994) and the relationship of organisms belonging to this group to the two divisions remained undefined. To propose this group of strains as a new division, RFLP analysis using the DNA probes described by Cook et al. (1989) must be employed, but these probes are now unavailable.

The strains of cluster 3, exhibit many unique nucleotide positions within both the *hrpB* and endoglucanase gene sequences, indicating that this cluster has probably evolved separately from *R. solanacearum* strains belonging to division 1 and 2 and the "Indonesian" strains (subdivision 2b of Taghavi et al., 1996) as a result of geographic isolation. This study reinforces the hypothesis of the existence of at least two different populations of *R. solanacearum* in Africa as proposed by Poussier et al. (1999, 2000) and extends the known phenotypic diversity encompassed within this group of strains with the recognition of a strain identified as biovar N2 belonging to cluster 3. It is suspected that investigation of more strains of *R. solanacearum* belonging to this cluster, as well as within other clusters, will highlight further genetic and phenotypic diversity within this group.

Variation in the *hrpB* and endoglucanase gene sequences demonstrated that strains of cluster 1 (division 1) exhibited the minimum degree of intra-cluster variation and strains of cluster 2 (division 2) exhibited the maximum degree of intra-cluster sequence variation, confirming the findings of Li et al. (1993) and Taghavi et al. (1996) based upon 16S rDNA sequence analyses and the findings of Cook et al. (1989) and Cook and Sequeira (1994) based upon RFLP analysis. The high level of sequence variability observed among strains of cluster 2 was expressed in the trees produced from *hrpB* or endoglucanase gene sequences by two main branches within cluster 2 (Figures 1 and 2). One branch (subcluster 2a) includes biovar 2, N2 strains from potato and biovar 1 isolates from Musaceae hosts, suggesting a common progenitor for these strains. The other branch (subcluster 2b) contains biovar 1 strains not isolated from members of the family *Musaceae*. This divergent phylogeny observed within cluster 2 (which corresponds to the subdivision 2a as designated by Taghavi et al. in 1996) has also been recognized by PCR-RFLP and AFLP analyses (Poussier et al., 1999; 2000).

We focused mainly on *R. solanacearum* strains of biovar 1 since investigations have revealed that this biovar is the most genetically (Poussier et al., 1999, 2000) and phenotypically (Harris, 1972) diverse including a large degree of diversity in the aggressiveness of strains (Prior et al., 1990; Darrasse et al., 1998). Strains of biovar N2 have also been reported to exhibit a great degree of genetic diversity (Cook and Sequeira, 1994; Gillings and Fahy, 1994). In this study, strains of biovars 1 and N2 were found in both clusters 2 and 3. Strains belonging to both biovars were also found in the subdivision 2b group of strains originating in Indonesia based upon sequence analysis of 16S rDNA (Taghavi et al., 1996) and 16S-23S rDNA gene spacer region (Fegan et al., 1998). Therefore, strains belonging to biovars 1 and N2 have been found distributed between 3 of the 4 sequence variants described in *R. solanacearum*. Hence it is obvious that the phenotypic characters that define the biovar groupings are not indicative of the genetic variation recognised within *R. solanacearum*.

16S-Subdivision 2b comprises isolates of *R. solanacearum* from Indonesia and also strains of close relatives of *R. solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and the BDB (Taghavi et al., 1996). In the analysis of 16S rDNA sequences by Poussier et al. (2000), members of subdivision 2b were

more closely related to strains of division 1 confirming the ITS sequencing of Fegan et al. (1998) than division 2 as initially described by Taghavi et al. (1996). Whatever the phylogenetic position of this group of organisms there is no doubt that they form a monophyletic grouping on the basis of 16S rDNA sequencing (Taghavi et al., 1996; Poussier et al., 2000). The relative phylogenetic position of the one representative (R 230, a BDB isolate) of this cluster used in the present study was different according to the gene sequence that was analyzed: in the *hrpB* gene-based tree R 230 was closely related to cluster 2 while in the endoglucanase gene-based tree, R 230 was close to cluster 1. These results suggest that the BDB strain may be located at an intermediate position between cluster 1 and cluster 2 of *R. solanacearum* as described by Fegan et al. (1998). Nevertheless, the *hrpB* and endoglucanase gene sequence comparisons demonstrated that R 230 was characterized by many unique nucleotide positions (Table 2) and thus was clearly distinct from all other strains in the present study.

The strain MAFF 211266 isolated in Japan was received as biovar 1 but was unusual as it clustered with biovars 3, 4 and 5 in cluster 1. The biovar was repeatedly confirmed as biovar 1 (results not shown) following the method of Hayward (1964). However, using the method of French et al. (1995), the biovar test showed very late acid production from mannitol, sorbitol and dulcitol, characteristic of biovar 4 strains. This strain most probably does belong to biovar 4 but may be easily confused with biovar 1 due to the late acidification reaction produced by this organism. This strain was previously considered as an atypical biovar 1 strain (Poussier et al., 2000) and has been considered a mutant of Japanese biovar 4, the most common biovar in Japan, by Tsuchiya and Horita (1998).

The phylogenetic trees derived from the sequence of the endoglucanase and *hrpB* genes, confirm and extend the conclusions of previous studies assessing the genetic diversity of *R. solanacearum* (Cook et al., 1989; Seal et al., 1992; Li et al., 1993; Cook and Sequeira, 1994; Taghavi et al., 1996; Fegan et al., 1998; Poussier et al., 1999; Poussier et al., 2000). The confirmation of a new group of *R. solanacearum* strains contributes to our general understanding of the diversity within the *R. solanacearum* species complex and reinforces the suggestion of Li et al. (1993) and Taghavi et al. (1996) that subspecies of *R. solanacearum* or a separate species may have to be considered.

#### Acknowledgment

This work was financially supported, in part, by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche, France.

#### References

- Adhikari, T. B., Vera Cruz, C. M., Zhang, Q., Nelson, R. J., Skinner, D. Z., Mew, T. W., Leach, J. E.: Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 966-971 (1995).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.: Current protocols in molecular biology. New York, Greene Publishing Associates-Wiley Interscience 1991.
- Boucher, C. A., Van Gijsegem, F., Barberis, P. A., Arlat, M., Zischek, C.: *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J. Bacteriol.* 169, 5626-5632 (1987).
- Buddenhagen, I., Sequeira, L., Kelman, A.: Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52, 726 (1962).
- Cook, D., Barlow, E., Sequeira, L.: Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2, 113-121 (1989).
- Cook, D., Sequeira, L.: Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods, pp. 77-93. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (A. C. Hayward, G. L. Hartman, eds.), Wallingford, CAB International 1994.
- Darrasse, A., Trigalet, A., Prior, P.: Correlation of aggressiveness with genomic variation in *Ralstonia solanacearum* race 1, pp. 89-98. In: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects (P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone, eds.), Paris, INRA Editions 1998.

- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I., Hayward, A. C.: Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*, pp. 19-33. In: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects (P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone, eds.), Paris, INRA Editions 1998.
- Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.55. Department of Genetics, University of Washington, Seattle (1995).
- French, E. R., Gutarra, L., Aley, P., Elphinstone, J.: Culture media for *Pseudomonas solanacearum* isolation, identification and maintenance. *Fitopatologia* 30, 126-130 (1995).
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C., Boucher, C. A.: Evidence that the *hrpB* encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol. Microbiol.* 6, 3065-3076 (1992).
- Gillings, M., Fahy, P., Davies, C.: Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 44-48 (1993).
- Gillings, M. R., Fahy, P.: Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex, pp. 95-112. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (A. C. Hayward, G. L. Hartman, eds.), Wallingford, CAB International 1994.
- Harris, D.C.: Intra-specific variation in *Pseudomonas solanacearum*, pp. 289-292. In: Proceedings of the third International Conference on Plant Pathogenic Bacteria (H.P.M. Geesteranus, ed.), Wageningen, The Netherlands 1972.
- Hayward, A. C.: Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27, 265-277 (1964).
- Hayward, A. C.: Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29, 65-87 (1991).
- Hayward, A. C.: Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria, pp. 123-135. In: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* (A. C. Hayward, G. L. Hartman, eds.), Wallingford, CAB International 1994.
- He, L. Y., Sequeira, L., Kelman, A.: Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67, 1357-1361 (1983).
- Jukes, T. H., Cantor, C. R.: Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In: Mammalian protein metabolism (H. N. Munro, eds.), New York, Academic Press 1969.
- Leite, R. P. J., Egel, D. S., Stall, R. E.: Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1078-1086 (1994).
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stackebrandt, E., Hayward, A. C.: Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 324-329 (1993).
- Marmur, J.: A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218 (1961).
- National Biosciences, I.: Oligo, primer analysis software version 5.0. Plymouth, MN, USA (1996).
- Nelson, R. J., Baraoidan, M. R., Vera Cruz, C. M., Yap, I. V., Leach, J. E., Mew, T. W., Leung, H.: Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3275-3283 (1994).
- Palleroni, N. J., Doudoroff, M.: Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Bacteriol.* 107, 690-696 (1971).
- Pegg, K., Moffett, M.: Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 11, 696-698 (1971).
- Poussier, S., Vandewalle, P., Luisetti, J.: 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 (1999).
- Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J., Trigalet, A.: 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 (2000).
- Prior, P., Steva, H., Cadet, P.: Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the french west Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. *Plant Dis.* 74, 962-965 (1990).
- Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P., Ambler, D. J.: *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst. Appl. Microbiol.* 13, 34-43 (1990).

- Saitou, N., Nei, M.: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425 (1987).
- Seal, S. E., Jackson, L. A., Daniels, M. J.: Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3759-3761 (1992).
- Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P. W., Daniels, M. J.: Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotides primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1587-1594 (1993).
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., Fegan, M.: 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 10-15 (1996).
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680 (1994).
- Tsuchiya, K., Horita, M.: Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan, pp. 61-73. In: Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects (P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone, eds.), Paris, INRA Editions 1998.

### III.1.4. Discussion générale

Depuis longtemps, il est connu que *R. solanacearum* est une espèce bactérienne complexe caractérisée par une très grande hétérogénéité de ses isolats. Le spectre d'hôtes de cette bactérie, le plus large répertorié pour une bactérie phytopathogène, est sans doute l'illustration la plus éclatante de cette extraordinaire diversité. Il s'agit peut-être aussi de la seule bactérie phytopathogène pour laquelle de nouveaux hôtes, appartenant à de nouveaux genres et à de nouvelles espèces, sont mis en évidence régulièrement. Cette très large diversité est sans aucun doute en grande partie responsable de l'échec ou du peu d'efficacité des mesures de lutte mises en oeuvre contre cette bactériose. Elle est aussi attestée par la très grande capacité d'adaptation de la bactérie à des environnements très diversifiés (sols, eaux, plantes, semences,...). L'extrême diversité de *R. solanacearum* n'est que partiellement décrite par les systèmes de classification infra-spécifique, en races et en biovars, traditionnellement employés. En revanche, l'utilisation de la RFLP (Cook *et al.*, 1989) a démontré que les outils moléculaires peuvent permettre de mieux rendre compte de la diversité de *R. solanacearum*, d'apporter des informations sur l'origine de cette diversité et de spéculer sur la possible évolution de l'espèce.

L'ensemble des études de polymorphisme réalisées dans le cadre de cette thèse a porté sur une collection d'environ 180 souches. Ceci nous a permis de confirmer l'extraordinaire diversité génétique existant chez *R. solanacearum* et de clarifier en grande partie les relations entre souches. Taghavi *et al.* (1996) ont d'ailleurs avancé le terme de « complexe d'espèce » pour décrire la très grande diversité infra-spécifique de *R. solanacearum*. Nos résultats montrent que le système de classification de l'espèce *R. solanacearum* en biovars peut être affiné par un système de classification en groupes génétiques, ce qui confirme les résultats d'analyses RFLP (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991; Cook & Sequeira, 1994). En effet, l'espèce *R. solanacearum* apparaît constituée de plusieurs groupes génétiques, eux-même subdivisés en plusieurs sous-groupes, tous corrélés au biovar des souches. En outre, ces groupes ou sous-groupes, robustes d'un point de vue statistique, révèlent une plus ou moins grande diversité génétique au sein des biovars. Le biovar 1 est le plus hétérogène et le biovar 2 le plus homogène. Le biovar N2 est plus variable que le biovar 2. Quant au biovar 3, s'il présente une certaine hétérogénéité il n'est pas toujours distinguable du biovar 4; il s'agit sans aucun doute des deux biovars les plus proches. Enfin, le biovar 5 manifeste une relative homogénéité, moindre cependant que le biovar 2.

Parmi les groupes génétiques identifiés que l'on peut qualifier de groupes majeurs, nous avons confirmé l'existence des divisions 1 ou « Asiaticum » et 2 ou « Americanum » *sensu* Cook *et al.* (1989). En outre, nous avons mis en évidence un nouveau groupe de souches, comprenant uniquement des souches de biovar 1, à l'exception d'une souche du Kenya de biovar N2, originaires de la région Sud de l'Afrique. Cette information nouvelle a l'intérêt de montrer qu'il existe en Afrique un centre de diversification génétique des souches de *R. solanacearum* bien distinct de ceux identifiés en Amérique et en Asie. Le séquençage de l'ADNr 16S a également permis de révéler que ces populations africaines étaient bien différentes des populations indonésiennes, ces dernières constituant une autre subdivision génétique de *R. solanacearum* à l'écart des deux grandes divisions (Taghavi *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998a). L'espèce *R. solanacearum* apparaît ainsi constituée de quatre groupes génétiques majeurs.

Il est regrettable d'avoir à constater que les sondes RFLP utilisées pour décrire la classification en division (Cook *et al.*, 1989) sont certainement perdues car personne, à ce jour, n'a pu y avoir accès. Par conséquent, nous ne pouvons conclure à l'existence d'une division RFLP dite « Africanum » mais, en revanche, nous évoquerons l'existence d'une subdivision africaine au sein de l'espèce *R. solanacearum*. Cette remarque est également valable pour les souches originaires d'Indonésie. Il n'en demeure pas moins que l'identification d'une population africaine, génétiquement distincte des autres populations de *R. solanacearum*, contribue à améliorer de manière significative les connaissances théoriques de la diversité génétique de l'espèce *R. solanacearum* et se révèle d'une importance capitale dans le cadre de l'élaboration d'une stratégie de lutte basée sur l'utilisation de variétés résistantes. En effet, il est fort probable, même si cela reste à démontrer, que cette population possède un pouvoir pathogène (gamme d'hôtes et/ou agressivité) différent et donc contribue à mettre en échec la stabilité de la résistance variétale opposée à d'autres populations de l'agent pathogène. En effet, il est très souvent observé que la résistance génétique sélectionnée n'est durable que dans un site géographique bien précis du fait de l'extrême diversité de l'agent pathogène mais aussi de conditions agro-pédo-climatiques différentes selon les sites. L'évaluation récente du comportement de sources de résistance de tomate au flétrissement bactérien, utilisées dans les schémas de sélection, dans 11 sites distribués dans le monde entier illustre parfaitement ce phénomène (Wang *et al.*, 1998a).

Nos études ont clairement différencié les souches africaines de biovar 1 des souches américaines de même biovar. Cette différence, remarquée au niveau de l'ADNr 16S et au niveau du génome total analysé par la technique AFLP, se trouve nettement renforcée par l'exploration des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène, au niveau du gène codant pour l'endoglucanase et plus particulièrement encore au niveau des gènes *hrp*. Cette constatation montre que la variabilité observée diffère selon la portion du génome et, surtout, renforce l'hypothèse que les souches africaines disposent d'un pouvoir pathogène différent de celui des souches américaines. Pour conforter cette hypothèse, il serait très intéressant de comparer le pouvoir pathogène de ces deux populations sur une gamme d'hôtes incluant notamment le géranium rosat puisque des souches africaines sont issues de cet hôte, ce qui n'est pas le cas pour les souches américaines. Le fait également qu'une très large variabilité de séquence ait été mise en évidence au sein du gène *hrpB* (par PCR-RFLP; par RFLP, figure IV-7; par séquençage partiel) gène régulateur des gènes *hrp*, et du gène codant pour l'endoglucanase (séquençage partiel) témoigne sans doute de la très grande capacité de *R. solanacearum* à infecter des hôtes très divers.

Toutefois, il ne faudrait pas considérer à l'inverse que des populations homogènes d'un point de vue génétique aient forcément un pouvoir pathogène similaire. L'exemple le plus notable concerne les souches de biovar 2 qui sont caractérisées par une très faible variabilité, aussi bien phénotypique que génétique, sans doute attribuée à une gamme d'hôtes très étroite. Il a été montré très récemment, que les souches réunionnaises ou européennes sont nettement plus agressives sur pomme de terre que les souches originaires d'Amérique du Sud (Fock, 2000).

A ce stade de nos connaissances, nous considérons que l'espèce *R. solanacearum* est bien constituée de quatre groupes génétiques majeurs. Comme chaque groupe est significativement corrélé à l'origine géographique des souches, cela suggère que l'isolement géographique est un facteur déterminant de l'évolution divergente de l'espèce. De plus, les

échanges commerciaux sont probablement à l'origine de la dissémination des souches hors de leur zone de diversification comme l'illustre la présence de souches de biovar 1 du Burkina Faso et du Kenya génétiquement très proches des souches américaines de biovar 1 et en revanche éloignées des autres souches africaines de biovar 1. Compte tenu qu'il paraît fortement improbable que des souches génétiquement homogènes aient des origines indépendantes, cette observation suggère l'introduction de souches américaines en Afrique par le biais d'importation de matériel végétal contaminé. Un autre exemple est celui des souches de biovar 2/race 3 inféodées à la pomme de terre et présentes dans le monde entier, qui se révèlent pourtant être génétiquement très homogènes. L'hypothèse communément acceptée est celle d'une dissémination de cette population par l'homme, à l'échelle internationale à partir de l'Amérique du Sud (zone d'origine de la pomme de terre), via les tubercules de pomme de terre infectés à l'état latent (Ciampi *et al.*, 1980; Buddenhagen, 1986; Hayward, 1991). De la même manière, la dissémination des souches de race 2 responsable de la maladie de Moko a été suspectée par le biais de rhizomes de bananiers infectés, de l'Amérique centrale vers les Philippines (Buddenhagen, 1986; Sequeira, 1998). Néanmoins, un doute subsiste encore car il est également possible que ces souches soient originaires d'Asie et qu'elles aient été introduites en Amérique via des *Heliconia* sp. (Fegan, 1998). La répartition géographique des souches de biovar 1 et leur absence *a priori* des zones asiatiques où ne s'expriment que les souches des biovars 3, 4 et 5, soulignent que les échanges commerciaux ne sont cependant pas suffisants pour permettre l'implantation de souches étrangères, d'autres conditions doivent être remplies. Il n'en demeure pas moins que ces études de diversité génétique s'avèrent d'une importance considérable puisqu'elles sont susceptibles de tracer la migration de la maladie (aussi bien entre pays qu'entre régions), ainsi elles peuvent se révéler une aide précieuse à la mise en oeuvre de mesures de quarantaine adéquates ainsi qu'au déploiement de variétés résistantes adaptées.

L'origine géographique dont le rôle est indéniable dans la diversification des souches de biovar 1, de par la distinction nette des souches américaines et africaines, semble également avoir son importance dans la diversification des souches de biovar 3, même si elle est moins évidente car les souches de biovar 3 sont plus homogènes génétiquement que les souches de biovar 1. En effet, plusieurs sous-groupes PCR-RFLP, confirmés par AFLP, ont pu être mis en évidence dont un est parfaitement corrélé à l'origine africaine des souches, les autres sous-groupes comprenant des souches de diverses origines (Amérique ou Asie).

Les différents outils moléculaires employés montrent très clairement que les divers groupes génétiques observés ne sont pas, à l'exception de deux cas (détaillées ultérieurement dans ce paragraphe), corrélés à l'hôte d'origine. Par rapport à l'origine géographique, l'hôte d'origine semble donc avoir une importance moindre sur la diversité génétique et l'évolution de l'espèce. En revanche, l'analyse récente de la diversité phénotypique du pathogène basée sur l'assimilation de nombreux substrats (plaques BIOLOG) a révélé que la capacité à métaboliser certaines sources de carbone peut être associée à certains hôtes (résultats du laboratoire soumis prochainement pour publication). La première exception concerne les souches de race 5/biovar 5 associées au mûrier pour lesquelles des profils PCR-RFLP et AFLP sont spécifiques. Des profils RFLP caractérisant spécifiquement ces souches ont également été observés (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991; Cook & Sequeira, 1994). La seconde exception concerne les souches issues de Musacées ou d'Héliconiacées pour lesquelles deux groupes PCR-RFLP et un groupe AFLP spécifiques (à l'exception d'une souche de pomme de terre) ont été obtenus.

Par ailleurs, de multiples sites de restriction ainsi que deux insertions spécifiques de ces souches ont été détectés par l'analyse PCR-RFLP au sein des gènes *hrp*. Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux de l'étude RFLP utilisant des sondes *hrp* (Cook *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1991; Cook & Sequeira, 1994) qui avaient mis en évidence une délétion également spécifique des souches de race 2 isolées de Musacées et d'Héliconiacées. Puisque la région des gènes *hrp* intervient dans l'interaction hôte-pathogène, il est possible de penser que des changements dans cette région soient induits spécifiquement par l'hôte.

Par ailleurs, nous avons tenu à prendre en compte dans nos analyses de diversité deux taxons considérés comme phylogénétiquement proches de *R. solanacearum* : *P. syzygii*, responsable de la maladie du giroflier à Sumatra, et le blood disease bacterium (BDB, anciennement désigné *P. celebensis*), responsable d'une maladie du bananier à Java et à Sulawesi (Eden-Green & Sastraamadja, 1990; Roberts *et al.*, 1990; Seal *et al.*, 1993; Eden-Green, 1994; Taghavi *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998a). D'ailleurs, ces deux taxons ont été inclus dans la subdivision indonésienne de *R. solanacearum* comprenant des souches de biovars 1, 2 et N2 (Taghavi *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998a). L'analyse par PCR-RFLP au niveau des gènes *hrp* a permis de fournir un outil capable de discriminer de manière rapide et fiable *R. solanacearum* de *P. syzygii* et du BDB. Ce résultat est important car, au regard de la littérature, il n'avait jamais été obtenu auparavant; seul un couple d'amorces assurant l'amplification spécifique des souches de *P. syzygii* avait jusqu'à présent été développé (Fegan *et al.*, 1998a). Toutes nos diverses analyses moléculaires ont également confirmé que *P. syzygii* et le BDB partagent de grandes homologies de séquences avec *R. solanacearum*. Ces résultats laissent prévoir un futur remaniement taxonomique avec, comme le suggère Fegan (1998), un transfert de *P. syzygii* et du BDB dans le genre *Ralstonia*.

L'utilisation de la technique AFLP pour analyser la diversité d'une collection mondiale de souches de *R. solanacearum* s'est avérée particulièrement fructueuse, à plusieurs titres. Elle a permis de montrer qu'il s'agit d'une méthode fiable pour estimer les relations génétiques entre souches d'une même espèce mais aussi d'espèces très proches d'un point de vue taxonomique. Les conclusions de l'AFLP apparaissent complètement corrélées à celles des comparaisons de séquence du fragment 16S de l'ADNr, gène cible pour toute analyse phylogénétique entre micro-organismes (Woese, 1987). De plus, comme l'AFLP consiste en une analyse du polymorphisme sur l'ensemble du génome et qu'elle autorise une classification similaire à celle issue des hybridations ADN/ADN (Janssen *et al.*, 1996), il pourrait même être envisagé que cette technique vienne à remplacer les hybridations ADN/ADN, technique beaucoup plus lourde à mettre en oeuvre que l'AFLP, pour définir les espèces bactériennes. Cette méthode présente également l'avantage de révéler un très haut niveau de polymorphisme. L'AFLP combinant la puissance de la RFLP et la flexibilité de la PCR (Vos *et al.*, 1995) constitue en effet un excellent outil pour le typage de génomes très similaires. Dans notre cas, elle a permis très fréquemment la différenciation de souches de *R. solanacearum* non distinguées par PCR-RFLP. En particulier, elle a mis en évidence du polymorphisme au sein du biovar 2, biovar le plus homogène chez *R. solanacearum* (illustrations des AFLP en annexes 2, 3 et 4). En raison de son fort pouvoir discriminant, de sa facilité de mise en oeuvre, et de sa grande reproductibilité, l'AFLP semble être parfaitement adaptée à une étude dont l'objectif est l'analyse de la structure d'une population naturelle à l'échelle parcellaire et l'identification de marqueurs épidémiologiques de l'agent pathogène.

Enfin, une question essentielle émerge à l'issue de ces analyses : quelle est la part de représentativité de l'image de la diversité des populations de *R. solanacearum* obtenue par l'utilisation des souches de collection ? En fait, il est probablement vrai de dire que l'image obtenue ne constitue qu'une indication de la diversité réelle. Les souches de collection employées ont toutes été isolées de plantes, et vraisemblablement de plantes avec symptômes. Or *R. solanacearum* peut être isolé de plantes infectées de manière latente, de la rhizosphère ou encore du sol et d'eaux d'irrigation. Il serait particulièrement important de tenir compte de ce paramètre essentiel afin d'obtenir une image moins orientée, du fait de « l'effet collection », de la diversité génétique de *R. solanacearum*. A l'avenir, il serait donc souhaitable d'inclure dans les études sur la diversité des souches provenant d'autres environnements que la plante. Une plus grande diversité de l'espèce serait ainsi probablement mise en évidence.

### III.2. Analyse de la structure d'une population naturelle chez *R. solanacearum*

#### Introduction

La lutte contre les phyto bactérioses, comme le flétrissement bactérien, repose le plus souvent sur l'utilisation de variétés résistantes. Cependant, les propriétés de résistance apparaissent très fréquemment instables. Cette instabilité peut résulter d'un choix inadéquat telle que l'utilisation de variétés qui s'avèrent sensibles vis-à-vis de la population pathogène en place et/ou suite à l'adaptation parasitaire de la population pathogène (changement de la composition et de la fréquence des pathotypes, changement de la structure haplotypique, ou d'une combinaison des deux) conduisant à une population aux caractéristiques phénotypiques nouvelles. Par conséquent, une information suivie et détaillée de la structure des populations semble essentielle pour mieux comprendre la dynamique du pouvoir pathogène et pour adapter les stratégies de lutte. En particulier pour orienter les schémas de sélection et le déploiement de variétés résistantes aux propriétés plus durables à long terme. Par structure de population on entend le degré de diversité de la population, les relations génétiques entre les différents types présents dans cette population, ainsi que leur répartition dans le temps et dans l'espace de la diversité (Leung *et al.*, 1993). De plus, ces données sont à mettre en relation étroite avec les caractéristiques biologiques et épidémiologiques de l'agent pathogène (migration, recombinaison génétique).

Très peu d'études ont été consacrées à l'évolution de la structure des populations des bactéries phytopathogènes. Une étude intéressante concerne *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Restrepo *et al.*, 2000). L'exemple le plus remarquable dans ce domaine concerne *X. oryzae* pv. *oryzae* pour laquelle la structure des populations a été analysée à l'échelle de plusieurs pays (Adhikari *et al.*, 1995; George *et al.*, 1997), de différents agro-écosystèmes dans un même pays (Nelson *et al.*, 1994; Ardales *et al.*, 1996), de plusieurs parcelles d'un site géographique (Ardales *et al.*, 1996) ou d'une seule parcelle (Vera Cruz *et al.*, 1996). Ces études se sont avérées particulièrement intéressantes puisqu'elles ont permis d'apporter des informations importantes sur la relation entre la diversité génomique et la diversité phénotypique de l'agent pathogène, la relation génétique entre les différentes populations de l'agent pathogène, sa migration, l'influence des pratiques culturales et de l'introduction de gènes de résistance sur la dynamique et la structure micro-géographique des populations et les implications pour l'épidémiologie (Leach *et al.*, 1995).

Après avoir obtenu des informations nouvelles sur la structure des populations chez *R. solanacearum* dans son ensemble, par l'utilisation de nombreux outils moléculaires, nous avons tenu à affiner notre étude en focalisant notre effort sur la population présente naturellement dans une parcelle. Compte tenu de l'ampleur de la tâche, qu'il soit bien entendu qu'il ne s'agit là que d'une étude préliminaire. L'étude de la structure des populations au niveau micro-géographique implique l'utilisation d'outils de discrimination très performants. Les techniques comme la RFLP, la RC-PFGE, la RAPD, la rep-PCR sont les plus couramment employées pour résoudre ce genre de question. Ici, nous avons choisi de tester un autre outil qui est l'AFLP. En effet, compte tenu de la grande reproductibilité de la technique, de l'aptitude à évaluer simultanément de multiples loci sur l'ensemble du génome et le fort pouvoir de résolution, celle-ci nous a semblé parfaitement adapté à notre étude.

	1	2	3	4	5	6	7
<b>M</b>	Poivron (Yolo Wonder)	Aubergine (Bonica)	Tomate (Roma)	Aubergine (Black Beauty)	Bringellier	Poivron (Vidi F1)	Pétunia
<b>L</b>	Tomate (Carioca)	Bringellier	Tomate (Djebel)	Tabac (IRA Bourbon)	Tomate (Carioca)	Piment (Salmon)	Pétunia
<b>K</b>	Poivron (Vidi F1)	Tomate (Calinago)	Piment (Salmon)	Géranium (Rosat)			Poivron (Yolo Wonder)
<b>J</b>	Tomate (Roma)	Aubergine (Black Beauty)	Tomate (Macao)	Tabac (IRA Bourbon)	Tomate (Sirius)	Géranium (Rosat)	
<b>I</b>	Poivron (Yolo wonder)	Tomate (Sirius)	Aubergine (Bonica)	Tomate (Carioca)	Géranium (Rosat)	Tomate (Calinago)	
<b>H</b>	Tomate (Macao)	Bringellier	Poivron (Vidi F1)	Géranium (Rosat)	Tomate (Roma)	Poivron (Vidi F1)	Piment (Salmon)
<b>G</b>	Piment (Salmon)	Tomate (Calinago)		Tomate (Macao)	Poivron (Yolo Wonder)	Tomate (Djebel)	
<b>F</b>	Tomate (Djebel)	Piment (Salmon)	Aubergine (Black Beauty)	Tomate (Sirius)		Aubergine (Bonica)	
<b>E</b>		Poivron (Yolo Wonder)	Tomate (Roma)	Tabac (IRA Bourbon)	Tomate (Carioca)	Tabac (IRA Bourbon)	
<b>D</b>	Tomate (Roma)		Géranium (Rosat)	Bringellier		Piment (Salmon)	
<b>C</b>	Tabac (IRA Bourbon)	Poivron (Vidi F1)		Tomate (Sirius)	Tomate (Calinago)	Aubergine (Bonica)	
<b>B</b>	Aubergine (Bonica)	Tomate (Sirius)	Tomate (Calinago)		Aubergine (Black Beauty)		
<b>A</b>	Tomate (Calinago)	Tomate (Calinago)	Tomate (Calinago)	Tomate (Calinago)	Tomate (Calinago)	Tomate (Calinago)	

**Figure III-1. Répartition des espèces (nom du cultivar entre parenthèses) cultivées au sein de la parcelle expérimentale « le vallon ».** Chaque sous-parcelle comprend dix plants de la même espèce.

### III.2.1. Matériels et Méthodes

#### III.2.1.1. Description de la parcelle

La parcelle expérimentale dénommée « le vallon » est localisée sur la station de Ligne-Paradis du CIRAD-Réunion à environ 120 m d'altitude. Cette parcelle présente la caractéristique d'être naturellement infestée par le biovar 3 de *R. solanacearum*. C'est pourquoi depuis un certain nombre d'années des essais y sont réalisés principalement pour évaluer le niveau de résistance du matériel végétal (variétés de tomate le plus fréquemment).

La parcelle est exploitée d'août à novembre 1999 et mesure 25 m de largeur pour 30 m de longueur. Elle est constituée de 13 rangs (A à M) et 7 lignes délimitant des sous-parcelles. Dans chaque sous-parcelle, 10 plants de différentes espèces et cultivars sont cultivés (figure III-1) : tomate (cultivars Sirius, Roma, Macao, Calinago, Carioca et Djebel), poivron (cvs. Vidi F1, Yolo Wonder), aubergine (cvs. Bonica, Black Beauty), tabac (cv. IRA Bourbon), géranium (cv. Rosat), piment (cv. Salmon), bringellier et pétunia.

#### III.2.1.2. Collecte et caractérisation des isolats

Seuls les plants manifestant des symptômes de flétrissement bactérien sont récoltés et analysés au laboratoire par étalement d'une aliquote de broyat sur milieu de Granada et Sequeira (1983b) modifié (annexe 1). Des colonies caractéristiques de *R. solanacearum* (aspect muqueux, couleur blanche et centre rosé, contours irréguliers) sont sélectionnées. L'identité de ces colonies est confirmé par PCR à l'aide du couple d'amorces RS30-RS31 spécifiques de *R. solanacearum* (cf. chapitre III.1.1). Le biovar est également vérifié. Le nombre d'isolats retenu pour chaque sous-parcelle dépend du nombre de plants présentant des symptômes et du succès de l'isolement. Aucun isolat n'est obtenu des plants des cultivars Calinago, Djebel et Carioca de tomate car ils ont été rapidement virosés; quant aux bringellier et pétunia ils se sont révélés résistants.

Parallèlement, un prélèvement de sol est réalisé à une profondeur de 20 cm au niveau des sous-parcelles ayant porté des plants flétris. Vingt grammes de sol prélevé sont mélangés à 200 mL d'eau stérile et mis en agitation pendant une nuit. Une aliquote de la suspension est étalée sur milieu de Granada et Sequeira (1983b) modifié. Les isolats de *R. solanacearum* sont identifiés comme ceux issus de plants.

Parmi les 193 isolats retenus, 107 proviennent de plants et 86 du sol. Cet échantillonnage nous assure, d'après l'équation  $N = \log(1-P) / \log(1-F)$  où N correspond à la taille de l'échantillon, de détecter avec une probabilité  $P = 0,95$  au moins un isolat d'un haplotype présent à une fréquence  $F = 0,013$  dans la population étudiée (Leung *et al.*, 1993).

L'ADN total des isolats de *R. solanacearum* est extrait à l'aide du kit QIAamp® (Qiagen®) dont le protocole est décrit en annexe 11. Cette méthode d'extraction est préférée à la méthode au CTAB (annexe 5) car elle présente l'avantage d'être rapide à mettre en oeuvre et de pouvoir traiter un grand nombre d'extractions simultanément. De plus, les qualités d'ADN extrait sont similaires.

L'analyse AFLP est réalisée comme décrit précédemment (cf. chapitre III.1.2.). Il s'agit en fait d'une modification de la technique de référence (Vos *et al.*, 1995) qui utilise une combinaison d'enzymes *EcoRI* et *MseI*. Les enzymes substituées *MspI* et *SacI* sont plus

Sous-population :

A B  
M 1 2 3 4 1 2 3 4

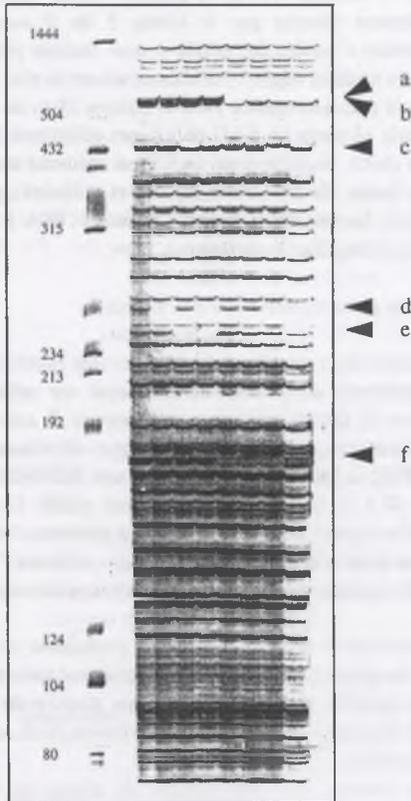


Figure III-2. Profils électrophorétiques des huit haplotypes (sous-populations A et B) de *R. solanacearum* mis en évidence au sein de la parcelle "le vallon" par la technique AFLP. La pointe des flèches indique la position des six bandes (a à f) permettant la discrimination des haplotypes. Piste M : marqueur de taille en pb (pBR322, *Hae*III; pBR322, *Taq*I).

adaptées au génome de *R. solanacearum* riche en bases G+C (environ 65 %) et possèdent, en outre, des sites de restriction bien représentés au sein de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène (clusters *esp* et *hrp* en particulier).

### III.2.1.3. Analyse des données

La comparaison des empreintes génomiques générées par l'AFLP pour chaque isolat, permet l'identification de profils AFLP distincts nommés haplotypes. La présence ou l'absence des bandes discriminantes est convertie en données binaires (1 pour présence et 0 pour absence) permettant le calcul du coefficient de similarité de Jaccard pour une comparaison deux à deux des haplotypes et du coefficient de dissimilarité (1 - coefficient de Jaccard) à l'aide du logiciel NTSYS-pc (Rohlf, 1998). A partir de la matrice de dissimilarité, un arbre est construit par la méthode de classification du Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) et la robustesse des branches de l'arbre est testée par la méthode du bootstrap.

La diversité génétique de chaque groupe considéré (population totale, sous-population, plante, sol) est estimée par l'indice de diversité haplotypique de Nei (Nei, 1987; Nei & Tajima, 1981) :  $H = [n/(n-1)] [1 - \sum X_i^2]$  où  $X_i$  correspond à la fréquence de l'haplotype  $i$  et  $n$  le nombre d'isolats testé pour chaque groupe.

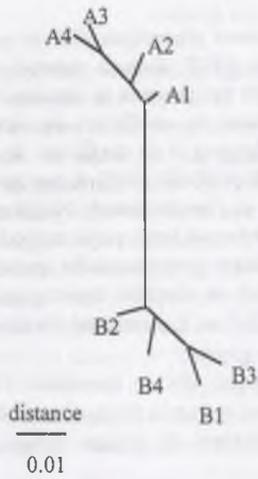
Un test de  $\chi^2$  est appliqué afin de déterminer l'existence d'une différence de fréquence des haplotypes dans le sol et dans la plante. Un test de Gstat est utilisé pour mettre en évidence une liaison entre haplotypes ou groupes d'haplotypes et des plantes ou des localisations sur la parcelle.

### III.2.3. Résultats

Les 193 isolats de la parcelle « le vallon », sont tous identifiés au biovar 3. L'analyse des empreintes génomiques obtenues révèle que, selon les profils, 80 à 85 bandes de taille comprise entre environ 50 et 600 pb, sont générées de manière reproductible. Parmi ces bandes, seulement six s'avèrent discriminantes (figure III-2), ce qui montre une très grande homogénéité des isolats. La présence ou l'absence de ces six bandes selon les combinaisons permet de distinguer huit profils, soit huit haplotypes. Le nombre d'isolats par haplotype n'est pas homogène : l'haplotype prédominant est constitué par 129 isolats soit environ 67 % de l'ensemble des isolats alors que l'haplotype minoritaire n'est représenté que par un seul isolat.

L'arbre illustrant les relations génétiques des différents haplotypes montre très clairement que deux groupes, A et B, que l'on peut considérer comme deux sous-populations, coexistent au sein de la parcelle étudiée (figure III-3). La répartition dans les deux groupes est déséquilibrée puisque le groupe A comprend environ 85 % des isolats et le groupe B seulement 15 %. La distinction des deux groupes est basée sur la présence (A) ou l'absence (B) de trois bandes spécifiques dans les profils AFLP. L'estimation de la diversité génétique de chaque groupe révèle que le groupe B ( $H_B = 0,63$ ) est nettement plus hétérogène que le groupe A ( $H_A = 0,35$ ). La diversité haplotypique de la population totale ( $H_T$ ) est de 0,51. Selon la sous-parcelle, la diversité est très variable passant de 0,69 à 0,72 pour H-3 et H-6 à 0,12 et 0,18 pour M-6 et F-6. Les deux groupes semblent être distribués différemment dans la parcelle (figure III-4). Le groupe A (haplotypes A1, A2, A3 et A4), présent dans 27 des 29 sous-parcelles étudiées, est réparti sur l'ensemble de la parcelle. En revanche, le groupe B

The Neighbor-Joining method is a hierarchical clustering algorithm that is particularly well-suited for the analysis of distance data. It is a modification of the UPGMA method, which is a type of agglomerative clustering. The main difference between the two methods is that Neighbor-Joining does not assume a constant rate of evolution, which makes it more accurate for many biological datasets.



**Figure III-3.** Arbre construit par la méthode du Neighbor-Joining illustrant les relations des différents haplotypes des sous-populations A (haplotypes A1, A2, A3 et A4) et B (haplotypes B1, B2, B3 et B4) mises en évidence au sein de la parcelle expérimentale "le vallon".

The results of the Neighbor-Joining analysis show that the haplotypes from population A (A1, A2, A3, A4) form a distinct cluster, as do the haplotypes from population B (B1, B2, B3, B4). This suggests that there is a clear genetic differentiation between the two populations. The distance between the two main clusters (A and B) is significantly larger than the distances within each cluster, indicating that the two populations have diverged genetically. The internal structure of each cluster shows that there is also some genetic differentiation within each population, with A1 and A2 being the most closely related, and B1 and B2 being the most closely related within population B.

(haplotypes B1, B2, B3 et B4) semble être beaucoup plus localisé puisque 24 des 28 isolats du groupe sont situés dans six sous-parcelles très proches (J-4, J-5, J-6, I-5, H-3, H-6). Au sein de ces six sous-parcelles, les isolats représentant le groupe B peuvent même constituer plus de 50 % du total des isolats. Un test de Gstat montre que les isolats du groupe B sont très significativement plus fréquents ( $P < 0,0005$ ) dans la zone de la parcelle délimitée par les rangs H à J et les lignes 3 à 6, que dans le reste de la parcelle. Cependant, la mise en évidence de l'haplotype B2 dans deux autres zones (B-1 et C-6), semble indiquer que les isolats du groupe B peuvent également être présents dans d'autres zones de la parcelle.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que les haplotypes A4, B2 et B4 sont isolés uniquement de plantes, jamais du sol, les autres haplotypes provenant aussi bien de plante que du sol. Cependant, un test de  $\chi^2$  montre qu'il n'existe pas de différence significative au niveau de la composition haplotypique entre les populations du sol et de la plante. De plus, les estimations de la diversité génétique des isolats du sol et des plantes sont similaires ( $H_{\text{sol}} = 0,50$  et  $H_{\text{plante}} = 0,53$ ). En s'intéressant plus précisément à la distribution et la diversité haplotypique selon les plantes, on peut constater que le poivron cv. Vidi F1 et l'aubergine cv. Bonica se distinguent. En effet, six des huit haplotypes sont détectés chez ce cultivar de poivron ( $H_{\text{poivronVF1}} = 0,67$ ) alors que dans tous les autres cas quatre haplotypes au maximum sont mis en évidence. De plus, les haplotypes B3 et B4 ne sont présents que chez le poivron cv. Vidi F1. Quant à l'aubergine cv. Bonica ( $H_{\text{aubBonica}} = 0,71$ ) quatre des cinq représentants de l'haplotype B2 ainsi que l'unique représentant de l'haplotype A4 y sont retrouvés. Si l'on s'intéresse à la distribution des groupes d'haplotypes selon les plantes, on peut remarquer que les haplotypes du groupe B ne se retrouvent pas (excepté un isolat sur 42 au total) chez la tomate, le tabac et le piment (bien que pour ces deux dernières plantes il est difficile d'obtenir une information significative car le nombre d'isolats est très faible, cinq au total) alors que chez l'aubergine, le poivron et le géranium, les deux sous-populations sont mises en évidence. En outre, les haplotypes du groupe B, parce que plus fréquemment isolés dans ces plants, apparaissent significativement associés à l'aubergine ( $P < 0,05$ ), au géranium ( $P < 0,05$ ) et au poivron ( $P < 0,005$ ).

### III.2.4. Discussion

Jusqu'à présent, très peu d'études ont été consacrées à l'analyse de la diversité génétique d'une bactérie phytopathogène au sein d'une parcelle, les seules concernent *X. oryzae* pv. *oryzae* (Ardales *et al.*, 1996; Vera Cruz *et al.*, 1996) *X. pv. mangiferaeindicae* (Gagnevin, 1998) et *R. solanacearum* (Darrasse *et al.*, 1998; Horita & Tsuchiya, 1998; Jaunet & Wang, 1998).

L'utilisation de l'AFLP s'est avérée très fructueuse pour l'analyse de la diversité des bactéries phytopathogènes (Janssen *et al.*, 1996; Clerc *et al.*, 1998; Van der Wolf *et al.*, 1998; Restrepo *et al.*, 1999; Henry *et al.*, 2000; Pilet *et al.*, 2000). Pourtant, à notre connaissance, aucune publication décrivant l'utilisation de l'AFLP pour une étude de diversité d'une bactérie phytopathogène au sein d'une parcelle n'est encore parue à ce jour, ce qui confère un caractère original à nos recherches.

La grande similarité des profils AFLP obtenus pour l'ensemble des 193 isolats de *R. solanacearum* étudiés témoigne de la présence d'une population très homogène au sein de la parcelle. Cette homogénéité pourrait être due à la monoculture de tomate (cultivars sensibles ou résistants) effectuée pendant de nombreuses années sur cette parcelle, des cultures plus

	1	2	3	4	5	6	7
<b>M</b>	P : A1 (1) S : -	P : A2 (1) S : -		P : A1 (1) S : A1 (3)		P : A1 (10) S : A1 (5), A2 (1)	
<b>L</b>				P : A1 (2) S : A1 (3)		P : A2 (1) S : A1 (2), A2 (1)	
<b>K</b>	P : A1 (2) S : A1 (3), A2 (1)						P : A1 (4) S : A1 (5)
<b>J</b>	P : A1 (3), A2 (2) S : A1 (3), A2 (1)			P : A1 (2) S : A1 (2), A2 (1), B1 (1)	P : A1 (3), A2 (1), B1 (1) S : A1 (4), A2 (1)	P : A1 (2), B1 (1) S : -	
<b>I</b>		P : A1 (4), A2 (4) S : A1 (5)	P : A1 (1), A2 (2), A4 (1) S : A2 (4)		P : B1 (2) S : A2 (1), B3 (2)		
<b>H</b>	P : A1 (1) S : A2 (2)		P : B1(4), B2 (1), B3 (2), B4 (1) S : A1 (3), B1 (4)		P : A1 (6), A2 (1) S : A1 (2), A2 (1)	P : A1 (3), B4 (2) S : A1 (1), B1 (3)	
<b>G</b>				P : A1 (1) S : A1 (1)			
<b>F</b>			P : A1 (1) S : A1 (3)	P : A1 (5), A3 (1) S : A1 (3)		P : A1 (6) S : A1 (4), A3 (1)	
<b>E</b>			P : A1 (7) S : A1 (2), A2 (3)				
<b>D</b>			P : A1 (3), A2 (1) S : A1 (1), A2 (1)				
<b>C</b>		P : A1 (1), A2 (3) S : A1 (3)		P : A1 (1) S : -		P : B2 (3) S : -	
<b>B</b>	P : B2 (1) S : -						
<b>A</b>							

Figure III-4. Répartition des haplotypes (en gras) mis en évidence au sein de la parcelle expérimentale « le vallon ».

Le nombre d'isolats est indiqué entre parenthèses.

P et S indiquent respectivement que les isolats sont issus de la plante et du sol.

diversifiées n'ayant été réalisées que très récemment. D'ailleurs, la diversité haplotypique de cette population ( $H_T = 0,51$ ), comparée à celles d'analyses similaires réalisées sur une population de *R. solanacearum* à Taïwan ( $H_T = 0,99$ ) (Jaunet & Wang, 1998) ou de *X. pv. mangiferaeindicae* à la Réunion ( $H_T = 0,95$ ) (Gagnevin, 1998), n'apparaît pas très élevée; mais cette diversité est supérieure à celle d'une population de *X. oryzae pv. oryzae* aux Philippines ( $H_T = 0,43$ ) (Vera Cruz *et al.*, 1996). Néanmoins, sachant que la diversité haplotypique est fortement dépendante de l'outil d'analyse utilisé, il s'avère par conséquent difficile de comparer ces valeurs de diversité haplotypique dans la mesure où elles ont été obtenues avec des outils de typage différents (différents types de sondes RFLP, rep-PCR, AFLP).

Huit haplotypes, sur la base de la présence ou l'absence de six bandes au niveau des profils AFLP, ont pu être définis; la rareté de certains haplotypes contrastant avec la plus grande fréquence (jusqu'à 129 isolats pour l'haplotype prédominant) de certains autres. Deux sous-populations, chacune incluant quatre haplotypes, peuvent être clairement mises en évidence au sein de cette parcelle. La distribution de la sous-population prédominante (A, environ 85 % des isolats) semble être aléatoire car elle est détectée au sein de 27 des 29 sous-parcelles étudiées alors que la sous-population minoritaire (B, environ 15 % des isolats) semble être localisée dans une zone de la parcelle même si quatre isolats ont été détectés dans deux autres zones. Un échantillonnage plus intensif (car le nombre d'isolats par sous-parcelle est trop variable) et systématique (non basé uniquement sur le développement de symptômes de flétrissement) dans chaque sous-parcelle pourrait apporter les informations requises. Il est important de noter que l'échantillonnage dans cette étude a été réalisé à une seule date, par conséquent des informations sur la dispersion ou l'influence de l'hôte sur la structure de la population n'ont pu être acquises. Toutefois, la distribution aléatoire des haplotypes A dans la parcelle pourrait indiquer une bonne dispersion de l'inoculum initial, peut-être due aux eaux d'irrigation. En outre, deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le fait que chez la tomate seule la sous-population A (une exception cependant) est isolée alors que chez le poivron, l'aubergine ou le géranium les deux sous-populations sont mises en évidence. La première hypothèse serait que la tomate sélectionne spécifiquement la sous-population A, les deux sous-populations étant présentes dans le sol. La seconde hypothèse serait que seule la sous-population A était présente pendant la monoculture de tomate et que la culture ultérieure de poivron, d'aubergine et de géranium ait entraîné une diversification au sein de la sous-population A générant la sous-population B.

A l'avenir, il serait par conséquent particulièrement intéressant de suivre l'évolution de la population de *R. solanacearum* au sein de cette parcelle en fonction des conditions de culture (monoculture ou rotations culturales). De même, il serait très important de prendre en compte les infections latentes, que nous n'avons pas recherchées lors de cette première étude, car elles sont susceptibles également de révéler de la diversité. Une telle approche pourrait permettre de mieux comprendre la dynamique des populations de *R. solanacearum* et de rendre compte du rôle de la plante dans la diversité de l'agent pathogène, elle permettrait également d'apporter des informations sur la sélection spécifique éventuelle par la plante-hôte de(s) clone(s) pré-existant(s) au sein d'une population naturelle hétérogène. L'étude d'Horita et Tsuchiya (1998) comparant, par rep-PCR, la diversité génétique d'une population de *R. solanacearum* avant et après une culture de tomate, suggère que la plante a effectivement une influence sur la diversification de l'agent pathogène. Parmi les pressions de sélection s'exerçant sur la structure génétique des populations d'agents phytopathogènes, la diversité du

génotype de l'hôte est considérée comme un des principaux facteurs influençant la structure génétique des populations, comme cela a été montré pour les populations de *X. axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie (Restrepo & Verdier, 1997) et de *X. oryzae* pv. *oryzae* aux Philippines (Ardales *et al.*, 1996). En outre, l'habitat naturel de même que les pratiques culturales sont présumés être des facteurs très importants (Leung *et al.*, 1993). *R. solanacearum* étant un germe tellurique, les propriétés du sol et de la rhizosphère de l'hôte pourrait jouer un rôle non négligeable dans la différenciation génétique de ce pathogène comme cela a été démontré pour d'autres bactéries d'origine tellurique telle *B. cepacia* (McArthur *et al.*, 1988; Di Cello *et al.*, 1997; Dalmastrì *et al.*, 1999) ou des *Pseudomonas* fluorescents (Latour *et al.*, 1996). De plus, les recombinaisons génétiques et transferts horizontaux de gènes sont soupçonnées avoir également une grande importance dans la diversification génétique des bactéries du sol (Maynard Smith *et al.*, 1993; Wise *et al.*, 1996; Haubold & Rainey, 1997; Dalmastrì *et al.*, 1999). Bien que *R. solanacearum* soit naturellement compétente pour la transformation génétique (Bertolla *et al.*, 1997; Bertolla *et al.*, 1999), l'importance des recombinaisons génétiques sur la structure de ses populations reste à être évaluée. L'existence de transferts horizontaux de gènes a déjà été suspectée chez *R. solanacearum* (Cook & Sequeira, 1991b; Cook & Sequeira, 1994). Cependant, il peut être envisagé que les transferts de gènes pourraient permettre à *R. solanacearum* d'améliorer sa capacité de résister aux conditions de stress (dans le sol en particulier), de coloniser l'hôte ou d'accroître sa gamme d'hôtes. L'élargissement régulier de la gamme d'hôtes de *R. solanacearum* pourrait être considéré comme un indice fort de la capacité de la bactérie de s'adapter fréquemment à de nouveaux environnements.

D'autres approches, qui n'ont pu être suivies par manque de temps dans le cadre de cette thèse, peuvent également être envisagées dorénavant. La première serait de purifier les marqueurs discriminants identifiés par AFLP, puis de les amplifier, de les cloner et de les séquencer. Leurs séquences nucléotiques pourront alors être comparées avec la banque de données de la souche de référence GMI1000 (biovar 3) dont le génome est actuellement entièrement séquencé par le groupe de Christian Boucher (INRA/CNRS de Toulouse).

La seconde approche serait, en utilisant des souches représentatives des deux populations identifiées au sein de la parcelle expérimentale, de vérifier si la diversité génomique s'accompagne d'une diversité pathologique (gamme d'hôtes, agressivité). La diversité pathologique pourrait être estimée par comparaison des niveaux d'agressivité des isolats en conditions contrôlées sur une gamme de plantes-hôtes incluant la tomate, la pomme de terre, le poivron, l'aubergine, le tabac, le géranium rosat et sur des cultivars de tomate représentant la gamme de sensibilité au flétrissement bactérien. Une étude similaire, menée en Guadeloupe dans une parcelle naturellement contaminée par une population de *R. solanacearum* de biovar 1, a montré l'existence d'une telle corrélation (Darrasse *et al.*, 1998). En revanche, aucune corrélation n'a été observée en analysant des souches de diverses origines géographiques (localement ou internationalement) (Darrasse *et al.*, 1998; Jaunet & Wang, 1999). L'existence d'une telle corrélation semble donc être dépendante de la nature même de la population étudiée. Cette constatation souligne l'existence de différences fondamentales au niveau de l'analyse des groupements « naturels » de souches ayant un passé coévolutif et les groupements plus « artificiels » de souches issues de divers contextes biologiques et environnementaux (Buddenhagen, 1986). Elle renforce également la nécessité des études proches du terrain et l'intérêt qui doit leur être porté. Ces résultats suggèrent aussi que l'étude

de souches ayant des génomes très similaires est une voie qui pourra faciliter l'identification de marqueurs génétiques gouvernant le pouvoir pathogène (l'agressivité) et l'adaptation parasitaire.

La dernière approche envisagée aborderait le rôle de la plante dans l'apparition de la diversité chez l'agent pathogène. L'influence de la plante pourrait être évaluée par une variation de la nature même de la plante utilisée : plante hôte ou non-hôte, cultivar sensible ou tolérant. L'approche expérimentale serait conduite en conditions contrôlées par l'emploi de pots contenant des sols « artificiels » inoculés par les souches représentatives des deux sous-populations (ces souches devront être caractérisées également d'un point de vue phénotypique, car l'utilisation du BIOLOG a permis d'établir des corrélations avec l'hôte; résultats du laboratoire prochainement soumis pour publication). Ce système clos devrait permettre plusieurs cycles de culture du même hôte ou d'hôtes différents, ou de maintenir le sol totalement nu et d'y analyser alors les modifications phénotypiques et génomiques pouvant intervenir dans les populations bactériennes présentes aussi bien dans les plantes que dans le sol. Sur un plan agronomique, la confirmation du rôle de la plante dans l'émergence d'une diversité au sein des populations de *R. solanacearum* pourrait orienter le choix des plantes à intégrer aux rotations culturales.

**IV. DETECTION MOLECULAIRE DE  
*RALSTONIA SOLANACEARUM***

## Introduction

Le succès de la lutte contre le flétrissement bactérien, comme pour toute phytobactériose, repose en grande partie sur la qualité des méthodes de détection de l'agent pathogène. Les outils mis au point jusqu'à présent (milieux semi-sélectifs, réactifs sérologiques) pour l'identification et la détection de *R. solanacearum* et de ses variants (biovar, race) ne présentent pas tous les critères de qualité requis pour une détection efficace (spécificité, sensibilité, rapidité, reproductibilité). La mise en oeuvre des techniques de biologie moléculaire, en particulier la PCR, a permis d'effectuer de nets progrès dans le domaine du diagnostic du flétrissement bactérien. Ces progrès résultent essentiellement des travaux de Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a; Seal *et al.*, 1992b; Seal *et al.*, 1993).

Pour ce qui concerne le diagnostic du flétrissement bactérien à la Réunion, aucune recherche au niveau moléculaire n'avait été réalisée avant cette thèse. Il nous a tout d'abord semblé important de valider sur les trois populations réunionnaises de *R. solanacearum* (biovar 1/race 1; biovar 2/race 3; biovar 3/race 1), les outils existants déjà avant de créer, si nécessaire, d'autres outils pouvant répondre plus spécifiquement à la problématique de détection des populations de *R. solanacearum* à la Réunion. L'outil moléculaire a ensuite été évalué pour la détection efficace de *R. solanacearum* dans les différents milieux au sein desquels la bactérie est susceptible de se conserver.

## IV.1. Validation des résultats obtenus par Seal et ses collaborateurs

### IV.1.1. Matériels et méthodes

#### IV.1.1.1. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées

Les caractéristiques de l'ensemble des souches, près de 200 au total, employées dans cette étude sont décrites dans les articles parus dans AEM (cf. chapitre III.1.1.) et Microbiology (cf. chapitre III.1.2.). En raison de l'objectif principal de notre étude, un grand nombre de souches isolées de l'île de la Réunion sont incluses. Les autres souches sont choisies de manière à représenter la large gamme d'hôtes, la large distribution géographique et la diversité métabolique de l'espèce (biovars). Le biotypage de chaque souche de *R. solanacearum*, même s'il a été réalisé auparavant, est systématiquement effectué.

Afin de vérifier la spécificité des outils PCR mis au point, différentes souches appartenant à des espèces plus ou moins proches de *R. solanacearum*, d'un point de vue phylogénétique, sont intégrées. Ces espèces (ou taxons) sont les suivantes : *E. chrysanthemi*, *X. sp. pv. mangiferae-indicae*, *X. vesicatoria*, *P. fluorescens*, *P. fuscovaginae*, *P. cichorii*, *P. syringae pv. tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *R. pickettii*, *R. eutropha*, *B. cepacia*, *P. syzygii*, le blood disease bacterium (BDB).

Toutes les souches sont conservées à -80 °C sur des microbilles contenues dans des tubes de congélation (Microbank Pro-Lab Diagnostics, Austin, EU). Pour utiliser ces souches, il faut dans un premier temps vérifier leur pureté et confirmer leur identité. Dans cette optique, les souches sont préalablement ensemencées dans du milieu LP (composition en annexe 1) et placées en agitation pendant 24 h à 48 h à 28 °C puis sont cultivées après étalement en trois

**Tableau IV-1. Séquences des amorces développées par Seal et ses collaborateurs et utilisées dans notre étude (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).**

Couple d'amorces	Séquence
PS96H PS96I	5' TCACCGAAGCCGAATCCGCGTCCATCAC 3' 5' AAGGTGTCGTCCAGCTCGAACCCGCC 3'
OLI1 Y2	5' GGGGGTAGCTTGCTACCTGCC 3' 5' CCCACTGCTGCCTCCCCTAGGAGT 3'
T3A T5A	5' GGGGGTTCGAATCCCGCCGGCCCCA 3' 5' AGTCCGGTGTCTAACCAACTGAG 3'

**Tableau IV-2. Conditions d'amplification utilisées pour les amorces développées par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).**

Constituants du mélange réactionnel (en µl)	Couples d'amorces		
	PS96H-PS96I	OLI1-Y2	T3A-T5A
Eau HPLC (Sigma)	35,25	34,25	35,25
Tampon (10 X) (Gibco BRL)	5	5	5
MgCl <sub>2</sub> (1 mM/µl) (Gibco BRL)	1,5	1,5	1,5
dNTP (0,2 mM/µl) (Roche)	1	1	1
Amorces (1 µM/µl)	1	0,5	1
Taq polymérase (5U/µl) (Gibco BRL)	0,25	0,25	0,25
ADN (20 ng/µl)	2	2	2
Volume total	50 µl	50 µl	50 µl

**Tableau IV-3. Programmes d'amplification utilisés pour les amorces développées par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a, 1992b et 1993).**

Etapas d'amplification	Couples d'amorces		
	PS96H-PS96I	OLI1-Y2	T3A-T5A
Dénaturation initiale	96 °C, 2 min	96 °C, 2 min	95 °C, 5 min
- Dénaturation	94 °C, 10 s (*)	94 °C, 20 s (†)	94 °C, 10 s (*)
- Hybridation	64 °C, 20 s (*)	68 °C, 20 s (†)	48 °C, 15 s (*)
- Elongation	72 °C, 20 s (*)	72 °C, 30 s (†)	72 °C, 1 min (*)
Elongation terminale	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min	72 °C, 10 min
Conservation	4 °C, n min	4 °C, n min	4 °C, n min

(\*) : 40 cycles d'amplification.

(†) : 35 cycles d'amplification.

secteurs durant 72 h à 28 °C soit, pour les souches de *R. solanacearum*, sur milieu de Granada et Sequeira modifié (annexe 1) soit, pour les autres espèces, sur milieu LPGa (annexe 1). C'est la culture d'une colonie isolée qui, incubée durant 24 h, est alors utilisée lors de chaque manipulation.

#### IV.1.1.2. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN total des bactéries est réalisée par la méthode au CTAB (annexe 5). Ce protocole permet l'obtention d'un bon rendement (100 à 400 µg/mL) et de surcroît d'une bonne pureté (< 1 % de protéines). Les principes d'estimation de concentration et de pureté de l'ADN utilisés sont présentés en annexe 6.

#### IV.1.1.3. Conditions d'utilisation de la technique PCR pour l'amplification de l'ADN des souches de *R. solanacearum*

##### IV.1.1.3.1. Couples d'amorces

Trois couples d'amorces différents sont essayés. Les amorces sont synthétisées par Genosys Biotechnologies (Cambridge, GB), leurs séquences figurent dans le tableau IV-1.

Le premier couple d'amorces utilisé, PS96H-PS96I, est décrit comme spécifique de l'espèce *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1992a). Ces amorces, dont la localisation est supposée être au niveau des gènes *hrp*, dirigent l'amplification d'un fragment de 148 pb.

Le second couple d'amorces utilisé, OLI1-Y2, situé au niveau de l'ADNr 16S, autorise l'amplification d'un fragment de 288 pb spécifique du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993). Comme *P. syzygii* et le BDB ne sont pas présents à la Réunion, l'utilisation de ce couple d'amorces pour l'identification des souches réunionnaises de *R. solanacearum* nous a semblé parfaitement adapté.

Le troisième couple d'amorces utilisé, T3A-T5A, localisé au niveau de l'ARNt permet d'aboutir à une identification des souches de *R. solanacearum* au niveau infra-spécifique (Seal *et al.*, 1992b). En effet, trois profils peuvent être obtenus pour les différents biovars de l'espèce : un profil est caractéristique du biovar 1 (deux fragments amplifiés : 100 et 200 pb), un autre du biovar 2 (un seul fragment amplifié : 100 pb), et le troisième des biovars 3, 4 et 5 (deux, 100 et 450 pb, ou trois, 100-200 et 450 pb, fragments amplifiés). Comme à la Réunion, les biovars 1, 2 et 3 sont présents, il est par conséquent très intéressant de tester ces amorces dans le cadre de notre étude.

##### IV.1.1.3.2. Conditions d'amplification

Les réactions d'amplification sont effectuées dans l'amplificateur GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer Corporation, Norwalk, EU). Cinquante microlitres de mélange réactionnel sont soumis à l'amplification après addition de l'ADN cible. Les constituants du mélange réactionnel sont les suivants : de la *Taq* ADN polymérase (5 U/µL; Gibco BRL-Life Technologies, Cergy Pontoise, France), du tampon 10X (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,4), du MgCl<sub>2</sub> (50 mM; Gibco BRL), des dNTP (bases nucléotidiques : dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10mM; Roche, Meylan, France), un couple d'amorces, et de l'eau ultra pure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne).

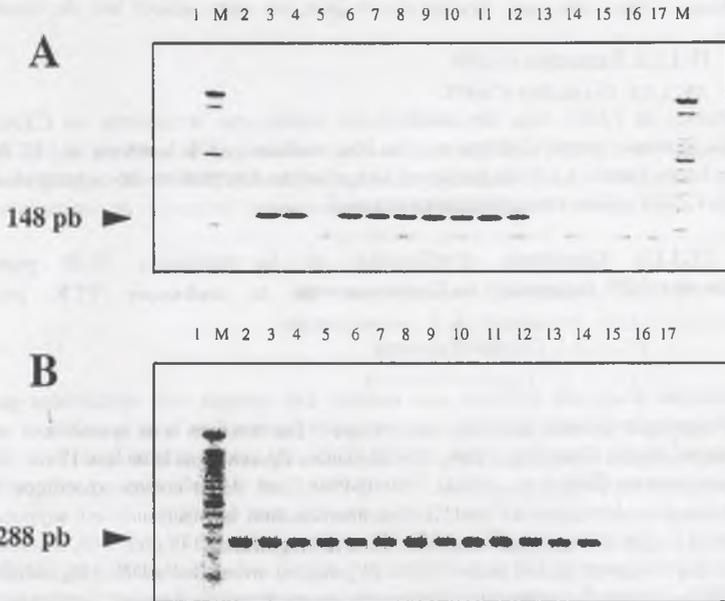


Figure IV-1. Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec les couples d'amorces PS96H-PS96I (A) et OLI1-Y2 (B) définis par S. Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a et 1993).

Piste M : marqueur de taille 100 pb. Pistes 1 à 17 : eau, témoin négatif; *R. solanacearum* biovar 1 Réunion, JT525; *R. solanacearum* biovar 2 Réunion, JT509; *R. solanacearum* biovar 3 Réunion, JT517; *R. solanacearum* biovar 1 Zimbabwe, JS946; *R. solanacearum* biovar 1 Martinique, JS734; *R. solanacearum* biovar 1 Etats-Unis, JR659; *R. solanacearum* biovar 2 Pérou, JQ1144; *R. solanacearum* biovar N2 Brésil, JT662; *R. solanacearum* biovar 3 Japon, JS945; *R. solanacearum* biovar 4 Chine, JS835; *R. solanacearum* biovar 5 Chine, JT661; *P. syzygii*, JV1010; BDB, JT656; *R. pickettii*, JR660; *B. cepacia*, JR661; *R. eutropha*, JS755.

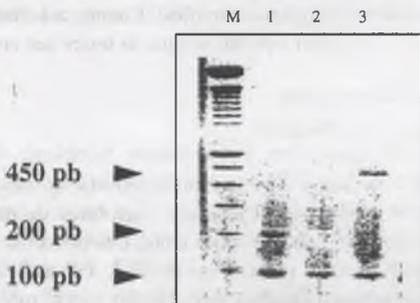


Figure IV-2. Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec le couple d'amorces T3A-T5A défini par S. Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992b).

Piste M : marqueur de taille 100 pb. Pistes 1 à 3 : *R. solanacearum* biovar 1 Réunion, JT525; *R. solanacearum* biovar 2 Réunion, JT509; *R. solanacearum* biovar 3 Réunion, JT517.

Pour chaque couple d'amorces, les concentrations de chaque constituant du mélange réactionnel ainsi que les programmes d'amplification (tableaux IV-2 et IV-3) sont effectués tels qu'il ont été décrits dans les articles de référence.

Pour chaque couple d'amorces, nous avons tout d'abord vérifié que les conditions d'amplification définies par Seal *et al.* (1992a, 1992b et 1993) étaient bien adaptées à la détection des souches réunionnaises. Selon les résultats obtenus, une optimisation des conditions d'amplification est effectuée ou non. Cette optimisation est réalisée par la mise en oeuvre de la méthode de Taguchi, adaptée à la technique PCR par Cobb et Clarkson en 1994. Cette procédure consiste à combiner en un minimum d'expériences trois concentrations différentes de constituants du mélange réactionnel :  $MgCl_2$ , ADN, amorces, dNTP (annexe 7).

#### IV.1.1.4. Electrophorèse et révélation

Les amplifiats obtenus sont déposés à raison de 15  $\mu L$  par puits sur un gel de 1 % à 2 % d'agarose (Nusieve 3 : 1, FMC Bioproducts, Rockland, EU) selon la taille des fragments à séparer. La migration est effectuée durant 1 h 30 min sous une tension de 100 volts dans du tampon TAE 1X (annexe 8). Pour visualiser le front de migration et entraîner les dépôts au fond des puits, chaque échantillon est mélangé à 2  $\mu L$  d'une solution contenant du bleu de bromophénol (0,25 %) du xylène cyanol (0,25 %) et du Ficoll 400 (15 %). Afin de vérifier la taille des fragments obtenus, les marqueurs de masse moléculaire 100 pb et 1 kpb (Gibco-BRL) sont utilisés. Chaque gel est ensuite coloré dans une solution contenant du bromure d'éthidium durant 15 min, rincé dans de l'eau, puis photographié sous rayonnements ultraviolets à l'aide de l'appareil GDS 5000 UVP.

### IV.1.2. Résultats

#### IV.1.2.1. Couple d'amorces PS96H-PS96I (Seal *et al.*, 1992a)

Les amorces PS96H et PS96I, testées sur l'ADN extrait de souches représentatives des trois populations réunionnaises de *R. solanacearum* aboutissent à un résultat assez surprenant car seules les souches appartenant au biovar 2 et au biovar 3 sont identifiées (fragment amplifié de taille escomptée : 148 pb). En effet, il s'avère que quelles que soient les conditions expérimentales sélectionnées (température de l'étape d'hybridation des amorces à l'ADN, concentrations des différents constituants du mélange réactionnel) aucune amplification ne peut être obtenue pour les souches appartenant au biovar 1.

Afin de vérifier les résultats de Seal *et al.* (1992a) qui ont montré que toutes les souches de *R. solanacearum* testées ont été identifiées (à l'exception de trois souches avirulentes) par l'emploi de ces amorces, nous avons poursuivi notre étude sur l'ensemble des souches de notre collection. En fait, toutes les souches (biovars 1, 2, N2, 3, 4 et 5) conduisent à l'obtention du signal d'amplification attendu (figure IV-1A) à l'exception des souches de biovar 1 originaires de la partie Sud du continent africain (Angola, Zimbabwe, Madagascar et île de la Réunion) et de quatre autres souches (CFBP2964, biovar 3, aubergine, Martinique; CFBP765, biovar 4, tabac, Japon; R288, biovar 5, mûrier, Chine; NCPPB4011, biovar 5, mûrier, Chine).

Par ailleurs, il apparaît que le produit d'amplification est bien spécifique de l'espèce *R. solanacearum* puisque aucune amplification n'est obtenue pour les souches appartenant à des espèces plus ou moins proches phylogénétiquement de l'espèce *R. solanacearum* sauf si la

température utilisée lors de l'étape d'hybridation des amorces à l'ADN est diminuée (56 °C au lieu de 64 °C) mais la bande obtenue n'a pas alors la taille correspondant à celle visible pour *R. solanacearum* (148 pb).

#### IV.1.2.2. Couple d'amorces OLI1-Y2 (Seal *et al.*, 1993)

Le produit d'amplification (288 pb), généré par l'utilisation des amorces OLI1-Y2, est obtenu pour l'ensemble des souches de *R. solanacearum* testées (souches réunionnaises ou non réunionnaises) ainsi que pour les souches de *P. syzygii* et de BDB confirmant les résultats de Seal *et al.* (1993) (figure IV-1B). Toutefois, il est important de noter que des bandes d'intensité faible sont parfois également visibles pour les souches appartenant à des espèces proches phylogénétiquement de *R. solanacearum* (notamment *R. eutropha*, *R. pickettii* et *B. cepacia*).

#### IV.1.2.3. Couple d'amorces T3A-T5A (Seal *et al.*, 1992b)

En employant strictement les conditions définies par Seal *et al.* (1992b), les résultats obtenus se révèlent peu satisfaisants puisque nous ne sommes pas parvenus à reproduire exactement ceux présentés dans l'article de référence. Mais, après l'application d'un test de Cobb et Clarkson (1994) nous avons réussi à optimiser les conditions d'amplification puisque les bandes escomptées ont pu être obtenues : deux fragments de 100 et 200 pb pour les souches de biovar 1, un fragment de 100 pb pour les souches de biovar 2, et deux fragments de 100 et 450 pb pour les souches de biovar 3 (figure IV-2). Cependant, même si les résultats sont de meilleure qualité, ils se caractérisent par un manque de reproductibilité. De plus, les bandes obtenues ont souvent une intensité faible et les nombreux « bruits de fond » observés ne peuvent être éliminés.

### IV.1.4. Discussion

L'utilisation du couple d'amorces PS96H-PS96I (Seal *et al.*, 1992a) pour l'identification des souches réunionnaises de *R. solanacearum* n'apparaît pas envisageable puisque seuls les biovars 2 et 3 peuvent être mis en évidence. Les souches de biovar 1 originaires de la Réunion mais aussi de pays de la partie Sud de l'Afrique tels que l'Angola, le Zimbabwe, et Madagascar ne conduisent pas à l'obtention d'un signal d'amplification; il faut signaler qu'aucune souche de cette partie du monde n'avait été intégrée dans l'étude de Seal *et al.* (1992a). Par conséquent, ce résultat renforce le caractère particulier, mis en évidence par nos analyses de variabilité génétique (cf. chapitre III.1), de cette population africaine de biovar 1 par rapport aux autres populations de *R. solanacearum*. Enfin, cet outil ne confère pas une sensibilité suffisante pour la détection de faibles niveaux de populations du pathogène (Seal, communication personnelle).

L'utilisation du couple d'amorces OLI1-Y2 (Seal *et al.*, 1993) pour l'identification et la détection des souches réunionnaises de *R. solanacearum* est parfaitement envisageable même si un doute peut toujours subsister quant à l'identité exacte du produit d'amplification généré par ces amorces. En effet, des signaux d'amplification sont parfois visualisés pour des souches de *R. eutropha*, *R. pickettii* et *B. cepacia* réduisant par conséquent la spécificité de ce test PCR. Des observations identiques ont été signalées dans d'autres laboratoires (Seal, 1998b) mais

toutes les souches « problématiques », y compris les nôtres, testées à nouveau dans le laboratoire de Seal ne conduisent jamais à une amplification (Elphinstone, communication personnelle). Malgré tout, il apparaît nécessaire d'employer un autre outil d'identification pour compléter le résultat apporté par le couple d'amorces OLI1-Y2. Par ailleurs, cet outil permet une détection très sensible de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  ufc/mL même en présence d'extraits de plantes (tomate, pomme de terre, aubergine) (Seal, 1998a). Nous avons confirmé ces résultats aux laboratoires. Enfin, ces amorces sont adaptées à une identification au niveau de l'espèce mais ne le sont pas au niveau infra-spécifique (biovar) ce qui est dû à une trop grande homologie de séquence au niveau de l'ADNr 16S. Or, il est extrêmement important de disposer d'un outil assurant la discrimination des trois biovars présents à la Réunion car ces trois biovars ont des caractéristiques écologiques et pathologiques différentes.

C'est dans cette optique que nous avons utilisé le couple d'amorces T3A-T5A (Seal *et al.*, 1992b) mais les résultats se caractérisent par un manque de reproductibilité et par l'obtention fréquente d'amplifiats non-spécifiques; ceci est vraisemblablement dû au fait que la température d'hybridation des amorces est relativement basse (48 °C). En outre, Seal *et al.* (1992b) ont rapporté que les souches de *P. syringae* pv. *tabaci* et de *R. pickettii* pouvaient générer des profils similaires à ceux donnés par les souches de *R. solanacearum*. Par conséquent, l'emploi de ces amorces pour l'identification et la détection spécifique des biovars de *R. solanacearum* à la Réunion n'est pas une solution envisageable.

Enfin, il faut mentionner que d'autres articles décrivant le développement de tests PCR utilisables à des fins d'identification et de détection des souches de *R. solanacearum* au niveau infraspécifique ont été publiés récemment. Ces couples d'amorces assurent l'identification des divisions, *sensu* Cook *et al.* (1989), de *R. solanacearum* (Fegan *et al.*, 1998a; Boudazin *et al.*, 1999; Seal *et al.*, 1999) ou uniquement du biovar 2 (Fegan *et al.*, 1998c). Toutefois, nous n'avons pas testé ces outils dans le cadre de notre étude car ils ne répondent pas exactement à la problématique d'identification spécifique des biovars à la Réunion.

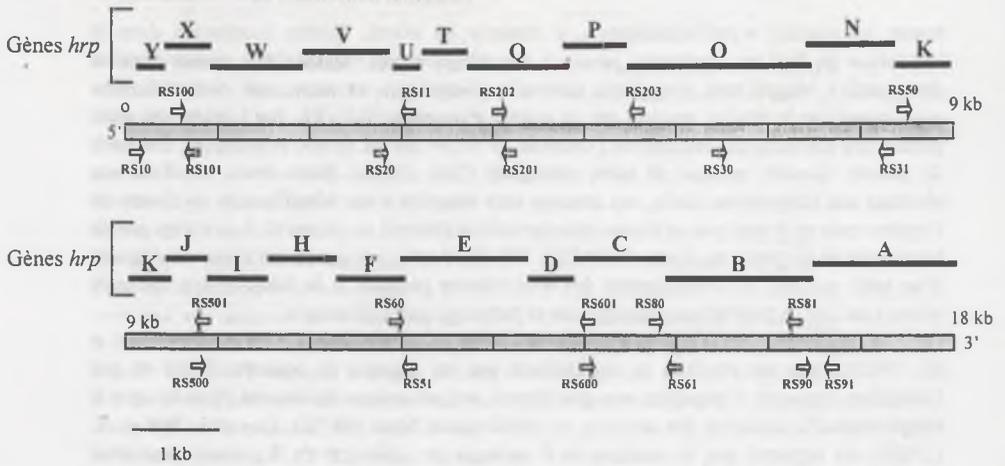


Figure IV-3. Localisation des couples d'amorces sélectionnés sur la base de la séquence des gènes *hrp* de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.

## IV.2. Recherche d'amorces PCR spécifiques de *R. solanacearum* au sein des gènes *hrp*

### Introduction

L'intégration dans notre étude des outils développés par Seal et ses collaborateurs n'ayant pas donné satisfaction, nous avons été amenés à créer nos propres outils de diagnostic moléculaire. Pour cela, nous avons décidé de nous orienter vers une région du génome jusqu'ici non explorée pour ce type de problématique : les gènes *hrp*. Ce choix se justifie dans le sens où, d'une part les gènes *hrp* ont été séquencés chez une souche de *R. solanacearum* et, d'autre part ces gènes, étant impliqués dans le pouvoir pathogène de la bactérie, sont plus variables que ceux d'autres régions du génome comme les ADN<sub>r</sub> et sont donc non seulement susceptibles de fournir des séquences spécifiques au niveau de l'espèce mais aussi au niveau infra-spécifique.

Une partie des sections « matériels et méthodes » et « résultats et discussion » présentée ci-dessous est déjà décrite dans l'article paru dans AEM (cf. chapitre III.1.1.), mais ces sections sont reprises et détaillées car toutes les informations ne figurent pas dans l'article et cela doit faciliter la lecture de ce chapitre.

### IV.2.1. Matériels et méthodes

#### IV.2.1.1. Sélection des amorces

Les amorces sont déterminées en se basant sur la séquence des gènes *hrp* de la souche de *R. solanacearum* guyanaise GMI1000, biovar 3 (numéro d'accension : Z14056, banque de données EMBL/GenBank/DDJB). Onze couples d'amorces sont sélectionnés à l'aide du logiciel Oligo 5.0® (National Biosciences, 1996), de manière à explorer l'ensemble de la zone des gènes *hrp* (figure IV-3). Seuls sont retenus les couples d'amorces d'environ 20 pb encadrant des séquences d'ADN de taille comprise entre 200 et 2500 pb. Les séquences des amorces figurent dans le tableau IV-4. De plus, afin d'optimiser le rendement des réactions d'amplification, seuls sont choisis les couples d'amorces présentant le minimum de possibilité d'autoappariements et de formation de dimères (complémentarité entre les amorces), particulièrement au niveau de l'extrémité 3' des amorces qui sert à l'étape d'extension.

#### IV.2.1.2. Conditions d'amplification

Cinquante microlitres de mélange réactionnel sont soumis à l'amplification après addition de l'ADN cible. Selon la taille de l'amplifiat, deux types d'enzyme sont utilisés. Pour les fragments dont la taille n'excède pas 1000 pb, la *Taq* ADN polymérase (5 U/μL; Gibco BRL) est employée et requiert l'utilisation du tampon 10 X (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl; pH 8,4). En revanche, les fragments de plus de 1000 pb sont amplifiés à l'aide d'un mélange enzymatique composé de la *Taq* ADN polymérase et d'une *Pwo* ADN polymérase (3,5 U/μL; Expand Long Template PCR System; Roche) nécessitant l'emploi du tampon 3 (10 X : 22,5 mM MgCl<sub>2</sub> et détergents). Ce mélange enzymatique autorise l'amplification de grandes séquences nucléiques chez *R. solanacearum* (> 1000 pb), ce que ne permet pas la seule *Taq* ADN polymérase.

Tableau IV-4. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.

Couple d'amorces	Site 5' *	Taille de l'amplifiat (en pb)	Séquence
RS10 RS101	45 624	580	5' GCCTGGTGTCTGCGAGTCTGG 3' 5' GCCGCTGCCCGAAACCTTG 3'
RS100 RS11	605 3060	2456	5' CAAGGTTTCGGGGCAGCGGC 3' 5' GCTGCTGTGCCTGCTGGTTT 3'
RS20 RS201	2672 4123	1452	5' GCTCGTGGTCTCTGCTCGTGT 3' 5' CTCACCGCCACTGCCCATTA 3'
RS202 RS203	4096 5676	1581	5' CGTCCTTGTAAATGGGCAGTG 3' 5' CGGCGGGCAACTTCCTGACG 3'
RS30 RS31	6590 8582	1993	5' GAACAGGAACGACGGAAAGC 3' 5' CGAACAGCCACAGACAAGA 3'
RS50 RS501	8574 9773	1200	5' GGCTGTTTCGGTCTTTTCGTC 3' 5' GGGGCGTCATCATTGGTTCT 3'
RS500 RS51	9754 12084	2331	5' AGAACCAATGATGACGCCCC 3' 5' ATTGTCGTCCTCCTCGTCT 3'
RS60 RS601	11993 14034	2042	5' GGACGAGGAAGACGACGATA 3' 5' TGGCGGGCAGGATGGAGAAA 3'
RS600 RS61	14015 14919	905	5' TTTCTCCATCCTGCCCGCCA 3' 5' CCAGGGCGAAGTAGATGTTT 3'
RS80 RS81	14691 16227	1537	5' TTGAAAGAGCAGGTGAAGCA 3' 5' CGATGATGTTGGACGGATTG 3'
RS90 RS91	16296 16508	213	5' GAAGCCCCCTCCGAAACCAT 3' 5' CCGTGCCTGCCGTCCATAGC 3'

\* : position des amorces donnée à partir de la séquence des gènes *hrp* de la souche GM11000.

Les autres composants du mélange réactionnel sont les suivants : désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à 10 mM, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), amorces (50 μM), ADN (20 ng/μL), l'eau pure de qualité HPLC.

Pour chaque séquence *hrp* sélectionnée, il faut tout d'abord chercher à établir les conditions optimales d'amplification. Dans cette optique, la méthode de Taguchi, adaptée à la technique PCR par Cobb et Clarkson en 1994, est mise en oeuvre (annexe 7). En outre, la température d'hybridation des amorces à l'ADN est déterminée afin d'optimiser l'amplification des séquences cibles et d'éliminer d'éventuels appariements non-spécifiques des amorces. Quant aux températures de dénaturation et d'élongation ainsi qu'au nombre de cycles d'amplification, ils sont établis en se basant sur la bibliographie (Saiki, 1989; Atlas & Bej, 1994; entre autres) et les instructions des fournisseurs (Roche et Gibco-BRL). La mise au point des conditions optimales d'amplification est systématiquement effectuée avec des souches représentatives des trois populations (biovars 1, 2 et 3) réunionnaises de *R. solanacearum* puis ces conditions sont vérifiées par extension sur l'ensemble des souches de notre collection.

L'électrophorèse et la révélation sont effectuées comme décrit dans le chapitre IV.1.1.4.

## IV.2.2. Résultats et discussion

Les résultats et la discussion sont regroupés en une seule section dans ce chapitre car une partie des informations est déjà présentée dans l'article paru dans AEM (cf. chapitre III.1.1.).

En utilisant la technique PCR, nous avons cherché à définir de façon reproductible les conditions d'amplification de séquences que nous souhaitons spécifiques de l'espèce *R. solanacearum*. Les onze couples d'amorces utilisés lors de cette étude ont été choisis de façon à couvrir l'ensemble de la zone des gènes *hrp* de *R. solanacearum*. A l'issue de cette exploration, six couples d'amorces aboutissent à des résultats intéressants. Les conditions d'amplification qui ont pu être déterminées pour ces six couples d'amorces ainsi que les programmes PCR associés sont présentés dans les tableaux IV-5 et IV-6.

### IV.2.2.1. Mise au point des conditions optimales de l'amplification

En vue de définir les conditions optimales d'amplification pour chacun des couples d'amorces choisis, nous avons appliqué la méthode modifiée de Taguchi (Cobb & Clarkson, 1994). Cette procédure, bien que ne permettant pas systématiquement d'amplifier de manière optimale la séquence étudiée, nous fournit néanmoins des indications intéressantes sur les conditions expérimentales à suivre, et ce, pour un minimum de temps et de coût. Ainsi, pour les couples d'amorces RS20-RS201, RS30-RS31, RS50-RS501, RS600-RS61, RS80-RS81 et RS90-RS91, une telle application nous a permis de dégager les conditions optimales d'amplification qui se sont révélées à la fois spécifiques et reproductibles. En revanche, en dépit des nombreuses tentatives effectuées, de telles conditions n'ont pu être définies pour les cinq autres couples d'amorces : RS10-RS101, RS100-RS11, RS202-RS203, RS500-RS51, RS60-RS601. Ces cinq couples d'amorces ont par conséquent dû être écartés de la suite de l'étude.

Tableau IV-5. Conditions optimales obtenues pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.

Constituants du mélange réactionnel (en $\mu$ l)	Couples d'amorces			
	RS600-RS61	RS90-RS91	RS30-RS31 RS80-RS81	RS20-RS201 RS50-RS501
Eau HPLC (Sigma)	32,75	36,75	36,25	36,65
Tampon (10 X) (Gibco BRL)	5	5	-	-
Tampon 3 (10X) (Roche)	-	-	5	5
MgCl <sub>2</sub> (1 mM/ $\mu$ l) (Gibco BRL)	1	1	-	-
dNTP (0,2 mM/ $\mu$ l) (Roche)	1	1	1,25	1,25
Amorces (1 $\mu$ M/ $\mu$ l)	0,5	0,5	0,5	0,3
Taq polymérase (5U/ $\mu$ l) (Gibco BRL)	0,25	0,25	-	-
Taq + Pwo polymerase (3.5U/ $\mu$ l) (Roche)	-	-	0,25	0,25
ADN (20 ng/ $\mu$ l)	6	2	2,5	2,5
Volume total	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Tableau IV-6. Programmes optimisés pour l'amplification par PCR de séquences situées dans la région des gènes *hrp* de *R. solanacearum*.

Etapes d'amplification	Couples d'amorces		
	RS20-RS201 RS30-RS31 RS50-RS501	RS600-RS61 RS90-RS91	RS80-RS81
Dénaturation initiale	95 °C, 5 min	96 °C, 2 min	95 °C, 5 min
- Dénaturation	95 °C, 30 s (*) 95 °C, 30 s (†)	94 °C, 30 s (‡)	95 °C, 30 s (*) 95 °C, 30 s (†)
- Hybridation	64 °C, 30 s (*) 64 °C, 30 s (†)	64 °C, 1 min (‡)	57 °C, 30 s (*) 57 °C, 30 s (†)
- Elongation	68 °C, 90 s (*) 68 °C, 90 s + 20 s à chaque cycle (†)	72 °C, 1 min (‡)	68 °C, 90 s (*) 68 °C, 90 s + 20 s à chaque cycle (†)
Elongation terminale	68 °C, 7 min	72 °C, 10 min	68 °C, 7 min
Conservation	7 °C, n min	4 °C, n min	7 °C, n min

(\*) dénaturation, hybridation et élévation : 10 cycles puis (†) 20 cycles

(‡) dénaturation, hybridation et élévation : 30 cycles

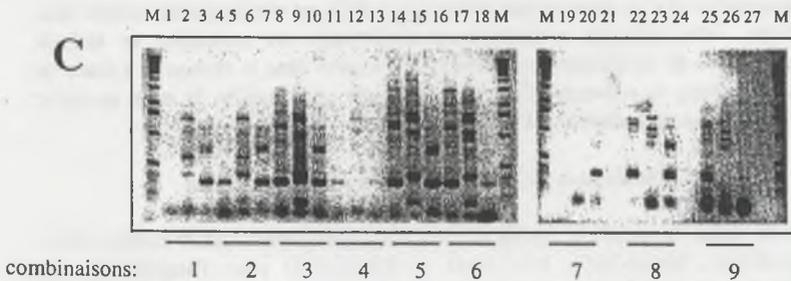
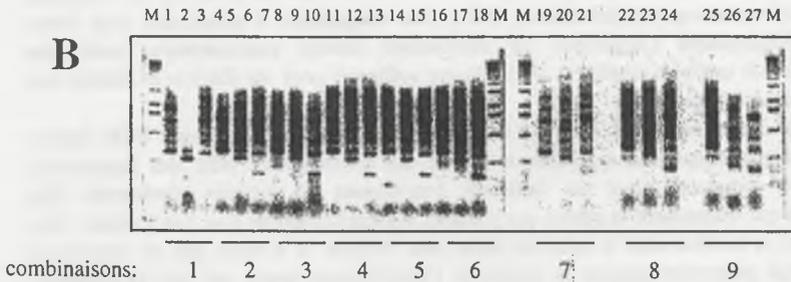
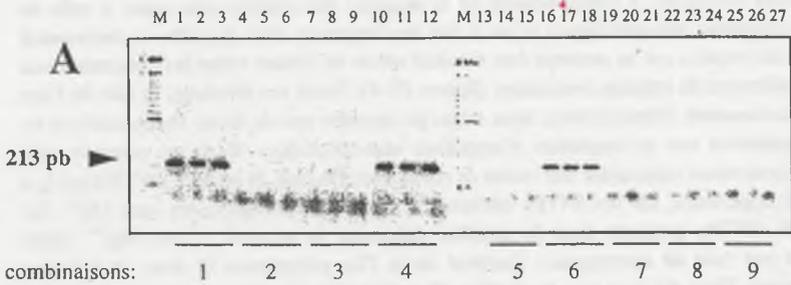
Dans de nombreux cas, la méthode de Cobb et Clarkson (1994) permet de déterminer les conditions conduisant à l'amplification de la séquence *hrp* étudiée mais aussi à celle de nombreux fragments non-spécifiques (c'est à dire des fragments dont la taille ne correspond pas à celle escomptée) qui ne peuvent être éliminés même en faisant varier les concentrations des divers éléments du mélange réactionnel (figures IV-4). Parmi ces éléments, le rôle de l'ion  $Mg^{2+}$  est fondamental. Généralement, nous avons pu constater que de fortes concentrations en  $Mg^{2+}$  engendraient une accumulation d'amplifiats non-spécifiques et qu'au contraire des faibles concentrations induisaient une baisse de rendement. De plus, la balance dNTP/ $MgCl_2$  a une grande importance, car les dNTPs chélatent de manière quantitative les ions  $Mg^{2+}$ . La quantité de dNTPs présents dans la réaction détermine la quantité d'ions  $Mg^{2+}$  libres influençant par voie de conséquence l'activité de la *Taq* polymérase et donc la réaction d'amplification. Dans d'autres cas, la réaction d'amplification s'avère non reproductible, en particulier lorsque de basses températures d'hybridation des amorces à l'ADN sont testées. Par ailleurs, la température d'hybridation des amorces à l'ADN se révèle être un paramètre déterminant d'une amplification spécifique car elle conditionne la présence ou l'absence d'amplifications non-spécifiques (Roux, 1995). Une température d'hybridation trop basse entraîne fréquemment l'apparition de nombreuses bandes surnuméraires, mais une augmentation de quelques degrés est alors souvent suffisante pour les éliminer et obtenir une amplification spécifique.

Tout ceci montre qu'il n'est pas toujours aisé de développer des tests PCR fiables. Cette technique malgré son apparente simplicité fait intervenir en effet des interactions relativement complexes entre les différents constituants du mélange réactionnel. Ces interactions qui déterminent la qualité des produits d'amplification ne sont pas toujours bien contrôlables et rendent ainsi la mise au point plus difficile. Il n'existe pas de conditions standards qui pourraient garantir le succès de l'amplification quelle que soit la situation. Chaque étude doit être considérée comme un cas particulier et pour parvenir à définir un bon protocole d'amplification, il est indispensable d'analyser au préalable l'influence d'un certain nombre de paramètres. Il n'en demeure pas moins que la PCR est très largement utilisée dans les laboratoires. Cette technique a littéralement révolutionné les recherches en biologie moléculaire et trouve de nombreuses applications notamment dans le clonage et l'étude de l'expression des gènes, la recherche d'un polymorphisme génétique, et la mise au point d'outils d'identification et de détection d'agents pathogènes.

#### IV.2.2.2. Vérification de la spécificité des amorces utilisées

Afin de vérifier la spécificité des six couples d'amorces retenus (RS20-RS201, RS30-RS31, RS50-RS501, RS600-RS61, RS80-RS81 et RS90-RS91) pour l'amplification de fragments des gènes *hrp* de *R. solanacearum*, les amorces ont non seulement été testées sur l'ADN des souches de *R. solanacearum* de notre collection (environ 180 souches au total) mais aussi sur l'ADN de souches bactériennes n'appartenant pas à l'espèce *R. solanacearum*.

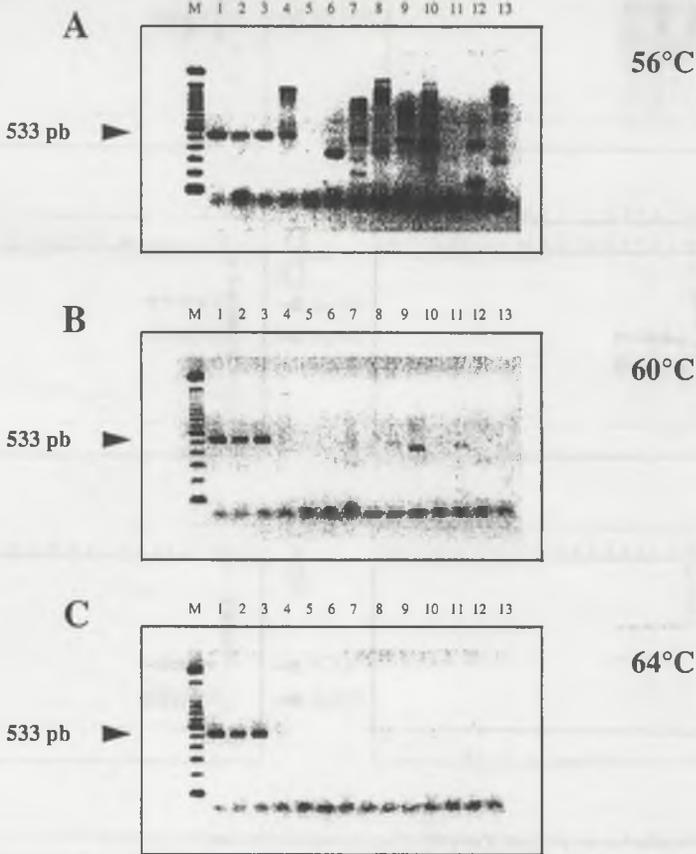
Pour chaque couple d'amorces, il s'avère que toutes les souches de *R. solanacearum*, à l'exception de quatre souches (cf. chapitre IV.2.2.3.), fournissent un fragment unique de la taille escomptée. Cependant, l'intensité des bandes générées est parfois variable selon les souches suggérant une variabilité nucléotidique localisée au niveau des sites d'appariement des amorces. De mauvais appariements induisent en effet une baisse de rendement d'amplification et par conséquent une diminution de l'intensité du signal d'amplification observé. L'exemple le



**Figure IV-4. Electroforèse des produits d'amplification obtenus, après application de la méthode de Cobb et Clarkson (1994), avec les amorces RS90-RS91 (A), RS100-RS11 (B) et RS500-RS51 (C).**

Les combinaisons 1, 4 et 6 permettent l'amplification de la séquence encadrée par les amorces RS90-RS91 (A) alors qu'aucune combinaison ne permet l'amplification des séquences encadrées par les amorces RS100-RS11 (B) et RS500-RS51 (C). Piste M : marqueur de taille 100 pb (A) et 1 kb (B et C). Trois souches de *R. solanacearum* sont testées pour chaque combinaison : respectivement JT525 de biovar 1 (pistes 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 et 25), JT509 de biovar 2 (pistes 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23 et 26) et JT517 de biovar 3 (pistes 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 et 27).

Température d'hybridation  
des amorces à l'ADN



**Figure IV-5. Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec le couple d'amorces : RS30b-RS31b. Influence de la température d'hybridation des amorces à l'ADN sur la spécificité de l'amplification par PCR : 56°C (A), 60°C (B) et 64°C (C).**

Piste M : marqueur de taille, 100 pb. Pistes 1 à 13 : *R. solanacearum* biovar 1, JT525; *R. solanacearum* biovar 2, JT509; *R. solanacearum* biovar 3, JT517; *E. chrysanthemi*, JT544; *X. sp. pv. mangiferae-indicae*, JT545; *X. vesicatoria*, JT546; *P. fluorescens*, JT547; *P. fuscovaginae*, JT548; *P. cichorii*, JT549; *P. syringae* pv. *tomato*, JT550; *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, JT551; *R. pickettii*, JR660; *B. cepacia*, JR661.

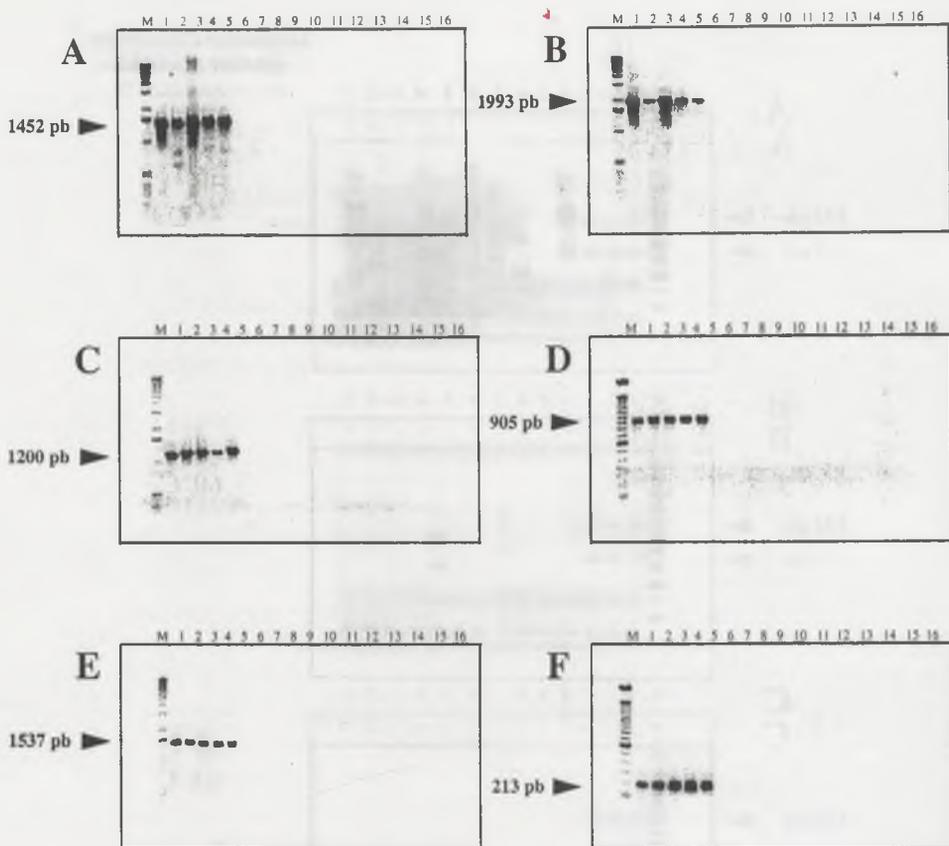


Figure IV-6. Electrophorèse des produits d'amplification obtenus avec les couples d'amorces définis au sein des gènes *hrp* : A, RS20-RS201; B, RS30-RS31; C, RS50-RS501; D, RS600-RS61; E, RS80-RS81; F, RS90-RS91. Piste M : marqueur de taille, 1 kb (A, B, C et E), 100 pb (D et F). Pistes 1 à 16 : *R. solanacearum* biovar 1, JT525; *R. solanacearum* biovar 2, JT509; *R. solanacearum* biovar 3, JT517; *P. syzygii*, JV 1010; BDB, JT656; *R. pickettii*, JR660; *B. cepacia*, JR661; *R. eutropha*, JS755; *E. chrysanthemi*, JT544; *X. campestris* pv. *mangiferae-indicae*, JT545; *Xanthomonas vesicatoria*, JT546; *P. fluorescens*, JT547; *P. fuscovaginae*, JT548; *P. cichorii*, JT549; *P. syringae* pv. *tomato*, JT550; *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, JT551.

plus notable est celui de deux groupes de souches (clusters I et II; cf. article paru dans AEM, chapitre III.1.1.) pour lesquels la température d'hybridation des amorces à l'ADN doit être fortement diminuée (passage de 64 °C à 50 °C) afin de pouvoir visualiser l'amplification produite à l'aide des amorces RS20-RS201.

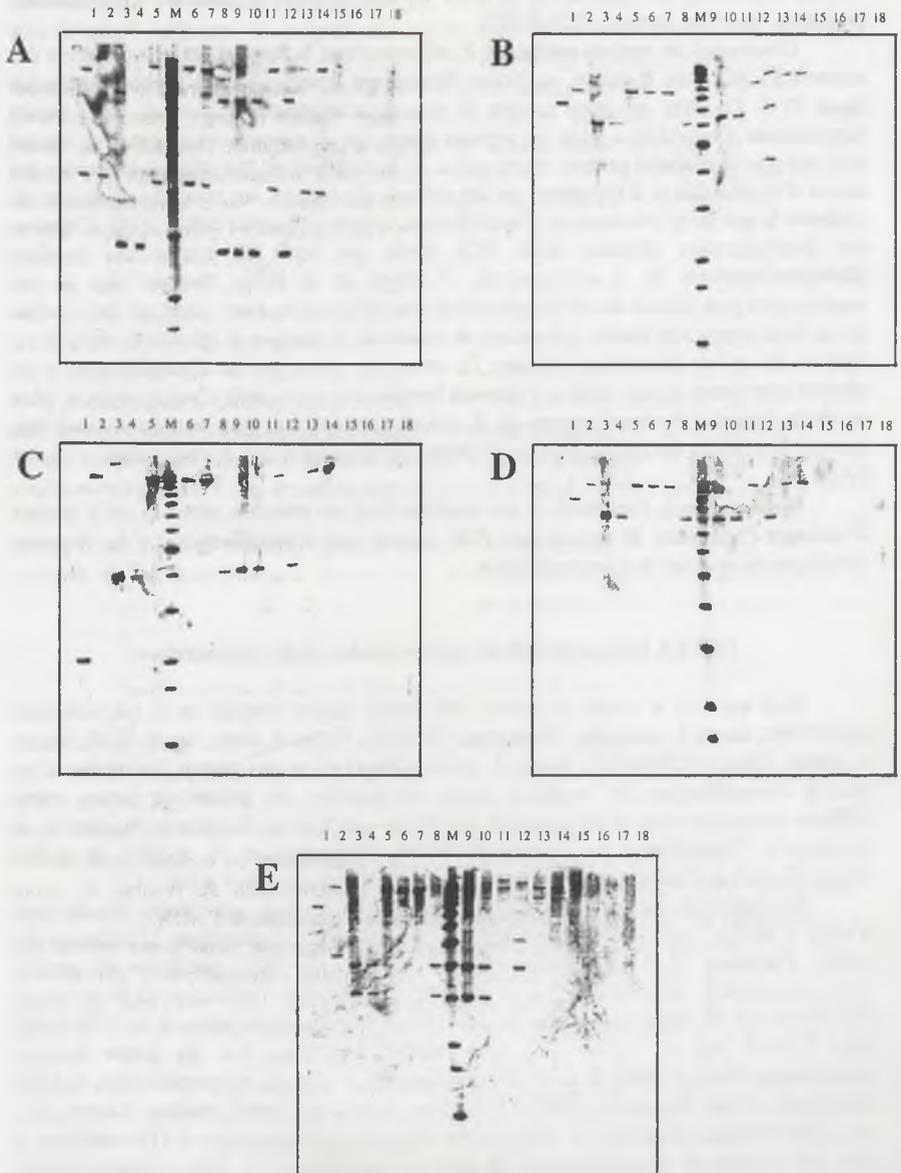
Concernant les espèces autres que *R. solanacearum*, la température d'hybridation des amorces à l'ADN est, là encore, un facteur déterminant comme l'illustre l'exemple présenté figure IV-5. En effet, un grand nombre de signaux d'amplification obtenus, à de basses températures d'hybridation, pour les espèces autres que *R. solanacearum* peut être éliminé avec une grande efficacité par une augmentation de la température. Par ailleurs, les durées des étapes d'hybridation et d'élongation ont été réduites par rapport aux premiers essais afin de renforcer la spécificité des réactions d'amplification, comme l'a suggéré Saiki (1989). L'examen des électrophorèses obtenues après PCR révèle que seuls les taxons très proches phylogénétiquement de *R. solanacearum*, *P. syzygii* et le BDB, donnent lieu à une amplification pour chacun des six couples d'amorces. Néanmoins, étant donné que les souches de ces deux taxons sont isolées uniquement en Indonésie, le manque de spécificité observé n'a dans ce cas qu'une importance mineure. En revanche, aucun produit d'amplification n'est observé pour aucun des six couples d'amorces lorsque nous avons testé d'autres espèces, plus ou moins éloignées taxonomiquement de *R. solanacearum* et qui, pour leur grande majorité, peuvent être isolées des mêmes hôtes ou du même environnement que *R. solanacearum* (figure IV-6).

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats revêt un caractère essentiel car il permet d'envisager l'utilisation de ces amorces PCR comme outil d'identification ou de détection spécifique des souches de *R. solanacearum*.

#### IV.2.2.3. Cas particulier de quatre souches de *R. solanacearum*

Quel que soit le couple d'amorces *hrp* utilisé, quatre souches de *R. solanacearum* (CFBP2964, biovar 3, aubergine, Martinique; CFBP765, biovar 4, tabac, Japon; R288, biovar 5, mûrier, Chine; NCPPB4011, biovar 5, mûrier, Chine) n'ont pas permis l'obtention d'un produit d'amplification. De nombreux essais ont pourtant été réalisés en faisant varier différents paramètres dont la concentration des divers constituants du mélange réactionnel, la température d'hybridation des amorces à l'ADN, l'augmentation du nombre de cycles d'amplification ou l'utilisation de différentes méthodes d'extraction de l'ADN.

En supposant qu'une erreur d'étiquetage ait pu intervenir, nous avons cherché tout d'abord à vérifier l'identité de ces souches par une approche polyphasique. L'utilisation du couple d'amorces OLI1-Y2 (localisé au niveau de l'ADNr 16S) spécifique du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993) confortée par l'utilisation de la technique AFLP ainsi que du séquençage partiel du gène codant pour l'endoglucanase et de l'ITS (situé entre l'ADNr 16S et l'ADNr 23S) nous autorise à conclure que ces quatre souches appartiennent bien à l'espèce *R. solanacearum*. En effet, d'une part, une amplification de taille escomptée à l'aide des amorces OLI1-Y2 est obtenue pour ces quatre souches, d'autre part, ces quatre souches ont des profils AFLP et des séquences (endoglucanase et ITS) similaires à ceux des souches de *R. solanacearum* de même biovar (Trigalet et Prior, communications personnelles).



**Figure IV-7. Southern blots d'ADN digéré par *EcoRI* obtenus avec les sondes correspondant aux produits d'amplification purifiés suivant : A, RS20-RS201; B, RS30-RS31; C, RS50-RS501; D, RS600-RS61; E, RS80-RS81.**

Piste M : marqueur de taille, 1 kb. Pistes 1 à 18 : *R. solanacearum* JS716, JS730, JT525, JS946, JT509, JS900, JT654, JT517, JS753, JS834, JS934, JT661, BDB JT657, *P. syzygii* JV1010, *R. solanacearum* CFBP2964, CFBP765, R288, NCPPB4011.

L'identité de ces quatre souches étant confirmée, nous avons supposé que ces souches de *R. solanacearum* pouvaient être affectées au niveau de l'opéron *hrp* et donc dans leur pouvoir pathogène. Afin de vérifier cette hypothèse, un test de réaction hypersensibilité sur tabac a tout d'abord été effectué. Celui-ci s'est avéré négatif pour les quatre souches. Puis nous avons fabriqué, en vue d'une utilisation par RFLP, des sondes correspondant aux amplifiats générés par les couples d'amorces *hrp* : RS20-RS201, RS30-RS31, RS50-RS501, RS600-RS61, RS80-RS81 (protocole en annexe 8). Ces quatre souches sont les seules parmi l'ensemble des souches de *R. solanacearum* testées pour lesquelles aucune hybridation n'est observée (figure IV-7). Enfin, nous avons utilisé le couple d'amorces PS96H-PS96I spécifique de l'espèce *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1992). Ces amorces, dont la localisation exacte est inconnue mais est soupçonnée liée aux gènes *hrp*, ne conduisent pas à l'obtention d'un signal d'amplification. Le pouvoir pathogène de ces souches sur leur hôte d'origine n'a pas été vérifié. Les souches R288 et NCPPB4011 appartiennent à la race 5 spécifique du mûrier, or nous ne disposons pas de plants de mûrier. Quant à la souche CFBP2964, elle a déjà été rapportée comme une souche particulière car elle est uniquement pathogène de l'aubergine (Prior & Steva, 1990).

L'ensemble de ces résultats suggère que les gènes *hrp* de ces quatre souches de *R. solanacearum* comprennent de larges délétions (environ 8 kpb des gènes *hrp* ont été couverts à l'aide des cinq sondes et aucune homologie n'a été mise en évidence). Pour savoir si ces quatre souches possèdent au moins une fraction des gènes *hrp*, il serait intéressant d'utiliser comme sonde le plasmide pVir2 (Boucher *et al.*, 1987) porteur du cluster des gènes *hrp* de la souche GMI1000 de *R. solanacearum*.

### IV.3. Mise au point d'un outil d'identification et de détection spécifique des biovars de *R. solanacearum* et application au niveau des plantes

#### Introduction

La prospection de la région des gènes *hrp* a conduit à des résultats très probants puisque six couples d'amorces permettent l'amplification de séquences spécifiques chez *R. solanacearum*. La digestion des produits d'amplification par des enzymes de restriction (technique PCR-RFLP) a, par la suite, été réalisée afin d'analyser la variabilité existant chez *R. solanacearum* au niveau des gènes *hrp*, ce qui a fait l'objet d'un article publié dans AEM (cf. chapitre III.1.1.). Nous avons alors décidé d'exploiter cette variabilité pour obtenir un outil capable de différencier les trois biovars présents à la Réunion. L'efficacité de cet outil dans la détection des biovars de *R. solanacearum*, après sa mise au point, a été évaluée par une application au niveau des plantes.

#### IV.3.1. Détection moléculaire des biovars de *R. solanacearum*

La méthodologie et les résultats sont présentés dans l'article intitulé « Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP » paru en 2000 dans la revue « European Journal of Plant Pathology ». Les principales conclusions figurent dans le résumé (traduit en français) ci-dessous.

« Un test, basé sur un protocole de Nested-PCR-RFLP, a été développé pour la détection spécifique et sensible des biovars de *R. solanacearum*, l'agent responsable du flétrissement bactérien. Les couples d'amorces ont été sélectionnés au sein de la région des gènes *hrp*. L'amplification spécifique de fragments *hrp* a été obtenue pour l'ensemble des souches de *R. solanacearum* mais aussi pour deux espèces proches, *P. syzygii* et le blood disease bacterium. Aucune amplification n'a été observée à partir d'autres espèces bactériennes très diverses, incluant *R. pickettii* et *B. cepacia*. La digestion enzymatique à l'aide d'*Hind*II a fourni quatre profils de restriction distincts et spécifiques de biovars ou de groupes de biovars de *R. solanacearum* : un profil spécifique des souches de biovar 1 provenant de la partie Sud de l'Afrique, un des souches américaines de biovar 1 et de biovars 2 et N2, un des souches de biovars 3 et 4, et un des souches de biovar 5. Appliquée aux cultures pures ou aux tissus de plantes infectés, la Nested-PCR (N-PCR) autorise une détection de l'ordre de  $10^3$  ufc/mL, correspondant à 1 ufc par réaction PCR. L'amplification a été partiellement ou totalement inhibée par des composés issus d'extraits de plantes (plant et tubercule de pomme de terre, tomate, tabac, aubergine, poivron et géranium rosat). Un traitement avec du PVPP et de la BSA avant l'amplification a permis une détection par N-PCR fiable des souches de *R. solanacearum* dans les échantillons de plantes. La N-PCR-RFLP, évaluée avec des isolats de l'île de la Réunion mais aussi applicable à toutes les souches de *R. solanacearum*, est utilisable à des fins d'identification, de détection et d'épidémiologie. »

L'article est présenté dans les pages suivantes.

## Specific detection of biovars of *Ralstonia solanacearum* in plant tissues by Nested-PCR-RFLP

Stéphane Poussier and Jacques Luisetti

Laboratoire de phytopathologie, CIRAD-FLHOR, 97410 Saint-Pierre, Réunion,  
France (Fax: +262258343)

Accepted 7 December 1999

**Key words:** bacterial wilt, biovars discrimination, diagnosis, *hrp*

### Abstract

A sensitive and specific assay, based on a Nested-PCR-RFLP protocol, was developed for the detection of biovars of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt. Oligonucleotide primer pairs were selected within the *hrp* gene region. Specific amplification of the *hrp* fragments was obtained for all *R. solanacearum* strains and also for two closely related species, *Pseudomonas syzygii* and the blood disease bacterium. No amplification was observed for a wide range of other bacterial species, including *R. pickettii* and *Burkholderia cepacia*. Digestion with *Hind*II provided four distinct restriction profiles specific to biovars or groups of biovars of *R. solanacearum*: one for biovar 1 strains originating from the Southern part of Africa, one for American biovar 1 and biovars 2 and N2 strains, one for biovars 3 and 4 strains, and one for biovar 5 strains. When applied to either pure culture or infected plant tissues, Nested-PCR allowed detection as low as  $10^3$  cfu ml<sup>-1</sup>, which corresponds to 1 cfu per reaction. Amplification was partially or completely inhibited by compounds contained in plant extracts (potato plant and potato tuber, tomato, tobacco, eggplant, pepper and *Pelargonium asperum*). A combined PVPP/BSA treatment prior to amplification permitted reliable Nested-PCR detection of *R. solanacearum* strains in plant samples. Nested-PCR-RFLP, assessed with isolates from Reunion Island but also applicable to any *R. solanacearum* strain, provides a wide range of possible uses for identification, detection and epidemiological investigations.

### Introduction

*Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt, is responsible for severe losses to many important crops in tropical, subtropical and warm temperate regions of the world (Hayward, 1991). Recently, several outbreaks of the disease were reported in Western Europe (Stead et al., 1996). *R. solanacearum* appeared to be rather heterogeneous and has been subdivided into five races based on host range (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983; Pegg and Moffett, 1971) and into six biovars based on differences in the utilization of three disaccharides and three sugar alcohols (Hayward, 1964; Hayward et al., 1990; He et al., 1983). Furthermore, based on restriction fragment length

polymorphism (RFLP) (Cook et al., 1989, 1991; Cook and Sequeira, 1994) and 16S rRNA gene sequences (Li et al., 1993; Taghavi et al., 1996; Seal et al., 1999), *R. solanacearum* species was divided into two major clusters related to geographical (Asian and American) origin of strains.

The biovar determination procedure, as described by Hayward (1964), requires a previous purification of the bacterium and an incubation period of more than 2 weeks. New molecular tools such as the PCR technique, which do not need previous cultivation of bacterium, have been successfully applied to the direct detection of many plant-pathogenic bacteria (Hartung et al., 1996; Hu et al., 1995; Leite et al., 1995; Maes et al., 1996; Minsavage et al., 1994; Roberts et al.,

1996). To discriminate biovars of *R. solanacearum*, Seal et al. (1992a) have developed tRNA consensus primers, but since similar PCR patterns were obtained with strains belonging to other plant bacterial species these primers could not be used for effective detection of *R. solanacearum* biovars.

A PCR-RFLP method has previously been used to assess the genetic diversity within a worldwide collection of *R. solanacearum* (Poussier et al., 1999). The whole *hrp* gene region, which is involved in the hypersensitive reaction and pathogenicity (Arlat et al., 1992; Boucher et al., 1992), was explored and this led to an accurate distinction of the major biovars of *R. solanacearum* and a clear discrimination between African biovar 1 strains and American biovar 1 strains.

The objective of this study was to exploit these results to develop a specific and sensitive procedure (Nested-PCR-RFLP) to identify and detect specific biovars of *R. solanacearum* in plant tissues. Most of these experiments were performed with isolates from Reunion Island. Reunion Island, where the disease has been recorded on 23 species (mainly potato, tomato, tobacco, eggplant, pepper and *Pelargonium asperum*) of plants from 12 families (Girard et al., 1993; Nicole, 1995) and where two races (1 and 3) and three biovars (1, 2 and 3) of *R. solanacearum* have been identified, is an excellent geographical area to check the usefulness of molecular tools.

## Materials and methods

### Bacterial strains and culture conditions

*R. solanacearum* strains used in this study were previously described (Poussier et al., 1999). Additional strains belonging to biovars N2 and 5 are listed in Table 1. The strains were grown on a modified Granada and Sequeira medium (Granada and Sequeira, 1983) (tryptone, 1 g l<sup>-1</sup>; peptone, 10 g l<sup>-1</sup>; agar, 18 g l<sup>-1</sup>; glycerine, 6.3 ml l<sup>-1</sup>; crystal violet, 0.002 g l<sup>-1</sup>; polymyxine sulphate, 0.01 g l<sup>-1</sup>; tyrothricine, 0.02 g l<sup>-1</sup>; chloramphenicol, 0.005 g l<sup>-1</sup>; triphenyltetrazolium chloride, 0.025 g l<sup>-1</sup>; propiconazole, 0.4 ml l<sup>-1</sup>; penicillin, 20 U l<sup>-1</sup>; pH 7.2). Typically fluidal *R. solanacearum* colonies with characteristic tetrazolium red coloration (Kelman, 1954), were observed after 3 days incubation at 28 °C. To check the specificity of our molecular tools, other strains belonging to species more or less closely related to *R. solanacearum* (Table 1) were included and cultured

on YPGA medium (yeast extract, 7 g l<sup>-1</sup>; peptone, 7 g l<sup>-1</sup>; glucose, 7 g l<sup>-1</sup>; agar, 15 g l<sup>-1</sup>; pH 7.2). Long-term storage of strains was achieved at -80 °C on beads in cryovials (Microbank™ ProLab Diagnostics, Austin, Texas, USA).

### Primers

All primers were selected from the nucleotide sequence of the *hrp* genes cluster of the strain GMI1000 (accession number: Z14056; EMBL/GenBank/DDBJ databases) of *R. solanacearum*. Primers RS30 and RS31 (Table 2) used for the first-round PCR, delineated a 1993 bp fragment located over the *hrpO* and *hrpN* genes of the *hrp* gene region of *R. solanacearum*. For Nested-PCR (N-PCR), two additional sets of primers were selected within the fragment delineated by primers RS30 and RS31. These primer pairs (RS30a-RS31a and RS30b-RS31b) (Table 2) directed the amplification of a 256 bp and a 533 bp fragment respectively (Figure 1). Since we have designed two primer pairs, the test was based on multiplex PCR. All primers were designed by the OLIGO 5.0 software (National Biosciences, 1996) and synthesized by Genosys Biotechnologies, Cambridge, England.

### PCR amplification, nested amplification and electrophoresis

Template DNA was prepared from either purified total bacterial DNA (Ausubel et al., 1991), or from a boiled (for 5 min) suspension of pure culture or infected plant extract. First stage PCR was performed with a 50 µl reaction mixture containing 1 × reaction buffer 3 (supplied by the manufacturer with enzyme), 0.5 µM of primers (RS30 and RS31), 0.25 mM of each dNTP (Boehringer Mannheim, Meylan, France), 0.7 U of a mix (*Taq* and *Pwo*) of DNA polymerases (Expand™ Long Template PCR System; Boehringer Mannheim), water (HPLC grade; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and 1 µl of template DNA. The following thermal profile was used: initial denaturation (95 °C for 5 min) followed by 30 repeated cycles of denaturation (95 °C for 30 s), annealing (64 °C for 30 s), extension (68 °C for 2 min for the first 10 cycles and addition of 20 s for each new cycle for the last 20 cycles), and final extension (68 °C for 7 min). For the second stage (N-PCR), 1 µl from the first-round PCR product was added as template DNA to 49 µl of a reaction mixture which contained 1 × reaction buffer

Table 1. *R. solanacearum* strains and other bacterial strains used in this study and not previously described (Poussier et al., 1999)

Organism	Biovar	Strain	Other designation	Source <sup>1</sup>	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	N2	JT653	UW470	D	
	N2	JT654	UW477	D	
	N2	JT658	R361	E	
	N2	JT686	R572	E	
	N2	JT676	NCPBP3990	C	
	N2	JT677	NCPBP3987	C	
	5	JT661	R292	E	
	5	JT685	R322	E	
	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		JT544		A
	<i>Xanthomonas</i> sp. pv. <i>mangiferae-indicae</i>		JT545		A
<i>X. vesicatoria</i>		JT546		A	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		JT547		A	
<i>P. fuscovaginae</i>		JT548		A	
<i>P. cichorii</i>		JT549		A	
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>		JT550		A	
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>		JT551		A	
<i>Ralstonia pickettii</i>		JR660	CFBP2459	B	
		JR665.1		A	
		JR665.2		A	
<i>R. eutropha</i>		JS755	GMI8105	F	
<i>Burkholderia cepacia</i>		JR661	CFBP2227	B	
		JR664.1		A	
<i>P. syzygii</i>		JR664.2		A	
		JV1010	R024	E	
Blood disease bacterium		JV1011	R028	E	
		JT656	R604	E	
		JT657	R230	E	
		JT680	NCPBP3726	C	

<sup>1</sup>Strains were contributed by: A, Laboratoire de phytopathologie, CIRAD-FLHOR, Ligne Paradis, 97448 Saint-Pierre, Réunion, France; B, Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; C, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Harpenden, United Kingdom; D, D. Cook and L. Sequeira, Department of Plant Pathology, University of Wisconsin-Madison, USA; E, Institute of Arable Crops Research-Rothamsted, Harpenden, United Kingdom; F, M. Arlat and P. Barberis, CNRS-INRA, Auzeville, Castanet-Tolosan Cedex, France.

Table 2. Primers selected from the *hrp* gene sequence of the strain GMII000

Primer designation	Sequence (5'-3')
RS30	GAAGAGGAACGACGAAAGC
RS31	CGAACAGCCACAGACAAGA
RS30a	GCGCTGGCGGTGAACATGG
RS31a	CAACATCCTGGCCGGCATCGTG
RS30b	TCITGCGCTCGCCCTTGATGTG
RS31b	CGACAGCAGCCGGCACCC

(supplied by the manufacturer with enzyme), 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM of each dNTP, 0.35 µM of each primer (RS30a-RS31a and RS30b-RS31b) and 1 U of *Taq* DNA polymerase (GIBCO BRL, Life Technologies, Cergy Pontoise, France). The amplification

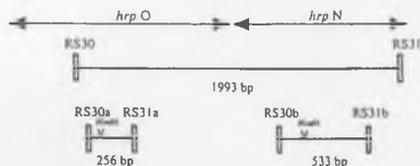


Figure 1. Nested-PCR-RFLP: position of the first- and second-round PCR primer pairs within the *hrp* gene region, size of resulting amplified fragments, and location of *Hind*III restriction sites (presence or absence are specified in the text).

procedure included an initial denaturation at 96 °C for 2 min followed by 20 cycles of 94 °C for 20 s, 70 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 10 min.

All the PCR reaction mixtures were overlaid with 2 drops of mineral oil (Sigma) to avoid evaporation and amplification of contaminating DNA, and were performed using a 9600 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9600, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, USA). In addition, water was used as a negative control in all experiments. Amplified DNA fragments were detected by electrophoresis in 1% agarose gels (NuSieve 3:1; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) in TAE buffer (40 mM Tris-base, 20 mM acetate, 2 mM EDTA). Gels were stained with ethidium bromide and photographed over a UV transilluminator (GDS 5000 UVP, San Gabriel, USA).

#### *Restriction endonuclease analysis of N-PCR products*

N-PCR products were digested with the restriction endonuclease *Hind*II (Figure 1) according to conditions specified by the manufacturer (Boehringer Mannheim). The restricted fragments were separated by electrophoresis in 2% agarose gels in TAE buffer and visualized with UV light after ethidium bromide staining.

#### *Sensitivity of detection*

The sensitivity threshold for the detection by PCR and N-PCR of *R. solanacearum* was determined for both pure culture and plant extracts. Bacterial suspensions from 1-day-old cultures of *R. solanacearum* were adjusted to  $10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> and 10-fold dilutions were prepared. Three 50 µl aliquots from serially diluted bacterial suspensions were plated on modified Granada and Sequeira medium to estimate the concentration of viable *R. solanacearum* (viable cell count method). For PCR reactions, 1 ml of each dilution was boiled for 5 min, cooled on ice and 1 µl aliquot was added as template DNA to the PCR reaction mixture. The detection limit was also determined in the presence of non-infected plant extract by adding known numbers of bacterial cells (10-fold dilutions as described above) to plant extract samples.

#### *Preparation of plant samples*

Samples from wilted or healthy plants (potato and potato tubers, tomato, tobacco, eggplant, pepper and

*Pelargonium asperum*) were collected. Three-cm-long pieces of stem and small fragments of potato tubers were picked, surface disinfected with ethanol, sliced with a sterile scalpel, and ground with a pestle into a sterile Petri dish containing 5 ml of buffer. Three 50 µl aliquots were plated on modified Granada and Sequeira medium to confirm the presence or absence of *R. solanacearum* in plant samples. Different buffers were assayed in order to avoid inhibition effects on PCR associated with plant tissue extracts: Tris buffer (10 mM Tris-base, pH 7.2); PP buffer (8.5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0 - 2% polyvinylpyrrolidone (PVP; Sigma); PPP buffer (PVP was replaced by polyvinylpolypyrrolidone (PVPP; Sigma); TENP and TENPP buffers (50 mM Tris, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% or 5% PVP (TENP) or PVPP (TENPP)). Moreover, different treatments were assayed to prevent any inhibition effect on PCR amplification, either by the addition of 5 µg or 500 ng (per PCR reaction) of bovine serum albumin (BSA) or by the dilution of plant extracts (1:5; 1:20; 1:100; 1:500) in sterile water.

Plant tissue extracts were cleared by filtration through 0.8 µm membranes (Sartorius, Göttingen, Germany) and boiled. When plant tissues were initially ground with Tris buffer, an equal volume of PP, PPP, TENP or TENPP buffer was added to the macerate before boiling.

## Results

### *Specificity of primers*

Amplification products of expected size (based on the nucleotide sequence of strain GMI1000) were observed for all tested *R. solanacearum* strains (a worldwide collection including biovars 1, 2, N2, 3, 4 and 5 strains, about 130 strains, data not shown). A fragment of 1993 bp was produced with RS30-RS31 primers for the first round PCR and two fragments (256 and 533 bp) were generated with the RS30a-RS31a, RS30b-RS31b primer sets for the second round PCR (N-PCR).

Strains belonging to 13 other bacterial species were also tested by PCR and N-PCR. No amplification occurred with DNA from these bacteria even from species closely related to *R. solanacearum*: *R. pickettii*, *R. eutropha* and *B. cepacia*. However, strains of two other closely related pathogens, *P. syzygii* and the blood disease bacterium, produced the specific PCR and N-PCR products (Figure 2).



Figure 2. Gel electrophoresis of PCR products (using RS30–RS31 primers, upper part of gel) and N-PCR products (using RS30a–RS31a and RS30b–RS31b primers, lower part of gel) from *R. solanacearum* originating from Reunion Island and other bacteria. Lane 1: negative control (no template DNA); lane 2, molecular size marker GIBCO BRL (1 kb ladder on upper half of gel, 100 bp ladder on lower half of gel); lanes 3–5, *R. solanacearum* biovars 1, 2 and 3, respectively; lane 6, *Pseudomonas syzygii*; lane 7, blood disease bacterium; lane 8, *Erwinia chrysanthemi*; lane 9, *Xanthomonas* sp. pv. *mangiferae-indicae*; lane 10, *X. vesicatoria*; lane 11, *P. fluorescens*; lane 12, *P. fuscovaginae*; lane 13, *P. cichorii*; lane 14, *P. syringae* pv. *tomato*; lane 15, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; lane 16, *R. pickettii*; lane 17, *Burkholderia cepacia*; lane 18, *R. eutropha*.

#### RFLP of N-PCR products

N-PCR products (256 and 533 bp) were digested with the restriction endonuclease *Hind*II. Four distinct PCR-RFLP patterns were obtained for all strains. Figure 3 contains a representative set of data. For biovar 1 strains from the Southern part of Africa (Angola, Madagascar, Reunion Island, Zimbabwe), three bands were observed (115, 256 and 418 bp; one *Hind*II restriction site within the 533 bp fragment). For biovar 1 strains originating from the Americas and two countries from Africa (Burkina Faso and Kenya), for biovar 2 and N2 strains of *R. solanacearum*, three bands were observed (34, 222 and 533 bp; one *Hind*II restriction site within the 256 bp fragment). However, in most experiments performed with these strains, the 533 bp fragment was not visible on agarose gels. For biovar 3 and 4 strains, two bands were observed (256 and 533 bp; no *Hind*II restriction site). Biovar 5 strains of *R. solanacearum*, the blood disease bacterium and *P. syzygii* strains gave another PCR-RFLP profile: only one



Figure 3. Gel electrophoresis of N-PCR products from cells of *R. solanacearum* and other bacteria using the two primer pairs (RS30a–RS31a and RS30b–RS31b). N-PCR products were not digested (upper part of gel) and digested (lower part of gel) with *Hind*II. Lane 1, negative control; lane 2, 100 bp ladder GIBCO BRL; lanes 3–5, *R. solanacearum* (from Reunion Island) biovar 1 (JT525), 2 (JT509) and 3 (JT517) strains respectively; lane 6, empty; lanes 7–10, *R. solanacearum* biovar 1 (from America), JS716–JS784–JS740–JS730; lane 11, *R. solanacearum* biovar 1 (from Southern part of Africa), JS946; lane 12, biovar 2, JS895; lane 13, biovar N2, JT653; lane 14, biovar 3, JS753; lane 15, biovar 4, JS841; lane 16, biovar 5, JT661; lane 17, empty; lane 18, blood disease bacterium; lane 19, *P. syzygii*.

amplified fragment (256 bp), with no *Hind*II restriction site.

#### Detection limits in pure cultures

When pure culture of *R. solanacearum* was used, the limit of detection for bacterial cells by amplification with one round of PCR (RS30–RS31 primers) was approximately  $10^6$  cfu ml<sup>-1</sup> (estimation by viable cell count). The sensitivity was greatly improved when N-PCR was applied since the detection level was 1000-fold greater than when the single round PCR was used. An average of  $10^3$  cfu ml<sup>-1</sup> (1 target DNA per reaction in 1  $\mu$ l of a bacterial suspension) was detected. Nevertheless, sometimes the  $10^2$  cfu ml<sup>-1</sup> detection threshold was obtained, but it was not always reproducible (Figure 4).

When suspensions of *R. pickettii* and/or *B. cepacia* were mixed together with *R. solanacearum* suspensions, the level of detection decreased by an order of magnitude but only when the concentration of the *R. pickettii* and/or *B. cepacia* suspensions was more than 1000-fold that of the *R. solanacearum* suspension (data not shown).

## N-PCR detection in plant extracts

When plant tissues were ground in Tris buffer without subsequent treatment, amplification was obtained only with a few plant samples suggesting the presence of

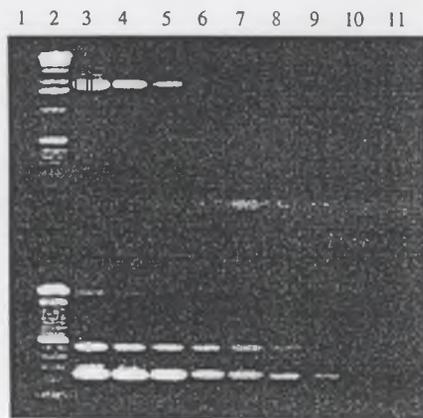


Figure 4. Gel electrophoresis of PCR (upper part of gel) and N-PCR (lower part of gel) products to assess the sensitivity of the assay for detection of *R. solanacearum* strain JTS19 (biovar 3, Reunion Island) as template. Lane 1, negative control; lane 2, 1 kb ladder (upper part of gel) and 100 bp ladder (lower part of gel) GIBCO BRL; lanes 3-11, concentration ( $\text{cfu ml}^{-1}$ ) estimated by viable cells count method:  $\sim 10^8$ ,  $\sim 10^7$ ,  $\sim 10^6$ ,  $\sim 10^5$ ,  $\sim 10^4$ ,  $\sim 10^3$ ,  $\sim 10^2$ ,  $\sim 10$ , and 0, respectively.

inhibitory substances in plant extracts. Dilution of plant extracts increased the efficiency of the PCR, however, this depended upon which plant was studied (Table 3). For tomato extracts, no or a low dilution (1:5) was required to observe significant amplification (band of high intensity) whereas further dilutions were needed when extracts from potato (1:5 to 1:20), eggplant (1:5 to 1:20), pepper (1:5 to 1:20), tobacco (1:50), or *Pelargonium asperum* (1:500 or more) were tested. Furthermore, the PCR efficiency depended upon the age of the plant. The detection in old plants required an additional 10- or 100-fold dilution of plant extract (data not shown). Although dilution of plant extracts significantly improved the PCR efficiency, it drastically reduced the sensitivity of detection. The addition of compounds able to prevent any inhibitory effect on PCR was checked (Table 4). PP buffer was the least effective buffer since it did not improve the frequency of bacterial detection. PPP, TENP (2% PVP) or TENPP (2% PVPP) buffers increased significantly the frequency of detection in tomato, eggplant and pepper extracts. TENPP (5% PVPP) buffer or BSA (added to PCR reaction mixture) reduced most inhibition effects exhibited by all tested plants except for *Pelargonium asperum*. Only the addition of TENPP (5% PVPP) to plant extract combined with the addition of BSA to the PCR reaction mixture was able to prevent the inhibition effects exhibited by *Pelargonium asperum* extracts (Figure 5). Since no inhibition of the PCR process by the PVPP reagent was observed, PCR amplification was possible using undiluted plant tissue extracts treated with the TENPP (5% PVPP)/BSA procedure for

Table 3. Effect of dilution of plant or tuber extracts on N-PCR detection of *R. solanacearum*

Dilution	Frequency of N-PCR detection <sup>1,2</sup> (number of positive samples/number of tested samples)					
	Tomato	Potato (plant and tuber)	Eggplant	Pepper	Tobacco	<i>Pelargonium asperum</i>
Undiluted	(4/5)	(1/8)	(2/5)	(2/7)	(2/5)	(0/8)
1:5	(5/5)	(2/6)	(5/5)	(3/5)	(2/5)	(0/5)
1:20	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(2/3)	(0/3)
1:50	ND <sup>3</sup>	(4/4)	(4/4)	(3/3)	(4/4)	(0/6)
1:100	ND	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(5/6)
1:500	ND	ND	ND	ND	ND	(6/6)

<sup>1</sup>Suspension of *R. solanacearum* strain JTS19 (biovar 3, Reunion Island), estimated to  $\sim 5 \times 10^6 \text{ cfu ml}^{-1}$  by viable cell count method, was added to each undiluted or diluted plant or tuber sample and subjected to boiling and N-PCR amplification as described in text.

<sup>2</sup>Detection was considered as positive if a band of expected size could be observed in ethidium bromide-stained 2% agarose gel whatever its intensity (from weak to strong).

<sup>3</sup>ND, not determined.

Table 4. Effect of pretreatment applied to plant extract on the frequency of detection of *R. solanacearum* by N-PCR

Treatment	cfu ml <sup>-1</sup>	Frequency of N-PCR detection <sup>1,2</sup> (number of positive samples/number of tested samples)					
		Tomato	Potato (plant and tuber)	Eggplant	Pepper	Tobacco	<i>Pelargonium asperum</i>
No treatment	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	(8/8)	(3/10)	(4/10)	(3/8)	(3/6)	(0/6)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(4/5)	(1/8)	(2/5)	(2/7)	(2/5)	(0/8)
BSA	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(0/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(4/4)	(0/6)
PP	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	ND <sup>3</sup>	ND	ND	ND	(1/2)	(0/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(0/4)	(0/3)	(0/3)	(0/3)	(0/3)
PPP	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	(2/2)	ND	ND	ND	ND	(0/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(0/4)	(3/3)	(2/3)	(1/3)	(0/3)
TENP (2% PVP)	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	(1/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(0/4)	(3/3)	(0/3)	(1/3)	(0/2)
TENPP (2% PVPP)	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	ND	ND	(2/2)	(2/2)	ND	(0/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(2/4)	(3/3)	(2/3)	(2/3)	(0/3)
TENPP (5% PVPP)	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	(2/2)	(4/4)	(2/2)	(2/2)	(2/2)	(2/3)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(4/4)	(3/3)	(3/3)	(3/3)	(0/3)
BSA+TENPP (2% PVPP)	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	(3/3)	ND	(2/3)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(3/3)	(4/4)	(3/3)	(3/3)	(3/3)	(2/3)
BSA+TENPP (5% PVPP)	~ 5 · 10 <sup>6</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	(2/2)
	~ 5 · 10 <sup>4</sup>	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(6/6)	(6/6)

<sup>1</sup>Suspensions of *R. solanacearum* strain JT519 (biovar 3, Reunion Island), estimated by viable cells count method to ~ 5 · 10<sup>6</sup> and ~ 5 · 10<sup>4</sup> cfu ml<sup>-1</sup> respectively, were added to each plant or tuber sample and subjected to boiling and N-PCR amplification as described in text.

<sup>2</sup>Detection was considered as positive if a band of expected size could be observed in ethidium bromide-stained 2% agarose gel whatever its intensity (from weak to strong).

<sup>3</sup>ND, not determined.

the detection of *R. solanacearum* artificially as well as in naturally contaminated plant samples. Using this procedure, the sensitivity of the N-PCR detection of *R. solanacearum* from artificially- or naturally-infected plants was not significantly different from that of pure culture.

## Discussion

For the first time, sequence variation within the *hrp* gene region, assessed in previous investigation (Poussier et al., 1999), was used to develop a specific and sensitive method to detect *R. solanacearum* strains. The exploration of *hrp* genes has already proved to be useful for providing powerful tools for the detection of phytopathogenic xanthomonads (Leite et al., 1994a,b).

A specific PCR amplicon was obtained by using the selected primer pair RS30-RS31 (Poussier et al., 1999). Nevertheless, in this study, two species closely

related to *R. solanacearum*, *P. syzygii* and the blood disease bacterium, gave the same RS30-RS31 size amplicon as *R. solanacearum* strains. This result was not surprising since the three species have a high degree of DNA homology (Kerstens et al., 1996; Seal et al., 1993; Taghavi et al., 1996). However, these species are easily differentiated by host range, cultural and physiological properties (Eden-Green, 1994; Eden-Green and Sastraatmadja, 1990; Roberts et al., 1990). Nonetheless, the lack of specificity of the RS30-RS31 amplicon should not reduce the usefulness of the tool as a diagnostic procedure for *R. solanacearum*, since *P. syzygii* and the blood disease bacterium have been recorded only in Indonesia and on clove and banana respectively. The major interest of this PCR test was that no PCR product was obtained with other closely-related species such as *R. pickettii* and *B. cepacia* (Palleroni, 1984). Both occur commonly in soil and could be isolated from the same host as *R. solanacearum*, i.e., potato for *R. pickettii* (Seal et al., 1992b) and onion for *B. cepacia* (Girard et al., 1993; Palleroni, 1984).

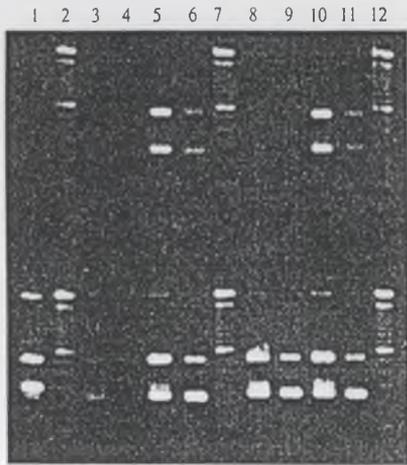


Figure 5. Gel electrophoresis of N-PCR products from cells of *R. solanacearum* (strain JT519, biovar 3, Reunion Island, as template) in plant extracts. Lane 1, negative control (upper part of gel), positive control (lower part of gel); lanes 2, 7 and 12: 100 bp ladder GIBCO BRL. *Pelargonium asperum* extract (lanes 3, 4, 8 and 9) or pepper extract were checked (lanes 5, 6, 10 and 11). Plant extracts were ground in TENPP (2% PVPP) buffer (lanes 3–6) or in TENPP (5% PVPP) buffer (lanes 8–11). BSA was added to PCR mixtures (lower part of gel) or not (upper part of gel). Concentrations of *R. solanacearum* were either  $\sim 5 \cdot 10^6$  cfu ml $^{-1}$  (lanes 3, 5, 8 and 10) or  $\sim 5 \cdot 10^2$  cfu ml $^{-1}$  (lanes 4, 6, 9 and 11).

The PCR amplification with the RS30–RS31 primer set provided a rapid and specific tool for the identification of *R. solanacearum* strains. The detection threshold (approximately  $10^6$  cfu ml $^{-1}$ ) was adequate to detect *R. solanacearum* in heavily infected plant material but was not sufficiently sensitive to detect early or latent infections. This low sensitivity was probably due to the fact that *hrp* gene region is present as a single copy. Indeed, when the target sequence for PCR amplification, such as *rDNA* operon, is present in multiple copies per genome, higher sensitivity levels can be obtained (Li and De Boer, 1995; Maes et al., 1996; Seal et al., 1993). To improve the sensitivity of a single round PCR test, two methods could be employed, either a subsequent Southern hybridization of PCR product or a second round of amplification with nested primers. The N-PCR technique was chosen because it is more rapid and less labour intensive than hybridization techniques. With N-PCR, the specificity was conserved and the

sensitivity was greatly improved. The limit of detection when using either purified DNA or entire bacterial cells was lowered to  $10^3$  cfu ml $^{-1}$  which corresponds to 1 cfu per reaction. Therefore, the N-PCR method should be suitable for detecting *R. solanacearum* in symptomless plants. Latent infections have been reported on potato (Buddenhagen, 1986; Ciampi et al., 1990; Nyangeri et al., 1984) and tomato (Prior et al., 1990), and may be present on many weeds (Hayward, 1991). Such infections are considered to be involved in the spread of bacterial wilt within and between countries (Hayward, 1991). Since N-PCR is a very sensitive technique, extreme care is required to avoid the risk of cross-contamination among samples and of contamination from impure PCR reagents (Hartung et al., 1996; McManus and Jones, 1995; Roberts et al., 1996). Therefore, negative control reactions were included for each test to ensure that positive results were valid. Moreover, all pipettings were done with filtered pipette tips, and pipettes that had never dispensed DNA template or PCR products were exclusively used to make-up the PCR reaction mixtures (Hartung et al., 1996). Moreover, since dead cells may be present in infected tissues and would offer target DNA, the N-PCR-RFLP procedure may lead to an overestimation of bacterial population. Furthermore, since the first step of the procedure required two rather expensive polymerases, the cost of biovar determination could be relatively high. However, compared to the classical method (Hayward, 1964), reliability and rapidity of N-PCR-RFLP offer significant advantages.

The application of the N-PCR assay to tissue extracts from potato tubers or field-grown plants failed to give consistent results due to inhibition of DNA amplification. Such inhibition, which can lead to false negative results or low detection sensitivity, has already been reported when PCR was performed to detect bacteria in plant or soil extracts (Hartung et al., 1996; Kirchhof et al., 1998; Maes et al., 1996; Minsavage et al., 1994; Picard et al., 1992). Although a wide range of inhibitors have been reported, the identity and mode of action of most of them remain unclear (Wilson, 1997). Some of these substances could inhibit the PCR reaction by denaturing or binding to the thermostable DNA polymerases (McGregor et al., 1996; Young et al., 1993), by chelating  $Mg^{2+}$  cofactor for *Taq* polymerase (Tsai and Olson, 1992), or by binding to target DNA (Steffan and Atlas, 1988). The PCR inhibitory effect of plant tissues has been attributed to polysaccharides (Demeke and Adams, 1992) or phenolic compounds such as

tannic acids (Kreader, 1996; Minsavage et al., 1994). Dilution of plant extracts was used to prevent inhibition but it caused a significant reduction in the sensitivity of the method. Therefore, dilution could not be applied to a routine detection technique. Among the various compounds considered to inactivate or remove PCR inhibitors (Audy et al., 1996; Kirchhof et al., 1998; Kreader, 1996; Leite et al., 1995; Maes et al., 1996; McGregor et al., 1996; Minsavage et al., 1994; Picard et al., 1992; Wilson, 1997), PVP, PVPP or BSA were selected. PVPP treatment appeared to be more effective than PVP. BSA added to PCR mixtures prevented inhibition except for *Pelargonium asperum* extracts. For the latter, the inhibitory effect was so strong that no amplification was observed even after treatment with PVP, PVPP or BSA. Only the combination of plant extract treatment with TENPP, including 5% PVPP, and addition of 500 ng or 5 µg of BSA to the PCR mixture successfully eliminated the inhibitory effect.

An N-PCR-RFLP procedure, based on multiplex PCR, was applied to a worldwide collection of *R. solanacearum* strains and appeared to be useful in distinguishing the two divisions of *R. solanacearum* (division I: biovars 3, 4, 5; division II: biovars 1, 2, N2) defined by Cook et al. (1989) and confirmed later (Li et al., 1993; Cook and Sequeira, 1994; Taghavi et al., 1996; Poussier et al., 1999; Seal et al., 1999). Indeed, four distinct profiles, two for each division, were observed: one for biovar 1 strains originating from the Southern part of Africa, one for American biovar 1 and biovar 2 and biovar N2 strains, one for biovars 3 and 4 strains, and one for biovar 5 strains. Although this tool is not suitable to discriminate American biovar 1 from biovar 2 or biovar N2 strains and also biovar 3 from biovar 4 strains, it could be used for accurate identification or detection of any biovar when occurring alone: for example biovar 1 in USA (Hayward, 1991) or biovar 2 in Western Europe (Stead et al., 1996) and when coexisting in the same area: for instance biovars 2, 3 and 4 in Australia, India, Indonesia, Papua New Guinea, Sri Lanka (Hayward, 1991); biovars 2, 3, 4 and 5 in China (Hayward, 1991), biovars 1, 2 and 3 in Reunion Island (Girard et al., 1993); and biovars 1 and 3 in French West Indies (Prior and Steva, 1990). If more than one biovar are present in infected plants, it could be expected that the resulting RFLP pattern would be the addition of bands relative to each biovar with or without one common band. However, when American biovar 1 strains are mixed with biovar 2 or N2 strains

or when biovar 3 and biovar 4 strains are mixed, only one or two common bands could be expected.

The N-PCR-RFLP procedure applied on pretreated (with PVPP/BSA) plant samples has been developed as a powerful aid in the diagnosis of infected plants and latent infections of bacterial wilt. The application of this simple, rapid and sensitive method could be an essential step to ensure the efficiency of prophylactic measures against bacterial wilt. In addition, it could be used for monitoring the spatial distribution and colonization of *R. solanacearum* in field, soil and plants; and for epidemiological studies regarding weeds as possible carriers of *R. solanacearum* and seed as a possible vehicle for the spread of bacterial wilt.

### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Drs Mark Fegan, Lionel Gagnevin, Chris Hayward, Philippe Prior and Olivier Pruvost for critical comments on the manuscript; and all colleagues who have generously contributed strains to this study. This work was supported in part by a grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

### References

- Arlat M, Gough CL, Zischek C, Barberis PA, Trigalet A and Boucher CA (1992) Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 5: 187-193
- Audy P, Braat CE, Saindon G, Huang HC and Laroche A (1996) A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* 86: 361-366
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1991) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates - Wiley Interscience, New York, USA
- Boucher CA, Gough CL and Arlat M (1992) Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu Rev Phytopathol* 30: 443-461
- Buddenhagen I, Sequeira L and Kelman A (1962) Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726
- Buddenhagen IW (1986) Bacterial wilt revisited. In: Persley GJ (ed) *Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific*. Proc Int Workshop (pp 126-143) Los Banos, The Philippines. ACIAR Proc. 13, Canberra, Australia
- Ciampi L, Sequeira L and French ER (1980) Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J* 57: 377-386

- 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. *Mol Plant-Microbe Interact* 2: 113-121
- Cook D, Barlow E and Sequeira L (1991) DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In: Henneke H and Verma DPS (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Vol 1 (pp 103-108) Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Cook D and Sequeira L (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum* (pp 77-93) CAB International, Wallingford, United Kingdom
- Demeke T and Adams RP (1992) The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* 12: 332-334
- Eeden-Green SJ (1994) Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for moko disease. In: Hayward AC and Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum* (pp 25-34) CAB International, Wallingford, United Kingdom
- Eeden-Green SJ and Sastraatmadja H (1990) Blood disease present in Java. *FAO Plant Prot Bull* 38: 49-50
- Girard JC, Nicole JF, Chéron JJ, Gaubiac AM, Huvier O, Oudard B and Suzor H (1993) Bacterial wilt due to *Pseudomonas solanacearum* in Reunion: general situation and current research. In: Hartman GL and Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Proc Int Conf* (pp 343-347) Kaohsiung, Taiwan. ACIAR Proc. 45, Canberra, Australia
- Granada GA and Sequeira L (1983) A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 67: 1084-1088
- Hartung JS, Pruvost OP, Villemot I and Alvarez A (1996) Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 86: 95-101
- Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 27: 265-277
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29: 65-87
- Hayward AC, El-Nashaar HM, Nydegger U and De Lindo L (1990) Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 69: 269-280
- He LY, Sequeira L and Kelman A (1983) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 67: 1357-1361
- Hu X, Lai F-M, Reddy SN and Ishimaru CA (1995) Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85: 1468-1473
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium. *Phytopathology* 44: 693-695
- Kerstler K, Ludwig W, Vancanney M, De Vos P, Gillis M and Schliefer K-H (1996) Recent changes in the classification of the Pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol* 19: 465-477
- Kirchhof G, Baldani JJ, Reis VM and Hartmann A (1998) Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Can J Microbiol* 44: 12-19
- Kreider CA (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* 62: 1102-1106
- Leite RPJ, Egel DS and Stall RE (1994a) Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl Environ Microbiol* 60: 1078-1086
- Leite RPJ, Minsavage GV, Bonas U and Stall RE (1994b) Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* 60: 1068-1077
- Leite RP Jr, Jones JB, Somodi GC, Minsavage GV and Stall RE (1995) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis* 79: 917-922
- Li X and De Boer SH (1995) Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* 85: 837-842
- Li X, Dorsch M, Del Dot T, Sly LI, Stackebrandt E and Hayward AC (1993) Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Bacteriol* 74: 324-329
- Maes M, Garbeva P and Crepel C (1996) Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol* 45: 1139-1149
- McGregor DP, Forster S, Steven J, Adair J, Leary SEC, Leslie DL, Harris WJ and Tibball RW (1996) Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA. *BioTechniques* 21: 463-471
- McManus PS and Jones AL (1995) Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. *Phytopathology* 85: 618-623
- Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC and Stall RE (1994) Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84: 456-461
- National Biosciences I (1996) Oligo, primer analysis software, version 5.0. Plymouth, MN, USA
- Nicole JF (1995) Influence de facteurs biotique ou abiotique sur la dynamique des populations de *Pseudomonas solanacearum* au cours de l'infection et sur le développement de la maladie. Ph.D. thesis, Université de Nantes, France
- Nyangeri JB, Gathuru EM and Mukuya DM (1984) Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. *Tropical Pest Management* 30: 163-165
- Palleroni NJ (1984) Genus I. *Pseudomonas*. In: Krieg NR and Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 1 (pp 141-199) Williams & Wilkins, Baltimore, USA
- Pegg K and Moffett M (1971) Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 11: 696-698
- Picard C, Ponsonnet C, Paget E, Nesme X and Simonet P (1992) Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA

- extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 2717-2722
- 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
- Prior P, Bérarnis M, Chillet M and Schmit J (1990) Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Sm.) resistance mechanisms. *Symbiosis* 9: 393-400
- Prior P and Steva H (1990) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Dis* 74: 13-17
- Roberts PD, Jones JB, Chandler CK, Stall RE and Berger RD (1996) Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Dis* 80: 1283-1288
- Roberts SJ, Eden-Green SJ, Jones P and Ambler DJ (1990) *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst Appl Microbiol* 13: 34-43
- Seal SE, Jackson LA and Daniels MJ (1992a) Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl Environ Microbiol* 58: 3759-3761
- Seal SE, Jackson LA and Daniels MJ (1992b) Isolation of *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3751-3758
- Seal SE, Jackson LA, Young JPW and Daniels MJ (1993) Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J Gen Microbiol* 139: 1587-1594
- Seal SE, Taghavi M, Fegan N, Hayward AC and Fegan M (1999) Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathol* 48: 115-120
- Stead DE, Elphinstone JG and Pemberton AW (1996) Potato brown rot in Europe. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases (pp 1145-1152)
- Steffan RJ and Atlas RM (1988) DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 54: 2185-2191
- Taghavi M, Hayward C, Sly LI 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. *Int J Syst Bacteriol* 46: 10-15
- Tsai Y-L and Olson BH (1992) Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 754-757
- Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* 63: 3741-3751
- Young CC, Burghoff RL, Keim LG, Minak-Bernero V, Lute JR and Hinton SM (1993) Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl Environ Microbiol* 59: 1972-1974

### IV.3.2. Validation de la méthode N-PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans la plante

Afin de vérifier l'efficacité de l'outil N-PCR mis au point, nous avons poursuivi notre étude par son application à la détection de *R. solanacearum* à partir d'un grand nombre d'échantillons de plantes incluant les principales espèces hôtes de la bactérie.

#### IV.3.2.1. Matériels et méthodes

##### IV.3.2.1.1. Vérification de la présence de *R. solanacearum* dans la plante

Les échantillons analysés (137 au total) proviennent de plants de tomate, aubergine, tabac, poivron, géranium et piment cultivés au sein de la parcelle expérimentale « le vallon » naturellement contaminée par *R. solanacearum* (biovar 3). Des plants, manifestant ou non des symptômes de flétrissement partiel ou total, sont prélevés pour analyse au laboratoire. Pour chaque plant, la partie de la tige située au dessus de l'hypocotyle est effeuillée, sectionnée, broyée et mise à macérer dans 5 mL de tampon Tris (annexe 1). Le macérat (50 µL, trois répétitions) est ensemencé sur milieu de culture semi-sélectif (milieu de Granada et Sequeira modifié, annexe 1) et après trois jours d'incubation à 28 °C les populations de *R. solanacearum* sont estimées par numération des colonies. Le milieu de culture utilisé contient du cristal violet et du sulfate de polymyxine B inhibant la croissance des bactéries à Gram positif. La tyrothricine, le chloramphénicol et la pénicilline ralentissent le développement d'un grand nombre d'espèces bactériennes mais pas celui de *R. solanacearum*. Le développement des champignons est fortement inhibé par un antifongique, le propiconazole. Le chlorure de triphényltétrazolium permet de distinguer deux types de colonies selon leur couleur (blanc-rosé/rouge vif) et leur aspect muqueux ou non; les unes sont virulentes, les autres ne le sont pas.

##### IV.3.2.1.2. Détection de *R. solanacearum* par N-PCR

L'application de la N-PCR (avec utilisation du traitement combinant PVPP et BSA) est effectuée tel que décrit dans l'article paru dans EJPP (cf. chapitre IV.3.1.).

Par ailleurs, deux méthodes d'extraction de l'ADN sont comparées pour leur capacité à améliorer la détection de *R. solanacearum* dans les échantillons de plantes au cas où le traitement combinant PVPP et BSA pourrait s'avérer insuffisant pour lever totalement les inhibitions de la réaction d'amplification. Ces méthodes sont choisies car elles sont simples et rapides à mettre en oeuvre (deux critères indispensables pour que ces méthodes soient utilisables en routine) et elles ont fourni d'excellents résultats sur d'autres modèles d'étude. Ces méthodes sont les suivantes :

- utilisation de microbilles magnétiques (Dyna<sup>®</sup>, Compiègne, France),

Le principe repose sur la capture de l'ADN bactérien (présent dans un échantillon biologique), à l'aide d'une sonde biotinylée spécifique d'une séquence du génome de la bactérie recherchée, sur des microbilles magnétiques elles-mêmes associées à de la streptavidine. Les

**Tableau IV-7. Comparaison entre l'estimation des populations de *R. solanacearum* dans les échantillons de plante (comptage sur milieu semi-sélectif) et la détection par N-PCR (utilisation de PVPP et de BSA).**

N°	Plante	log (ufc/mL)	N-PCR	N°	Plante	log (ufc/mL)	N-PCR	N°	Plante	log (ufc/mL)	N-PCR
43	Tomate	10,41	+*	32	Poivron	9,34	+	5	Aubergine	0	-
35	Tomate	10,20	+	37	Poivron	9,34	+	6	Aubergine	0	-
21	Tomate	9,75	+	55	Poivron	9,34	+	7	Aubergine	0	-
18	Tomate	9,64	(+)	52	Poivron	9,26	+	9	Aubergine	0	-
25	Tomate	9,56	+	113	Poivron	9,26	+	11	Aubergine	0	-
31	Tomate	9,56	+	73	Poivron	9,23	+	12	Aubergine	0	-
34	Tomate	9,56	+	118	Poivron	9,23	+	13	Aubergine	0	-
36	Tomate	9,56	+	129	Poivron	9,15	+	47	Aubergine	0	-
26	Tomate	9,53	+	130	Poivron	9,15	+	48	Aubergine	0	-
20	Tomate	9,51	+	76	Poivron	9,11	+	49	Aubergine	0	-
46	Tomate	9,51	+	77	Poivron	9,08	+	106	Aubergine	0	-
44	Tomate	9,45	+	128	Poivron	8,34	+	107	Aubergine	0	-
45	Tomate	9,45	+	54	Poivron	8,28	+	108	Aubergine	0	-
27	Tomate	9,38	+	74	Tomate	7,41	+	22	Aubergine	0	-
37	Tomate	9,34	+	115	Poivron	3,91	+	23	Aubergine	0	-
38	Tomate	9,34	+	110	Poivron	3,91	+	41	Aubergine	0	-
88	Tomate	9,26	+	83	Poivron	3,79	+	42	Aubergine	0	-
59	Tomate	9,08	+	84	Poivron	3,79	+	135	Aubergine	0	-
100	Tomate	8,58	+	85	Poivron	3,79	+	104	Tabac	3,61	+
60	Tomate	8,08	+	119	Poivron	3,79	+	131	Tabac	3,49	-
61	Tomate	7,38	+	114	Poivron	3,71	+	123	Tabac	2,38	-
39	Tomate	4,96	+	117	Poivron	3,71	+	122	Tabac	2,15	-
66	Tomate	3,96	+	116	Poivron	3,61	+	105	Tabac	0	+
95	Tomate	3,85	+	75	Poivron	3,49	+	98	Tabac	0	+
28	Tomate	3,71	+	103	Poivron	3,32	+	50	Tabac	0	+
81	Tomate	3,61	+	134	Poivron	3,32	+	51	Tabac	0	+
72	Tomate	3,61	+	53	Poivron	3,32	+	63	Tabac	0	+
19	Tomate	3,61	+	30	Aubergine	9,83	+	64	Tabac	0	+
56	Tomate	3,61	+	69	Aubergine	9,45	+	65	Tabac	0	+
86	Tomate	3,49	+	14	Aubergine	9,08	+	62	Tabac	0	(+)
87	Tomate	3,49	+	109	Aubergine	8,53	+	99	Tabac	0	(+)
97	Tomate	3,49	+	90	Aubergine	8,20	+	132	Tabac	0	-
82	Tomate	3,32	+	120	Aubergine	8,15	+	121	Tabac	0	-
79	Tomate	3,32	+	91	Aubergine	4,20	+	126	Géranium	9,08	+
96	Tomate	3,32	+	24	Aubergine	3,83	-	93	Géranium	8,18	+
89	Tomate	0 †	+	10	Aubergine	3,79	(+)	125	Géranium	7,15	+
101	Tomate	0	+	67	Aubergine	3,71	+	94	Géranium	4,38	+
70	Tomate	0	+	68	Aubergine	3,32	+	57	Géranium	4,34	(+)
80	Tomate	0	+	137	Aubergine	3,04	(+)	92	Géranium	4,00	-
71	Tomate	0	-	29	Aubergine	2,64	(+)	58	Géranium	3,85	-
102	Poivron	10,15	+	8	Aubergine	2,08	-	17	Géranium	3,32	-
33	Poivron	9,64	+	136	Aubergine	0	+	124	Géranium	3,04	-
111	Poivron	9,52	+	1	Aubergine	0	-	15	Géranium	0	-
112	Poivron	9,49	+	2	Aubergine	0	-	16	Géranium	0	-
127	Poivron	9,41	+	3	Aubergine	0	-	133	Piment	3,04	+
78	Poivron	9,41	+	4	Aubergine	0	-				

\* : + : signal d'amplification d'intensité forte; (+) : signal d'amplification d'intensité faible; - : aucun signal d'amplification.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

complexes formés microbilles-ADN cible sont retenus grâce à un aimant pendant que le reste de l'échantillon est éliminé. Ces complexes sont ensuite directement utilisés pour la PCR. Dans notre cas, nous avons sélectionné comme sondes spécifiques de *R. solanacearum* les amorces RS30 et RS31.

Deux protocoles décrits par d'autres auteurs (Jacobsen, 1995; Mangiapan *et al.*, 1996) sont essayés (annexes 9 et 10). Le principe général est le même pour les deux méthodes mais l'ordre des étapes est différent. Dans le protocole de Jacobsen (1995), les microbilles sont d'abord fixées à la sonde avant l'étape d'hybridation à l'ADN. Dans le protocole de Mangiapan *et al.* (1996), donné comme référence par la firme Dynal, la sonde est d'abord hybridée à l'ADN avant d'être mise en contact avec les microbilles magnétiques.

- utilisation du Kit QIAamp® (Qiagen®, GmbH, Allemagne).

Le kit QIAamp (annexe 11) est conçu pour extraire rapidement de l'ADN bactérien présent dans différents types de milieux biologiques. Son principe consiste à retenir l'ADN sur une membrane contenue dans une mini-colonne de centrifugation. L'ADN purifié est élué puis est alors utilisé pour la PCR.

#### IV.3.2.2. Résultats

L'analyse de 137 échantillons de plantes est effectuée selon deux méthodes : la culture bactérienne sur milieu semi-sélectif et la N-PCR (tableau IV-7).

La présence de *R. solanacearum* n'est pas détectée chez 27 échantillons quelle que soit la méthode de détection mise en oeuvre. Pour les 110 échantillons restants, dans lesquels *R. solanacearum* a été mis en évidence, le niveau des populations bactériennes est très variable, allant de 2,08 à 10,41 [en log (ufc/mL)]. Parmi ces échantillons, l'application des deux méthodes aboutit parfois à des résultats contradictoires. Par exemple, pour 14 échantillons (neuf de tabac, quatre de tomate et un d'aubergine) aucune colonie de *R. solanacearum* n'est observée sur milieu de culture alors que la présence de *R. solanacearum* est pourtant détectée par l'emploi de la N-PCR. A l'opposé, pour 10 échantillons (cinq de géranium, trois de tabac et deux d'aubergine) la présence de *R. solanacearum* n'est pas détectée par N-PCR alors que des populations de *R. solanacearum* sont pourtant mises en évidence sur milieu de culture; toutefois, le niveau de ces populations est faible, de l'ordre de 2 et 3 unités logarithmiques.

L'utilisation, à partir de 24 échantillons de plantes, de méthodes d'extraction d'ADN (à la place du protocole employant du PVPP et de la BSA) précédant la mise en oeuvre de la N-PCR conduit à des résultats très variables (tableau IV-8). L'utilisation du kit QIAamp, en confirmant la présence de *R. solanacearum* dans l'ensemble des échantillons testés, permet d'améliorer la détection par N-PCR par rapport au protocole combinant PVPP et BSA. La capture magnétique selon le protocole de Mangiapan *et al.* (1996) s'avère totalement inopérante puisque aucune amplification ne peut être visualisée alors que selon le protocole de Jacobsen (1995) les résultats sont plus aléatoires puisqu'une amélioration de la détection n'est notée que pour certains échantillons.

Tableau IV-8. Comparaison du traitement combiné PVPP et BSA à deux protocoles d'extraction et de purification d'ADN (kit QIAamp et séquence-capture) pour la détection par N-PCR de *R. solanacearum* dans les échantillons de plantes.

N°	Plante	log (ufc/mL)	PVPP et BSA	Kit QIAamp	séquence-capture
43	Tomate	10,41	+ *	+	+
21	Tomate	9,75	+	+	+
31	Tomate	9,56	+	+	(+)
36	Tomate	9,56	+	+	(+)
46	Tomate	9,51	+	+	+
39	Tomate	4,96	+	+	(+)
28	Tomate	3,71	+	+	+
134	Poivron	3,32	+	+	+
10	Aubergine	3,79	(+)	(+)	(+)
137	Aubergine	3,04	(+)	(+)	-
29	Aubergine	2,64	(+)	(+)	(+)
136	Aubergine	0 †	+	+	+
123	Tabac	2,38	-	-	-
122	Tabac	2,15	-	-	-
121	Tabac	0	-	-	-
132	Tabac	0	-	+	(+)
126	Géranium	9,08	+	+	+
93	Géranium	8,18	+	+	+
125	Géranium	7,15	+	+	-
57	Géranium	4,34	(+)	(+)	-
92	Géranium	4,00	-	+	+
58	Géranium	3,85	-	(+)	-
17	Géranium	3,32	-	+	-
124	Géranium	3,04	-	+	(+)

\* : + : signal d'amplification d'intensité forte; (+) : signal d'amplification d'intensité faible; - : aucun signal d'amplification.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL ; elle est fixée arbitrairement à zéro.

## IV.3.2.3. Discussion

L'objectif de ces travaux est de vérifier la fiabilité de la méthode moléculaire de détection de *R. solanacearum* mise au point sur un grand nombre d'échantillons de plantes. La comparaison de la détection sur milieu semi-sélectif et la détection par N-PCR révèle que ces méthodes sont très complémentaires, chaque méthode ayant ses avantages et ses limites.

La détection par culture bactérienne sur milieu semi-sélectif est la méthode la plus couramment utilisée car il s'agit d'une méthode sensible (de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  ufc/mL), très simple à mettre en oeuvre, peu coûteuse et assurant une quantification du pathogène. Mais, des doutes peuvent subsister quant à l'identité exacte des colonies observées sur le milieu de culture. D'autres espèces bactériennes peuvent en effet présenter les mêmes aspects morphologiques que *R. solanacearum* (colonies muqueuses mais aussi rugueuses) sur milieu de culture conduisant alors à une identification incertaine. De plus, certaines plantes, essentiellement le tabac mais aussi quelques échantillons de tomate et d'aubergine, peuvent contenir des agents inhibiteurs de la croissance bactérienne sur le milieu de culture car pour ces plantes aucune colonie de *R. solanacearum* n'est observée alors que la présence de *R. solanacearum* est pourtant détectée par N-PCR. La présence d'inhibiteurs chez le tabac a été confirmée car le mélange d'extraits de tabac avec des concentrations connues de *R. solanacearum* s'est traduit par une diminution de la concentration bactérienne d'un facteur 100 à 1000. La mise en évidence d'inhibiteurs de la croissance bactérienne sur milieu de culture a également été rapportée chez l'abricotier, la vigne et le poirier dans le cas de *P. syringae* pv. *syringae* (Prunier *et al.*, 1970; Luisetti *et al.*, 1991; Yessad *et al.*, 1992). Par conséquent, il apparaît que la détection par culture bactérienne sur milieu semi-sélectif est une méthode qui présente de nombreux avantages mais qui doit être complétée par l'utilisation d'une autre technique pour permettre un diagnostic plus fiable.

La méthode N-PCR se présente comme une méthode très complémentaire de la méthode par culture bactérienne sur milieu semi-sélectif. En effet, les résultats obtenus ont montré qu'il s'agit d'une méthode de sensibilité équivalente à celle de la culture bactérienne sur milieu semi-sélectif (de l'ordre de  $10^3$  ufc/mL), plus rapide (un jour au lieu de trois à quatre jours avant l'obtention des résultats) mais aussi plus coûteuse. En outre, la N-PCR présente l'avantage d'être plus spécifique car seul *R. solanacearum* est détecté. Elle rend également possible l'identification directe des biovars de *R. solanacearum*, ce que n'autorise pas la culture bactérienne sur milieu semi-sélectif; la détermination traditionnelle des biovars selon la procédure d'Hayward (1964) requiert de une à trois semaines. Toutefois, l'application combinée de PVPP et de BSA, bien qu'efficace dans son ensemble, a montré ses limites en particulier pour les échantillons de géranium. Pour ces échantillons, la N-PCR a confirmé la présence de *R. solanacearum* dans seulement quatre cas sur neuf. Par conséquent, les inhibitions de la PCR ne sont que partiellement levées dans les échantillons de géranium par l'application combinée de PVPP et de BSA. Ces résultats témoignent qu'il existe une variation des éléments inhibiteurs de la réaction d'amplification, tant au niveau de la qualité qu'au niveau de la quantité, selon les espèces végétales. De même, il est très probable que l'état physiologique de la plante (flétrissement total ou partiel ou encore aucun symptôme apparent) est un facteur pouvant intervenir sur la qualité et la quantité des inhibiteurs et donc sur l'efficacité de la détection. Ces inhibitions sont dues à des substances diffusibles, de nature connue (polysaccharides, composés phénoliques) ou inconnue, qui sans détruire les bactéries

agissent sur les éléments de la PCR (par dénaturation de la *Taq* ADN polymérase, par chélation du  $Mg^{2+}$  cofacteur de la *Taq*, ou par liaison avec l'ADN) (Wilson, 1997).

Afin de rendre efficace la détection moléculaire de *R. solanacearum* dans tous types de plantes, deux méthodes d'extraction de l'ADN, rapides et simples à mettre en oeuvre, ont été essayées. L'utilisation du kit QIAamp s'avère être la méthode la plus efficace pour lever les inhibitions PCR observées. L'ADN retenu sur la membrane contenue dans la mini-colonne se trouve purifié de tout élément inhibiteur. En effet, la présence de *R. solanacearum* est détectée dans tous les échantillons testés y compris ceux de géranium. Le principal inconvénient de cette méthode est son coût d'utilisation plus élevé par rapport à celui des autres méthodes. Parmi les deux méthodes de séquence-capture utilisant des micro-billes magnétiques, le protocole de Mangiapan *et al.* (1996), n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés puisque aucune amplification n'est observée, en revanche, le protocole de Jacobsen (1995) se révèle intéressant même s'il est moins efficace que le kit QIAamp (les intensités des signaux d'amplification étant généralement plus faibles, ce qui laisserait supposer que les inhibitions ne sont que partiellement levées) voire même dans certains cas moins efficace qu'un traitement combinant PVPP et BSA. La séquence-capture est une technique originale nettement moins employée qu'une technique similaire, l'immuno-capture, utilisant des anticorps au lieu de sondes nucléiques (Widjoatmodjo *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1995; Gelsthorpe *et al.*, 1996; Hartung *et al.*, 1996; Bukhari *et al.*, 1998; Fratamico & Strobaugh, 1998; Watanabe *et al.*, 1998). Pourtant, la séquence-capture par rapport à l'immuno-capture, présente l'avantage d'une meilleure reproductibilité car les sérums ne sont pas toujours homogènes à l'inverse des sondes nucléiques.

L'utilisation de la N-PCR sur un grand nombre d'échantillons de plantes montre qu'il s'agit d'une méthode utilisable en routine au laboratoire pour la détection de *R. solanacearum* au même titre que la culture bactérienne sur milieu semi-sélectif. La N-PCR présente en effet les caractéristiques d'un bon outil de détection : spécificité, sensibilité, reproductibilité, rapidité et simplicité de mise en oeuvre. Toutefois, elle présente l'inconvénient de ne pas autoriser la distinction entre les cellules viables et les cellules non viables, ce qui peut entraîner une surestimation des populations bactériennes. En outre, la limite à une utilisation en routine est le coût relativement élevé.

S'il est essentiel de pouvoir diagnostiquer avec certitude la présence d'une faible quantité de *R. solanacearum* dans une plante, il est tout aussi important de pouvoir détecter la bactérie dans les principaux réservoirs où elle est supposée pouvoir se conserver.

## IV.4. Détection moléculaire de *R. solanacearum* dans l'eau

### Introduction

L'utilisation de la N-PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans des échantillons de plantes s'étant avérée très efficace, nous avons souhaité poursuivre notre étude par une évaluation de ce même outil pour la détection dans un autre milieu, l'eau, susceptible d'héberger la bactérie et d'assurer sa dissémination (Hayward, 1991; Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Farag *et al.*, 1999; et cf. chapitre V.1.). Cette évaluation est effectuée dans différents types d'eau afin d'adapter l'outil moléculaire à la détection dans ce milieu.

### IV.4.1. Matériels et méthodes

#### IV.4.1.1. Souches bactériennes et milieux de culture

Les expériences sont réalisées avec deux souches de *R. solanacearum* isolées à la Réunion et sélectionnées pour leur résistance naturelle à certains antibiotiques (Nicole, 1995). La souche A, de biovar 3 (race 1), est résistante à la rifamycine et la streptomycine et est issue d'une souche isolée de géranium rosat. La souche C, de biovar 2 (race 3), est résistante à l'acide nalidixique et à la streptomycine, et dérive d'une souche isolée de pomme de terre.

Les souches A et C sont cultivées sur milieux sélectifs constitués par le milieu de Granada et Sequeira modifié auquel sont ajoutés les sélecteurs appropriés (rifamycine et streptomycine pour la souche A, acide nalidixique et streptomycine pour la souche C) (annexe 1). Les boîtes de Petri sont incubées pendant quatre à cinq jours à 28 °C. Pour les isolements à partir des eaux témoins, le milieu de Granada et Sequeira modifié ainsi que le milieu LPGA sont utilisés.

#### IV.4.1.2. Adaptation du protocole de détection de *R. solanacearum* par N-PCR

Afin d'évaluer le seuil de sensibilité de la méthode N-PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans des échantillons d'eau, la N-PCR est tout d'abord appliquée à des échantillons pour lesquels la population bactérienne (souches A ou C) est estimée par numération sur milieu sélectif. Ces échantillons proviennent d'une étude effectuée pour analyser la durée de survie de *R. solanacearum* dans différents types d'eau (eau osmosée, eau de ville, eaux d'irrigation) (cf. chapitre V.1.2.1.).

Par la suite, différentes méthodes de concentration des bactéries et d'extraction de l'ADN bactérien sont comparées pour tenter d'améliorer le seuil de détection et lever le phénomène d'inhibition observé par application de la N-PCR sur les échantillons d'eaux. Dans cette optique, une eau d'irrigation (500 mL), différente de celles utilisées dans l'expérience précédente, est contaminée par une gamme de concentrations de la souche A d'une part et de la souche C d'autre part. Ces concentrations, s'échelonnant régulièrement de  $10^1$  à  $10^7$  ufc/mL, sont préparées par dilution à partir d'une suspension initiale à  $10^8$  ufc/mL (densité optique de 0,210 à une longueur d'onde de 600 nm pour la souche A et de 0,125 pour la souche C). Les méthodes de concentration des bactéries et d'extraction d'ADN comparées sont les suivantes :

**Tableau IV-9. Influence de la nature de l'eau, de la souche et de sa concentration sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* (souches A et C) par N-PCR.**

Type d'eau	Classe de concentration [log (ufc/mL)]	Souche A		Souche C	
		Nombre d'échantillons	Fréquence de détection (en %)	Nombre d'échantillons	Fréquence de détection (en %)
Eau osmosée	1,00 - 2,99	21	<b>b* 0 b†</b>	8	<b>a 50 a</b>
	3,00 - 4,99	2	<b>a 0 b</b>	13	<b>a 85 a</b>
	5,00 - 6,99	6	<b>a 100 a</b>	8	<b>a 100 a</b>
	7,00 - 8,99	4	<b>a 100 a</b>	4	<b>a 100 a</b>
Eau de ville	1,00 - 2,99	16	<b>a 19 b</b>	16	<b>a 25 b</b>
	3,00 - 4,99	13	<b>a 8 b</b>	12	<b>a 50 ab</b>
	5,00 - 6,99	3	<b>a 100 a</b>	4	<b>a 100 a</b>
	7,00 - 8,99	1	<b>a 100 ab</b>	1	<b>a 100 ab</b>
Eau d'irrigation	1,00 - 2,99	14	<b>a 0 c</b>	16	<b>a 0 b</b>
	3,00 - 4,99	10	<b>a 20 bc</b>	5	<b>a 60 a</b>
	5,00 - 6,99	2	<b>a 100 ab</b>	7	<b>a 57 a</b>
	7,00 - 8,99	4	<b>a 100 a</b>	2	<b>a 50 ab</b>

\* : pour une même eau et une même classe de concentration, les fréquences précédées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

† : pour une même eau et une même souche, les fréquences suivies d'une même lettre (en caractère gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

**Tableau IV-10. Influence de la méthode de concentration bactérienne et d'extraction d'ADN sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* (souche A) par N-PCR dans une eau d'irrigation.**

Méthode utilisée	Fréquence de détection (en %) en fonction de la concentration bactérienne (en ufc/mL)						
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
Témoin	<b>b* 0 b†</b>	<b>b 0 b</b>	<b>a 100 a</b>				
Filtration	<b>b 0 b</b>	<b>b 0 b</b>	<b>b 22 b</b>	<b>b 44 bc</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>
Centrifugation	<b>b 0 b</b>	<b>b 0 b</b>	<b>b 0 b</b>	<b>a 89 ab</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>
Filtration et centrifugation	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>
Microbilles magnétiques	<b>a 67 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>	<b>a 100 a</b>
Kit QIAamp	<b>d 0 b</b>	<b>cd 33 b</b>	<b>abc 56 b</b>	<b>ab 89 ab</b>	<b>abc 78 a</b>	<b>abc 67 a</b>	<b>a 100 a</b>

\* : pour une même méthode, les fréquences précédées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

† : pour une même concentration, les fréquences suivies d'une même lettre (en caractère gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

- méthodes de concentration des échantillons,

Une partie des échantillons est concentrée par centrifugation. Des prélèvements de 10 mL sont centrifugés à 13000 tr/min pendant 10 min et chaque culot, repris chacun dans 1 mL d'eau pure, subit alors une deuxième centrifugation à 13000 tr/min durant 10 min. Le culot résultant est resuspendu dans 300  $\mu$ L d'eau pure stérile. Cette méthode permet de concentrer 33 fois les échantillons.

Une seconde partie est concentrée par filtration. Dix mL sont filtrés sous vide dans une colonne munie d'une membrane en nitrocellulose de porosité 0,2  $\mu$ m. Les bactéries retenues sur la membrane sont remises en suspension par agitation de celle-ci dans 1 mL d'eau pure stérile pendant 5 min. Cette méthode permet de concentrer 10 fois les échantillons.

Une autre fraction des échantillons subit un traitement mixte associant une filtration comme précédemment, permettant de reprendre les bactéries dans 1 mL d'eau pure stérile suivi d'une centrifugation à 13000 tr/min durant 10 min permettant de remettre en suspension le culot dans 300  $\mu$ L d'eau pure stérile. Cette méthode permet de concentrer 33 fois les échantillons.

Enfin, des échantillons de 1 mL non concentrés servent de témoin.

À l'issue de chaque traitement, les échantillons sont placés dans un bain-marie réglé à 100 °C pendant 10 min puis dans de la glace pour permettre un choc thermique assurant la lyse des bactéries et la libération de l'ADN.

- protocoles d'extraction d'ADN.

Le protocole de séquence-capture de Jacobsen (1995) utilisant des microbilles magnétiques ainsi que l'utilisation du kit QIAamp, ayant donné de bons résultats à partir d'échantillons de plantes, sont testés.

Les ADN issus des deux méthodes (concentration et extraction) sont utilisés pour la N-PCR comme décrit pour les expérimentations effectuées à partir d'échantillons de plantes.

#### IV.4.1.3. Traitements statistiques des données

Les fréquences de détection sont comparées après une transformation de type  $y = \arcsin \sqrt{(x/100)}$  qui permet de considérer comme normale la distribution des données. Après avoir vérifié l'homogénéité des variances, les analyses de variance sont effectuées et suivies, le cas échéant, d'une comparaison de moyennes par la méthode des ranges de Duncan.

#### IV.4.2. Résultats

L'application de la N-PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans différents types d'eau aboutit à des résultats très variables (tableau IV-9). La fréquence de détection par N-PCR augmente significativement avec la concentration bactérienne dans l'eau. Elle est en général faible ou nulle pour des concentrations inférieures à  $10^3$  ufc/mL. En revanche, elle est maximale pour des concentrations supérieures à  $10^5$  ufc/mL. Cependant, quelques exceptions sont observées : des concentrations de la souche C inférieures à  $10^3$  ufc/mL sont détectées en eau osmosée avec une fréquence de 0,5; des concentrations de la souche C supérieures à  $10^5$  ufc/mL ne sont détectées en eau d'irrigation qu'avec une fréquence de 0,5.

La fréquence de détection par N-PCR ne varie pas en fonction de la souche avec une exception cependant : la détection de concentrations inférieures à  $10^3$  ufc/mL n'est observée que pour la souche C avec une fréquence significative de 0,5. De même, la nature de l'eau n'influence pas la détection de *R. solanacearum* avec là aussi une exception pour la souche C à des concentrations inférieures à  $10^3$  ufc/mL.

L'application de méthodes de concentration bactérienne ou de méthodes particulières d'extraction de l'ADN permettent d'accroître significativement la fréquence de détection de *R. solanacearum* dans l'eau d'irrigation (tableau IV-10). En l'absence de toute méthode spécifique, il faut une concentration au moins de l'ordre de  $10^7$  ufc/mL pour qu'une détection soit possible. Cette limite est abaissée à  $10^5$  ufc/mL si une filtration est appliquée, à  $10^4$  ufc/mL si une centrifugation est effectuée, à  $10^3$  ufc/mL si le kit QIAamp est utilisé et à  $10^1$  ufc/mL si la filtration et la centrifugation sont associées ou si des microbilles magnétiques sont employées.

#### IV.4.3. Discussion

Les essais de détection de *R. solanacearum* par N-PCR dans l'eau révèlent qu'il existe dans ce milieu, comme il a été montré précédemment dans les plantes, des éléments ayant une activité inhibitrice de la réaction d'amplification. Nos résultats ne nous permettent pas d'affirmer que l'activité inhibitrice est plus importante dans les eaux d'irrigation que dans les eaux plus pures même si on a pu constater pour l'une des souches une fréquence de détection significativement plus élevée dans de l'eau osmosée que dans les autres eaux. Dans une eau d'irrigation, *R. solanacearum* n'est détectable qu'à de fortes concentrations au moins équivalentes à  $10^7$  ufc/mL, soit une diminution d'un facteur 10000 par rapport au seuil de sensibilité escompté ( $10^3$  ufc/mL). Ce phénomène d'inhibition a déjà été observé dans le cadre d'autres études effectuées sur des échantillons d'eau (Bej *et al.*, 1991a et 1991b; Toranzos *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1995; Mayer & Palmer, 1996; Bukhari *et al.*, 1998; Kaucner & Stinear, 1998; Wiedenmann *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1999). La concentration des bactéries par une filtration sur membrane associée à une centrifugation ou l'extraction de l'ADN bactérien à l'aide de microbilles magnétiques sont les deux méthodes qui sont apparues les plus efficaces pour contourner cette difficulté et accroître la sensibilité de la détection par N-PCR (de l'ordre de  $10^1$  à  $10^2$  ufc/mL).

La filtration a pour effet de séparer les bactéries des autres éléments pouvant renfermer des inhibiteurs. La remise en suspension permet de "laver", de toute substance pouvant être gênante, les bactéries que l'on précipite à nouveau par centrifugation. Cette procédure correspond à la fois à une élimination d'éventuelles substances inhibitrices et à une augmentation de la concentration bactérienne même si des pertes sont probables lors des manipulations. La conséquence en est donc une augmentation de la sensibilité de la détection. Ces différentes méthodes de concentration sont couramment utilisées, mais le choix de l'une d'entre elles est souvent dépendant du volume des échantillons d'eau et du matériel disponible au laboratoire. En effet, les filtrations sont souvent appliquées à l'analyse d'importants volumes d'eau (Toranzos *et al.*, 1993; Elphinstone *et al.*, 1998) alors que les centrifugations sont davantage réservées au traitement de plus petits volumes (Mayer & Palmer, 1996; Kaucner & Stinear, 1998). Une concentration par filtration est en effet moins efficace sur de

faibles volumes puisqu'il faut un minimum de 1 à 2 mL d'eau stérile pour immerger la membrane après filtration; elle est à l'opposé beaucoup plus efficace sur de plus grands volumes d'échantillons. Au contraire, il est facile de réaliser une concentration notable par centrifugation sur des volumes modérés ou faibles; ceci s'avère plus difficile sur d'importants volumes d'échantillons puisque les volumes des tubes de centrifugation sont relativement limités (250 mL au maximum au laboratoire de phytopathologie du CIRAD-Réunion). Cependant, l'utilisation de membranes de filtration en nitrocellulose pour concentrer la suspension bactérienne, dans le but d'effectuer une détection par PCR, reste discutée; la matière même de ces membranes a été reconnue comme inhibitrice de la réaction d'amplification (Bej *et al.*, 1991b; Wilson, 1997). Dans notre cas, aucune inhibition n'a cependant été constatée.

Très récemment, un système de filtration sous pression a été évalué en France pour la concentration d'échantillons d'eau de rivière en vue de la détection de *R. solanacearum* (Expert *et al.*, 2000). Grâce à ce système, plusieurs litres d'eau peuvent être filtrés sous pression d'air comprimé ou d'azote directement sur le terrain au travers d'une membrane filtrante retenant les bactéries. Ce système se révèle par conséquent très intéressant dans le cadre de prospections puisqu'en filtrant directement sur le terrain, cela permet de soulager le laboratoire d'une bonne partie du travail à effectuer et de gagner du temps, ce qui n'est pas négligeable car les populations bactériennes sont susceptibles d'évoluer rapidement dans les pots de prélèvements avant l'analyse proprement dite. De plus, la sensibilité de ce système, de l'ordre de  $10^4$  ufc/mL, est équivalente à celle obtenue par centrifugation (Expert *et al.*, 2000).

Parmi les deux méthodes d'extraction d'ADN employées, celle utilisant les microbilles magnétiques et reposant sur des affinités nucléotidiques se montre la plus efficace car elle permet de détecter de manière reproductible, au contraire de celle basée sur le kit QIAamp, des populations bactériennes de faible concentration de l'ordre de  $10^1$  à  $10^2$  ufc/mL. La capture magnétique s'est déjà révélée très performante pour la détection à partir d'échantillons d'eau (Johnson *et al.*, 1995; Bukhari *et al.*, 1998). Cette méthode présente de nombreux avantages: elle est très simple à utiliser, ne nécessite pas d'équipements de laboratoire coûteux, concentre l'ADN cible et sépare efficacement l'ADN cible des ADN non-spécifiques d'une part et des éléments potentiellement inhibiteurs de la PCR d'autre part.

## IV.5. Détection moléculaire de *R. solanacearum* dans les semences

### Introduction

Même si aucune étude approfondie n'a été effectuée dans ce domaine, il est communément admis que les semences, hormis les tubercules de pomme de terre, ne constituent pas une voie effective de la transmission de *R. solanacearum*. Toutefois, l'étude réalisée à partir de semences de tomate et d'aubergine, présentée dans le chapitre V.2., permet dorénavant d'envisager la possibilité d'une transmission de la bactérie par la graine. C'est pourquoi, nous avons décidé de mettre au point une méthode de détection moléculaire de *R. solanacearum* dans les semences, afin de pouvoir mettre en oeuvre, le cas échéant, des mesures de contrôle.

La majeure partie des résultats présentés ci-dessous a été obtenue avec les amorces OLI1-Y2 spécifiques du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993). Ce choix se justifie dans le sens où la N-PCR est une technique plus lourde et plus onéreuse que la PCR classique (nécessitant qu'une seule étape d'amplification au lieu de deux). De plus, les deux méthodes de détection ont un niveau de sensibilité tout à fait similaire de l'ordre de  $10^3$  ufc/mL, ce que nous avons vérifié à de multiples reprises. Enfin, dans la mesure où dans cette phase de mise au point seules des souches identifiées sont utilisées, l'emploi du couple d'amorces OLI1-Y2 reste suffisant.

### IV.5.1. Matériel et méthodes

#### IV.5.1.1. Préparation des graines

La détection moléculaire de *R. solanacearum* dans les semences est mise au point à partir de graines de tomate (cultivar Roma VF) et d'aubergine (cultivar Black Beauty) contaminées artificiellement (protocole détaillé chapitre V.2.1.2.) par une gamme de concentration de la souche A (biovar 3) ou de la souche C (biovar 2) de *R. solanacearum*. Ces graines ont été mises, pour partie, à macérer (45 graines dans 4,5 mL de tampon de macération) pendant une nuit à 4 °C et sous agitation et pour partie broyées à l'Ultra-Turrax. Les macérats et les broyats des graines subissent ensuite un choc thermique (100 °C durant 10 min puis 0 °C) pour libérer l'ADN avant d'être utilisés pour la PCR.

#### IV.5.1.2. Adaptation du protocole de détection de *R. solanacearum* par PCR

##### IV.5.1.2.1. Evaluation de tampons de macération et d'additifs PCR

Une inhibition de l'amplification étant observée à l'issue des premières PCR effectuées à partir des macérats et des broyats de graines contaminées, plusieurs tampons de macération sont essayés afin de lever cette inhibition (annexe 12). Ces tampons contiennent notamment du PVP et du PVPP (polymère du PVP) assurant une élimination, par adsorption, de composés inhibiteurs de la réaction PCR, ou encore de l'acide ascorbique et de l'ascorbate de sodium, antioxydants, pouvant également éliminer les inhibitions PCR.

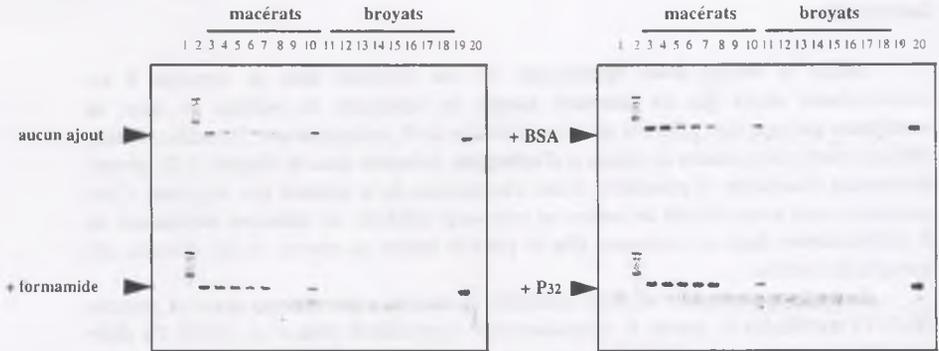


Figure IV-8. Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graines de tomate contaminées, selon les différents tampons de macération et additifs aux mélanges PCR utilisés. Piste 1, témoin négatif; piste 2, marqueur de taille (100 pb); pistes 3 et 11, tampon PP; pistes 4 et 12, tampon PPP; pistes 5 et 13, tampon TENP (2%PVP); pistes 6 et 14, tampon TENPP (2%PVPP); pistes 7 et 15, tampon TENPP (5%PVPP); pistes 8 et 16, tampon SCPAPP (ascorbate de sodium); pistes 9 et 17, tampon SCPAPP (ascorbate); pistes 10 et 18, tampon tris; piste 19, vide; piste 20, témoin positif.

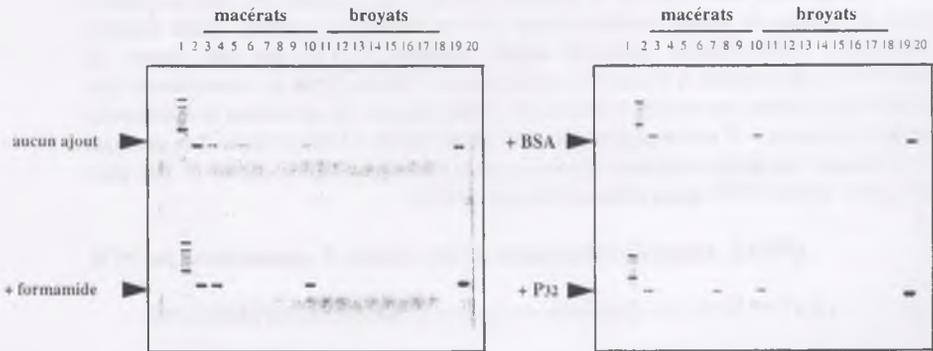


Figure IV-9. Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graines d'aubergine contaminées, selon les différents tampons de macération et additifs aux mélanges PCR utilisés. Piste 1, témoin négatif; piste 2, marqueur de taille (100 pb); pistes 3 et 11, tampon PP; pistes 4 et 12, tampon PPP; pistes 5 et 13, tampon TENP (2%PVP); pistes 6 et 14, tampon TENPP (2%PVPP); pistes 7 et 15, tampon TENPP (5%PVPP); pistes 8 et 16, tampon SCPAPP (ascorbate de sodium); pistes 9 et 17, tampon SCPAPP (ascorbate); pistes 10 et 18, tampon tris; piste 19, vide; piste 20, témoin positif.

Par ailleurs, des ajouts séparés de BSA (1 %), de formamide (0,1 %; 1 % et 5 %), de P<sub>32</sub> (protéine 32 du phage T4) (25, 50 et 100 ng) ou de Triton X100 (1 %) directement dans le mélange réactionnel de la PCR sont effectués dans le but d'améliorer encore la détection.

#### IV.5.1.2.2. Evaluation de méthodes d'extraction d'ADN

Plusieurs méthodes d'extraction d'ADN sont également comparées afin d'améliorer la détection. La méthode de détection devant être simple et rapide pour être utilisable en routine, les méthodes d'extraction d'ADN sont choisies en fonction de ces contraintes et des résultats qu'ils ont permis d'obtenir sur d'autres modèles d'étude. Ces méthodes sont les suivantes :

- méthode d'extraction selon Ausubel *et al.* (1991),

Cette méthode (annexe 5) est couramment utilisée pour extraire et purifier de l'ADN à partir de suspensions bactériennes concentrées.

- méthode d'extraction selon Audy *et al.* (1996),

Cette méthode (annexe 13) permet une extraction rapide de l'ADN bactérien mais aussi une analyse de la localisation interne ou externe des bactéries infectant les graines par un traitement avec du NaOH.

- méthodes d'extraction selon Jacobsen (1995) ou selon Mangiapan *et al.* (1996) ou basée sur le kit QIAamp,

Ces méthodes ont déjà été évaluées pour la détection de *R. solanacearum* au niveau des plantes et des eaux (cf. chapitres IV.3 et IV.4).

### IV.5.2. Résultats

Sans aucun traitement, il n'est pas possible de détecter *R. solanacearum* par PCR dans les macérats de graines de tomate ou d'aubergine, excepté dans le cas d'une forte contamination ( $> 10^6$  ufc/graine). En revanche, aucune amplification n'est obtenue à partir des broyats de graines.

#### IV.5.2.1. Comparaison des tampons de macération et des additifs PCR

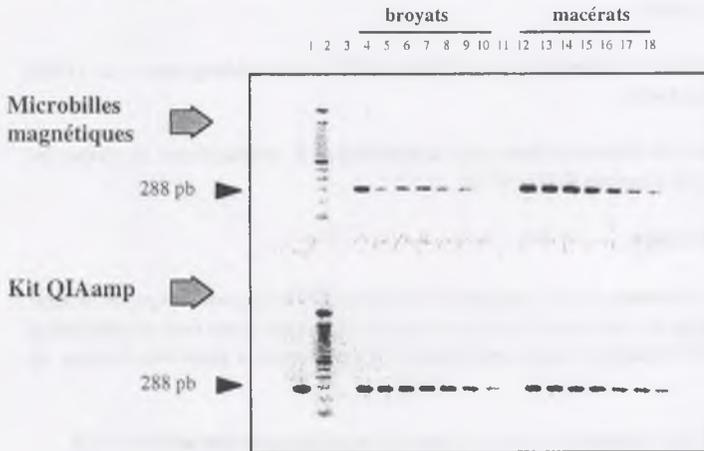
Aucun tampon de macération ne permet d'améliorer la détection, une inhibition de la PCR étant même notée pour les tampons incluant de l'ascorbate (figures IV-8 et IV-9).

Les additifs au mélange PCR montrent une efficacité uniquement pour les macérats de graines, aucune levée d'inhibition n'étant constatée pour les broyats. L'addition de P<sub>32</sub>, de BSA ou de formamide au mélange PCR accroît nettement l'intensité des bandes d'électrophorèse dans le cas des graines de tomate (figure IV-8); en revanche, cet effet est faible ou variable dans le cas des graines d'aubergine (figure IV-9).

**Tableau IV-11. Influence de la méthode d'extraction de l'ADN sur la fréquence de détection de *R. solanacearum* par PCR dans les macérats et broyats de graines de tomate.**

Méthode d'extraction de l'ADN	Macérats de graines		Broyats de graines	
	Nombre d'échantillons	Fréquence de détection (en %)	Nombre d'échantillons	Fréquence de détection (en %)
selon Ausubel <i>et al.</i> (1991)	17	6 c*	17	6 c
selon Audy <i>et al.</i> (1996)	26	85 ab	7	100 ab
selon Mangiapan <i>et al.</i> (1996)	6	0 c	6	0 c
selon Jacobsen (1995)	20	100 a	20	70 b
selon le kit QIAamp	18	94 ab	18	94 ab

\*: les valeurs suivies d'une même lettre (en caractère gras) ne sont pas différentes significativement (P = 0,05).



**Figure IV-10. Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum*, dans les macérats et broyats de graines de tomate contaminées, par utilisation de microbilles magnétiques (Dynal) ou du kit QIAamp (Qiagen).**

Piste 1, témoins négatif (partie supérieure du gel) et positif (partie inférieure du gel); piste 2, marqueur de taille (100 pb), pistes 3 et 11, vide; pistes 4 à 10 et pistes 12 à 18, concentrations bactériennes estimées par comptage des colonies sur milieu de culture (ufc/mL) :  $\sim 10^8$ ,  $\sim 10^7$ ,  $\sim 10^6$ ,  $\sim 10^5$ ,  $\sim 10^4$ ,  $\sim 10^3$ ,  $\sim 10^2$ , respectivement.

#### IV.5.2.2. Comparaison des méthodes d'extraction d'ADN

L'ADN bactérien extrait des macérats ou des broyats de graines selon les cinq méthodes en comparaison conduit à une amplification par PCR avec une fréquence très variable selon la méthode, allant de 0 à 100 % (tableau IV-11).

Le premier protocole testé (Ausubel *et al.*, 1991) est inopérant puisqu'il ne conduit à l'amplification souhaitée que dans 2 cas sur 34. L'utilisation des microbilles magnétiques génère des résultats diamétralement opposés selon que l'on utilise la méthode de Mangiapan *et al.* (1996) ou celle de Jacobsen (1995). Si aucune détection de *R. solanacearum* n'est effectuée avec la première méthode, la fréquence atteint globalement 85 % avec la seconde. On constate d'ailleurs une efficacité significativement moindre de la détection sur les broyats de graines (70 %) que sur les macérats (100 %). De plus, la sensibilité s'avère excellente puisqu'il est possible de détecter des concentrations aussi faibles que  $10^2$  ufc/mL (figure IV-10).

Les deux autres méthodes d'extraction montrent une efficacité aussi élevée puisque les fréquences de détection sont voisines de 90 %. La méthode d'extraction selon Audy *et al.*, (1996) permet d'obtenir des bandes d'amplification très intenses à partir des macérats (figures IV-11 et IV-12), mais de moindre intensité à partir de broyats de graines. Par ailleurs, l'intensité des bandes est fonction de la concentration initiale de l'inoculum, très forte pour  $10^8$  ufc/mL mais encore nette pour  $10^5$  ufc/mL (figure IV-12). Une autre indication liée à la méthode d'Audy *et al.* (1996) est l'absence d'amplification à partir de la suspension de broyage des graines préalablement lavées, ce qui signifierait une présence superficielle exclusive de *R. solanacearum*. Dans le cas d'une extraction par les mini-colonnes du système QIAamp, de faibles concentrations de l'ordre de  $10^2$  ufc/mL, peuvent être détectées (figure IV-10).

#### IV.5.3. Discussion

Les essais de détection de *R. solanacearum* ont été menés systématiquement sur les macérats et les broyats de graines. Le broyage des graines se justifie dans le sens où nous ne savions pas, au début de ces recherches, si la macération était suffisante pour libérer toutes les bactéries des graines. De plus, nous voulions savoir s'il était possible d'éviter la macération qui requiert une nuit avant de pouvoir mettre en oeuvre une PCR.

Les inhibitions générées par la macération ou le broyage des graines ont été un obstacle à la mise en place rapide d'une méthode de détection par PCR au niveau des semences. Ce phénomène d'inhibition a été observé également dans le cadre d'études effectuées pour la détection par PCR d'autres bactéries phytopathogènes dans les graines (Prosen *et al.*, 1993; Tourte, 1993; Leite *et al.*, 1995; Schaad *et al.*, 1995). Les différents additifs au tampon de macération des graines tels que le PVP, le PVPP ou l'ascorbate de sodium, ont été sélectionnés en fonction de leur efficacité reconnue pour lever les inhibitions PCR (Picard *et al.*, 1992; Tourte, 1993; Minsavage *et al.*, 1994; Leite *et al.*, 1995; Maes *et al.*, 1996). Dans notre cas, ces additifs n'ont pas eu l'effet escompté puisque aucune réelle levée d'inhibition n'est notée. En revanche, l'addition au mélange réactionnel pour la PCR de BSA, de  $P_{32}$  ou de formamide permet bien de lever des inhibitions et donc améliore la sensibilité de la méthode de détection, en particulier pour les semences de tomate. La BSA augmente la spécificité de la réaction en limitant les appariements non-spécifiques et a déjà été rapportée comme étant efficace pour lever des inhibitions de la PCR (Kreader, 1996; McGregor *et al.*, 1996). La  $P_{32}$  en stabilisant les ADN simples brins, s'est déjà montrée efficace pour éliminer des inhibitions de la PCR



Figure IV-11. Détection par PCR (amorces OL11-Y2) de *R. solanacearum*, au niveau de graines d'aubergine contaminées à  $10^8$  ufc/mL, selon le protocole d'Audy *et al.* (1996).

Piste 1, témoin négatif; pistes 2 et 11, marqueur de taille (100 pb-BRL); pistes 3 à 6, lavage des graines; pistes 7 et 9, broyage des graines sans lavage préalable; pistes 8 et 10, lavage puis broyage des graines; piste 12, témoin positif.

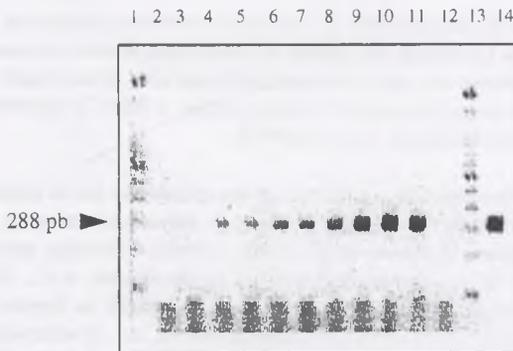


Figure IV-12. Détection par PCR (amorces OL11-Y2) de *R. solanacearum*, dans la suspension de lavage de graines d'aubergine contaminées, selon le protocole d'Audy *et al.* (1996).

Pistes 1 et 13, marqueur de taille (100 pb); pistes 2 et 3,  $10^4$  ufc/mL; pistes 4 et 5,  $10^5$  ufc/mL; pistes 6 et 7,  $10^6$  ufc/mL; pistes 8 et 9,  $10^7$  ufc/mL; pistes 10 et 11,  $10^8$  ufc/mL; piste 12, témoin négatif; piste 14, témoin positif. Pistes 2, 4, 6, 8, 10: graines inoculées par trempage; pistes 3, 5, 7, 9, 11: graines inoculées par infiltration sous vide.

(Widjojoatmodjo *et al.*, 1992; Tebbe & Vahjen, 1993; Kreader, 1996). Le formamide améliore la spécificité et protège la polymérase lors de la dénaturation initiale (Picard *et al.*, 1992). Le triton X100, connu pour solubiliser les protéines et assurer un meilleur accès à l'ADN, a également été testé mais ne s'avère pas efficace. Néanmoins, même si la BSA, la P<sub>32</sub> ou le formamide montrent une certaine efficacité ils n'ont pas permis l'élimination de l'ensemble des inhibitions de la PCR. Il faut ajouter que ces inhibitions sont renforcées lorsque les graines sont broyées, les inhibiteurs étant alors certainement libérés en plus grande quantité.

L'extraction d'ADN apparaît la solution la plus appropriée pour lever les inhibitions de la PCR; elle est d'ailleurs fréquemment mise en oeuvre lors de travaux similaires de détection par PCR de bactéries au niveau des graines (Prosen *et al.*, 1993; Leite *et al.*, 1995). La méthode de détection devant être utilisable en routine, notre choix s'est orienté vers des méthodes d'extraction d'ADN simples et rapides.

La méthode d'Audy *et al.* (1996) est très intéressante puisqu'elle autorise une extraction d'ADN extrêmement rapide et simple avec une sensibilité de l'ordre de 10<sup>5</sup> ufc/mL. Cette méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter de macération pendant une nuit, l'analyse pouvant être effectuée immédiatement après lavage ou broyage des graines. Cependant, son caractère destructif (lyse des bactéries par utilisation de NaOH concentré) interdit toute numération bactérienne par culture sur milieu gélosé, élément très important à contrôler lors de l'utilisation de la PCR en détection. Par ailleurs, l'utilisation de cette méthode montre que *R. solanacearum* n'est pas localisé à l'intérieur des graines lorsque celles-ci sont contaminées artificiellement.

Le protocole de séquence-capture de Jacobsen (1995) utilisant des microbilles magnétiques donne des résultats très probants à partir de macérats de graines (seuil de détection estimé à 10<sup>2</sup> ufc/mL) mais la reproductibilité à partir de broyats reste limitée du fait de la présence de nombreux débris de semences gênant une bonne récupération des microbilles. Un aimant plus puissant permettrait sans doute de contourner cette difficulté. L'utilisation de ce protocole permet donc d'éliminer les inhibiteurs de la réaction d'amplification. L'application du protocole de Mangiapan *et al.* (1996) est en revanche inefficace, ce qui indiquerait une activité inhibitrice de la liaison d'affinité biotine-streptavidine au sein des macérats et des broyats de graines.

Enfin, le kit QIamp se révèle être une technique extrêmement sensible (seuil de détection estimé à 10<sup>2</sup> ufc/mL) très rapide et très fiable pour lever les inhibitions PCR aussi bien sur macérats que sur broyats de graines. Le principal inconvénient de cette méthode est son coût d'utilisation plus élevé par rapport à celui des autres méthodes.

La détection de *R. solanacearum* par PCR à partir d'échantillons de graines de tomate ou d'aubergine est par conséquent possible après une macération d'une nuit ou directement après broyage des graines (ce qui représente un gain de temps non négligeable). Selon les contraintes financières et expérimentales, le choix de la méthode d'extraction d'ADN, préalable indispensable pour éliminer les inhibitions de la PCR, peut se faire entre l'utilisation du kit QIamp, méthode la plus onéreuse à mettre en oeuvre mais certainement la plus fiable même pour des broyats de graines faiblement contaminées, la séquence-capture (Jacobsen, 1995), méthode moins coûteuse, également fiable même pour des graines faiblement contaminées, mais à utiliser uniquement sur macérat de graines, et la méthode d'Audy *et al.* (1996), la plus rapide, la moins coûteuse mais aussi la moins sensible (des quantités plus importantes de graines étant requises) et n'autorisant pas un dénombrement des bactéries sur milieu de culture.

## IV.6. Détection moléculaire de *R. solanacearum* dans le sol

### Introduction

L'obtention d'un outil assurant une détection certaine et efficace de *R. solanacearum* dans le sol, réservoir principal de l'inoculum, est un des objectifs majeurs de cette thèse. En effet, en raison de la richesse de la flore microbienne du sol, qui peut atteindre jusqu'à  $10^{10}$  bactéries/g de sol (Nesme *et al.*, 1995b), la mise au point d'un milieu de culture sélectif réellement efficace a toujours échoué et l'utilisation de réactifs sérologiques plus ou moins spécifiques s'est toujours révélée insuffisante, voire inopérante. La seule méthode applicable pour la détection de *R. solanacearum* dans un sol est qualitative, lourde à mettre en oeuvre et peu sensible car basée sur l'apparition de symptômes de flétrissement chez des plantes sensibles.

L'outil PCR, de par ses nombreuses qualités, semble pouvoir répondre aux besoins en matière de détection de *R. solanacearum* dans le sol. Comme pour l'étude précédente consacrée à la détection de la bactérie au niveau des semences, la majeure partie des résultats présentés ci-dessous a été obtenue avec les amorces OLI1-Y2 spécifiques du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993).

L'extraction de l'ADN du sol est une étape préliminaire à l'amplification par PCR; elle peut être directe ou indirecte. La méthode directe consiste à lyser les cellules (eucaryotes et procaryotes) à l'intérieur du sol pour récupérer et extraire l'ADN et la méthode indirecte cherche tout d'abord à séparer les cellules bactériennes des constituants du sol avant de les lyser pour en extraire l'ADN.

L'objectif est donc d'évaluer différentes méthodes d'extraction d'ADN selon une approche directe ou indirecte et de dégager celle(s) permettant la détection par PCR de *R. solanacearum* dans différents types de sol.

### IV.6.1. Matériels et méthodes

#### IV.6.1.1. Souches bactériennes et types de sol utilisés

Les expériences sont effectuées avec les souches A et C de *R. solanacearum* et leurs milieux sélectifs respectifs.

Quatre sols naturels (sol brun, sol ferrallitique, andosol et vertisol) correspondant aux quatre principaux types de sol présents sur l'île de la Réunion sont utilisés. L'absence de populations naturelles de *R. solanacearum* dans ces différents sols est préalablement vérifié (cf. chapitre V.3.).

#### IV.6.1.2. Adaptation du protocole de détection de *R. solanacearum* par PCR

##### IV.6.1.2.1. Préparation du sol et inoculation

La mise au point du protocole d'extraction est réalisée à la fois sur un sol artificiel (mélange de tourbe et de terreau) et sur un sol brun. Les sols sont tamisés (maille de 2 mm) et des fractions de 500 g sont contaminées par la souche A ou la souche C concentrées à  $10^4$  ou à  $10^6$  ufc/mL. Un temps d'incubation de 30 à 45 min est considéré comme nécessaire pour permettre l'adhésion des bactéries aux particules de sol. A l'issue, des échantillons de 20 g de sol inoculé sont prélevés et mis en suspension dans un volume variable de tampon Tris.

## IV.6.1.2.2. Méthodes d'extraction de l'ADN

Différentes méthodes d'extraction de l'ADN du sol sont évaluées selon une approche directe ou indirecte. Par ailleurs, une suspension bactérienne pure dosée à  $10^8$  ufc/mL est utilisée pour vérifier l'efficacité de chaque protocole d'extraction de l'ADN.

- Méthodes d'extraction adaptée de Jacobsen (1995) ou basée sur l'utilisation du kit QIAamp (Qiagen).

Ces deux méthodes présentées en annexes 10 et 11 ont déjà été évaluées pour la détection de *R. solanacearum* dans la plante, les eaux et les semences. Le tampon d'extraction (non employé dans le cas des autres types d'échantillons biologiques) utilisé avant la mise en oeuvre de ces méthodes est le TENPP contenant du PVPP à 5 % (composition en annexe 12).

- Méthodes d'extraction adaptées de Volossiouk *et al.* (1995), de Porteous *et al.* (1997), de Kuske *et al.* (1998) et d'Ito *et al.* (1998).

Ces méthodes ont été utilisées avec succès pour la détection par PCR de divers micro-organismes (Volossiouk *et al.*, 1995; Porteous *et al.*, 1997; Kuske *et al.*, 1998) ou de *R. solanacearum* (Ito *et al.*, 1998) dans le sol. Ces méthodes sont détaillées respectivement en annexes 14, 15, 16 et 17.

Afin de vérifier la qualité de l'ADN extrait, une électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % est effectuée. La bande d'ADN obtenue (de taille souhaitée comprise entre 12 et 25 kpb) peut être purifiée en l'isolant du gel à l'aide d'une lame de rasoir et l'utilisation d'un kit commercial de purification d'ADN (Qiagen). Cet ADN purifié est alors utilisé pour la PCR.

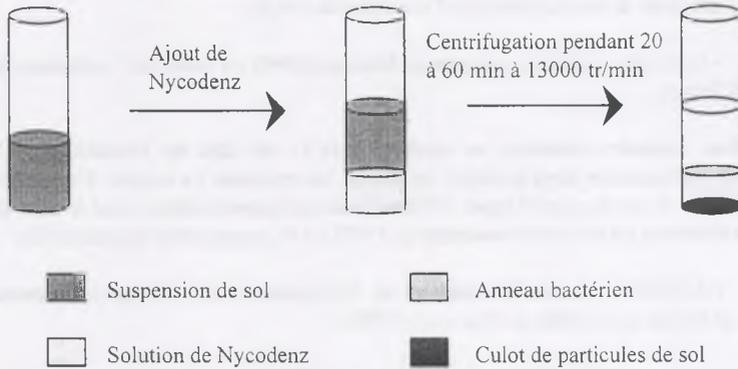
## IV.6.1.2.3. Mise au point d'un protocole d'extraction des bactéries du sol

Selon une approche indirecte, la mise en oeuvre de méthodes d'extraction d'ADN est précédée par une extraction des bactéries du sol. Plusieurs protocoles d'extraction des bactéries du sol sont comparés sur la base du pourcentage de bactéries extraites. Ce pourcentage correspond au rapport du nombre de bactéries dénombrées sur milieu sélectif (A ou C) après extraction et du nombre de bactéries inoculées.

- Comparaison de méthodes de dispersion du sol

- ◊ Comparaison de l'efficacité de deux broyeurs

Le broyage du sol est réalisé à l'aide soit du Waring Blendor pendant une minute à la vitesse de 22000 tr/min soit de l'Ultra-Turrax durant 30 s à la vitesse de 24000 tr/min.



**Figure IV-13. Principe de récupération des cellules bactériennes à partir d'un extrait de sol par utilisation de Nycodenz (d'après Bakken et Lindhal, 1995).**

## ◊ Influence du nombre et de la durée des broyages

Pour un même échantillon de sol, trois broyages successifs de 30 s sont effectués avec l'Ultra-Turrax, et cinq d'une minute chacun avec le Waring Blender. Une aliquote du broyat est prélevé après le premier et le dernier broyage.

## ◊ Influence du volume de tampon Tris

Différents volumes de tampon Tris pour extraire les bactéries du sol sont ajoutés : 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 et 300 mL. Deux méthodes sont comparées :

- des échantillons de même masse sont dilués dans les différents volumes de Tris, et sont ensuite broyés,

- l'échantillon de sol est d'abord dilué dans 50 mL de Tris, broyé et une aliquote de broyat est alors prélevé. Puis, 25 mL de Tris sont ajoutés pour avoir un volume total de 75 mL, cette suspension de sol est placée sur un agitateur rotatif réglé à 125 tr/min pendant 30 min. A l'issue, une aliquote est prélevé et une nouvelle addition de 25 mL de Tris est opérée, suivi d'une agitation pendant 30 min et d'un prélèvement d'une aliquote, et ainsi de suite.

## ◊ Influence de l'addition d'adjuvants

Trois adjuvants au tampon Tris sont comparés : le Tween 80, le Triton X100 et le polyéthylèneglycol (PEG) 8000 à trois concentrations différentes : 0,01; 0,1 et 1 %.

A l'échantillon de sol préalablement contaminé est ajouté l'adjuvant à la concentration voulue, la suspension est alors placée sur un agitateur rotatif réglé à 125 tr/min pendant 1 h. Après broyage une aliquote est prélevé. Deux témoins « Tris sans agitation » et « Tris avec agitation » sont aussi préparés.

## • Comparaison de méthodes de récupération des cellules bactériennes

Deux méthodes, une centrifugation à basse vitesse et l'utilisation du Nycodenz (Life Technologies), permettant de séparer la fraction bactérienne des autres constituants du sol, sont comparées.

## ◊ Influence de la vitesse et de la durée de centrifugation

Une aliquote du broyat de sol est réparti en fractions de 1 mL dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Plusieurs vitesses et durées de centrifugation sont comparées : 5 ou 10 min à 500 ou à 1000 tr/min. Le surnageant contenant les bactéries est prélevé, une partie est étalée directement sur milieu sélectif approprié (A ou C) et l'autre est centrifugée à 13000 tr/min durant 10 min, le culot bactérien étant alors repris dans 175 µL de tampon Tris avant étalement sur milieu sélectif.

## ◊ Evaluation de l'efficacité du Nycodenz

Le Nycodenz permet de séparer les cellules bactériennes des constituants de sol selon un gradient de densité (figure IV-13). Il s'agit d'un dérivé non ionique et non toxique de l'acide benzoïque et soluble dans l'eau.

**Tableau IV-12. Influence du nombre de broyages effectués à l'aide du Waring Blendor sur le niveau des populations bactériennes extraites d'échantillons de terreau ou de sol brun contaminés artificiellement par la souche A dosée à  $10^4$  ou à  $10^6$  ufc/mL.**

Nombre et temps de broyage	Waring Blendor 1 x 1 min				Waring Blendor 5 x 1 min			
	Terreau		Sol brun		Terreau		Sol brun	
Dose d'inoculum (ufc/mL)	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$
Jour après inoculation								
0	3,39*	5,47	3,30	5,63	3,25	5,64	3,32	5,87
1	3,10	5,18	3,42	5,82	2,98	5,07	3,31	5,72
2	3,10	0,00 †	3,55	0,00	2,82	0,00	3,26	0,00

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/g sol).

† : correspond à une valeur en dessous du seuil de détection; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**Tableau IV-13. Influence du nombre de broyages effectués à l'aide de l'Ultra-Turrax sur le niveau des populations bactériennes extraites d'échantillons de terreau et de sol brun contaminé artificiellement par la souche A dosée à  $10^4$  ou  $10^6$  ufc/mL.**

Nombre et temps de broyage	Ultra-Turrax 1 x 30 s				Ultra-Turrax 3 x 30 s			
	Terreau		Sol brun		Terreau		Sol brun	
Dose d'inoculum (ufc/mL)	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$	$10^4$	$10^6$
Jour après inoculation								
0	3,92 *	6,17	3,54	5,78	4,19	6,19	3,24	5,95
1	3,23	5,30	3,45	5,88	3,16	5,32	3,27	5,77
2	ND †	0,00 ‡	3,58	0,00	ND	0,00	3,54	0,00

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/g sol).

† : ND, population non déterminée en raison de contaminants sur le milieu de culture.

‡ : correspond à une valeur en dessous du seuil de détection; elle est fixée arbitrairement à zéro.

Un prélèvement de broyat de sol est réparti en fractions de 20 mL dans des tubes de téflon de 30 mL. Sept mL de solution de Nycodenz de densité 1,3 g/mL sont déposés très délicatement avec une pipette Pasteur sous la suspension de sol. Les bactéries, après centrifugation à 13000 tr/min pendant 20 ou 60 minutes à 4 °C, forment un anneau visible à l'oeil nu à l'interface entre la phase aqueuse et le Nycodenz. L'anneau bactérien collecté est soit directement étalé sur milieu sélectif, soit centrifugé à 13000 tr/min pendant 20 min à 4 °C, le culot bactérien étant ensuite repris dans 175 µL de tampon Tris et étalé sur milieu sélectif.

#### IV.6.1.2.4. Mise en oeuvre de la PCR

Différents ADN sont utilisés pour la PCR : (i) l'ADN résultant d'une extraction directe, (ii) l'ADN résultant d'une extraction indirecte et (iii) l'ADN obtenu par lyse (choc thermique) des bactéries récupérées soit après centrifugation à basse vitesse soit sur gradient de Nycodenz directement ou après centrifugation à 13000 tr/min.

En outre, pour améliorer la détection par PCR de *R. solanacearum* à partir des échantillons de sol, différentes concentrations (10, 20, 100, 200 et 500 ng/µL) de BSA et de P<sub>32</sub> sont ajoutées séparément au mélange réactionnel de la PCR.

Afin d'avoir une référence quantitative pour la validation de la détection par PCR dans le sol, une estimation des populations bactériennes (souche A ou C) par dénombrement de colonies sur milieu sélectif est systématiquement effectuée, en parallèle de la mise en oeuvre de la PCR, pour chaque échantillon de sol.

#### IV.6.1.3. Traitements statistiques des données

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances, des analyses de variance sont réalisées et suivies, le cas échéant, d'une comparaison de moyennes par la méthode des ranges de Duncan.

Un test Chi<sup>2</sup> est effectué pour évaluer l'hypothèse d'une distribution aléatoire des valeurs dans le cas d'une comparaison des durées de broyage avec chacun des types de broyeurs et également dans le cas de l'ajout d'une centrifugation à l'issue du broyage. Un ajustement des données à une droite est aussi tenté pour illustrer l'influence du volume du tampon d'extraction sur le rendement de l'extraction.

### IV.6.2. Résultats

#### IV.6.2.1. Comparaison de l'efficacité de méthodes d'extraction directe d'ADN et d'additifs PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans le sol

Chaque méthode d'extraction d'ADN est tout d'abord évaluée pour sa capacité à autoriser la détection par PCR de *R. solanacearum* à partir de suspension concentrée à 10<sup>8</sup> ufc/mL. Les résultats étant positifs, les méthodes sont alors appliquées pour une extraction directe d'ADN, sans étape préliminaire d'extraction des bactéries du sol, en vue de la détection de la bactérie (souches A ou C) inoculées à chaque type de sol.

La méthode adaptée de Jacobsen (1995) est la seule qui ne conduit pas à l'extraction d'ADN, les particules de sol gênant la bonne récupération des microbilles magnétiques.

**Tableau IV-14. Influence du volume de tampon Tris et du type de broyeur sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche C dosée à 10<sup>4</sup> ufc/mL (premier protocole).**

Premier essai :

Volume de Tris (mL)	50		100		200	
Broyeur	Waring Blendor	Ultra-Turrax	Waring Blendor	Ultra-Turrax	Waring Blendor	Ultra-Turrax
log (ufc/g sol)	3,01 a *	3,10 a	2,88 a	3,19 a	3,10 a	3,10 a

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

Second essai :

Volume de Tris (mL)	50	75	100	125	150	175	200	225	250	300
log (ufc/g de sol) †	3,11 *	3,49	3,70	3,71	3,65	3,70	3,89	3,62	3,63	3,77

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

† : broyage du sol effectué à l'aide de l'Ultra-Turrax.

**Tableau IV-15. Influence du volume de tampon Tris sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par les souches A ou C dosées à 10<sup>4</sup> ufc/mL (second protocole).**

Premier et second essais (souche C) :

Volume de Tris (mL)	50	75	100	125	150	175	200	225	250	300
log (ufc/g sol) † essai 1	3,03 a*	2,79 a	3,08 a	3,09 a	3,20 a	3,02 a	3,11 a	3,19 a	3,29 a	2,92 a
log (ufc/g sol) † essai 2	2,85 a*	2,80 a	3,00 a	1,76 a	2,90 a	2,76 a	2,34 a	2,86 a	2,75 a	2,89 a

\* : pour une même ligne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

† : broyage du sol effectué à l'aide de l'Ultra-Turrax.

Troisième essai (souche A) :

Volume de Tris (mL)	50	100	150	200	250	300
log (ufc/g sol) † essai 3	2,68 a *	1,56 a	2,99 a	3,22 a	3,30 a	3,60 a

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

† : broyage du sol effectué à l'aide de l'Ultra-Turrax.

L'ADN extrait par les autres méthodes est un ADN de haut poids moléculaire, non fragmenté, de taille comprise entre 12 et 25 kpb. L'intensité des bandes d'ADN observées après électrophorèse apparaît variable selon la méthode d'extraction employée. L'application du kit QIAamp aboutit à une bande d'ADN d'intensité faible sur gel tandis les méthodes adaptées de Porteous *et al.* (1997) et de Kuske *et al.* (1998) conduisent à des bandes de forte intensité. De plus, l'intensité des bandes d'ADN apparaît variable selon le type de sol : pour le sol ferrallitique et le vertisol, la bande d'ADN est plus intense que celle relative à l'andosol et nettement plus intense que celle relative au sol brun; ces résultats suggèrent l'existence de quantités variables d'ADN selon le type de sol. Il est également important de noter que les ADN extraits présentent une couleur brune excepté celui résultant de l'utilisation du kit QIAamp qui est de couleur blanche.

La détection de *R. solanacearum* par PCR à partir de ces ADN est impossible excepté dans le cas d'une forte dose d'inoculum,  $10^8$  ufc/mL, et de l'utilisation du kit QIAamp mais seulement pour l'andosol et le sol brun. L'emploi d'additifs, BSA ou  $P_{32}$  au mélange réactionnel PCR n'entraîne aucune amélioration, quelle que soit la concentration utilisée. Néanmoins, si l'ADN subit une étape supplémentaire de purification, par migration sur gel d'agarose puis passage sur une mini-colonne de purification pour séparer l'ADN des autres composés du sol, il est alors possible d'obtenir un signal d'amplification mais uniquement pour une forte concentration d'inoculum et en utilisant l'un ou l'autre des additifs PCR concentrés à 500 ng/ $\mu$ L.

Etant donné le manque de sensibilité des méthodes employées, nous nous sommes orientés vers une approche indirecte en nous attachant en premier lieu à la mise au point d'une méthode d'extraction optimale des bactéries du sol.

#### IV.6.2.2. Mise au point d'une méthode d'extraction des bactéries du sol

##### IV.6.2.2.1. Influence du broyeur et du nombre de broyages

Comme il n'y a pas eu de répétitions pour comparer l'influence du nombre de broyages, aucune méthode statistique autre que celle du  $\chi^2$  ne peut être appliquée. Avec le Waring Blendor, les populations bactériennes extraites à l'issue d'un seul broyage comparées à celles extraites à l'issue de cinq broyages sont plus élevées dans sept cas et moins élevées dans quatre cas (tableau IV-12). Avec l'Ultra-Turrax, dans cinq cas sur neuf le rendement obtenu pour un seul broyage est plus élevé comparé à celui obtenu pour trois broyages (tableau IV-13). Ces fréquences ne sont pas significativement différentes, on admet qu'un seul broyage à l'aide de l'un ou l'autre des deux appareils est suffisant. Par ailleurs, les capacités d'extraction de chaque type de broyeur ne sont pas significativement différentes.

##### IV.6.2.2.2. Influence du volume de tampon Tris

Le premier protocole consiste à mettre en suspension le sol, inoculé avec la souche C dosée à  $10^4$  ufc/mL, dans différents volumes de tampon Tris.

Dans un premier essai, trois volumes de tampon Tris (50, 100 et 200 mL) sont comparés. L'analyse de variance montre que, quel que soit le volume de Tris utilisé, les populations bactériennes extraites ne sont pas significativement différentes (tableau IV-14).

**Tableau IV-16. Influence du type de broyeur et de la nature de l'adjuvant au tampon d'extraction sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche C dosée à 10<sup>4</sup> ufc/mL.**

Essai	N° 1		N° 2		N°3	
	Broyeur Adjuvant	Waring Blendor	Ultra-Turrax	Waring Blendor	Ultra-Turrax	Ultra-Turrax
Tris		2,92 * b †	3,29 a	3,14 a	3,14 a	3,36 a
Tris+PEG		3,63 a	2,88 ab	2,82 a	2,83 a	2,37 b
Tris+Triton		3,52 a	2,62 b	2,37 a	2,90 a	3,35 a
Tris+Tween		3,47 a	3,18 a	3,07 a	3,19 a	3,12 a

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/g sol).

† : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

**Tableau IV-17. Influence de centrifugations à basse et à haute vitesse sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche A ou C dosée à 10<sup>4</sup> ufc/mL.**

Essai	N° 1	N° 2		N° 3
Souche	C	A	C	C
Centrifugation				
aucune	2,70 * b †	3,05 a	2,96 b	2,71 b
à basse vitesse	3,39 a	2,68 b	3,82 a	3,82 a
à basse vitesse puis à haute vitesse	3,84 a	2,46 b	3,81 a	3,70 a

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/g sol).

† : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

**Tableau IV-18. Influence du temps de centrifugation, utilisé pour séparer les bactéries des particules de sol sur gradient de Nycodenz, sur le niveau des populations bactériennes extraites d'un échantillon de sol brun contaminé artificiellement par la souche A ou C dosée à 10<sup>4</sup> ufc/mL.**

Souche	A				C			
	Essai 1		Essai 2		Essai 1		Essai 2	
Durée de centrifugation	20 min	60 min						
log (ufc/g sol)	3,19 a*	2,30 b	2,94 a	2,56 b	3,79 a	2,75 b	3,08 a	1,82 b

\* : pour un même essai, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

Le deuxième essai porte sur dix volumes différents de tampon Tris, s'échelonnant de 50 à 300 mL (tableau IV-14). L'absence de répétitions ne permettant pas de faire une analyse de variance, nous avons essayé de montrer l'existence d'une relation linéaire entre le volume de Tris et la population bactérienne extraite. Les paramètres de la régression ne sont pas significativement différents de zéro, ce qui indique l'absence de toute influence du volume d'extraction.

Le second protocole consiste en des ajouts successifs de volume de Tris. Les trois essais réalisés, soit avec la souche C soit avec la souche A, fournissent des résultats qui traités par une analyse de variance révèle l'absence de différences significatives entre les différents volumes de Tris (tableau IV-15).

#### IV.6.2.2.3. Influence de l'addition d'adjuvants au tampon Tris

Un premier essai comparant l'efficacité de trois adjuvants (PEG, Triton et Tween 80) au tampon Tris à trois concentrations différentes (0,01; 0,1 et 1 %), le broyage du sol étant effectué par le Waring Blendor ou par l'Ultra-Turrax, montre que quel que soit l'adjuvant, sa concentration n'influence pas le rendement d'extraction des bactéries du sol. Dans le cas d'un broyage par le Waring Blendor, l'addition d'adjuvant accroît significativement le rendement d'extraction des bactéries du sol; en revanche, aucune différence significative n'est observée entre les différents adjuvants (tableau IV-16). Dans le cas d'un broyage par l'Ultra-Turrax, l'utilisation d'adjuvants n'améliore pas le rendement d'extraction, une diminution significative est même notée si on ajoute du Triton au tampon Tris.

Lors du second essai où seule la concentration la plus forte (1 %) est utilisée pour chaque adjuvant, il n'y a pas de différence significative entre les traitements, quelle que soit la méthode de broyage (tableau IV-16).

Pour le dernier essai où seul l'Ultra-Turrax est utilisé, l'analyse statistique singularise le PEG qui réduit significativement le niveau de la population extraite (tableau IV-16).

#### IV.6.2.2.4. Influence de la vitesse et de la durée de centrifugation

Trois essais sont réalisés pour estimer, après broyage du sol, l'influence de la vitesse et de la durée de centrifugation pour séparer les bactéries des particules de sol.

La comparaison des rendements d'extraction des bactéries du sol en fonction de la durée (5 ou 10 min) ou de la vitesse de centrifugation (500 ou 1000 tr/min) montre qu'il n'y a pas de différence significative.

Cependant, une centrifugation à basse vitesse permet d'augmenter significativement le nombre de bactéries extraites, sauf pour la souche A où lors du second essai il y a alors une réduction significative. En revanche, une centrifugation à 13000 tr/min après une première centrifugation à basse vitesse ne modifie pas significativement le rendement d'extraction des bactéries (tableau IV-17).

#### IV.6.2.2.5. Influence du Nycodenz

L'utilisation du Nycodenz permet, après un broyage du sol, de séparer efficacement les bactéries des particules de sol. L'analyse de variance révèle l'absence de différence significative entre les souches mais montre une différence significative entre une centrifugation de 20 min et une centrifugation de 60 min, la première durée étant plus efficace (tableau IV-18).

**Tableau IV-19. Comparaison de l'efficacité des protocoles d'extraction indirecte d'ADN utilisés pour la détection par PCR de *R. solanacearum*, en fonction du type de sol et de la concentration d'inoculum.**

Protocole d'extraction d'ADN adapté de :	Sol brun			Sol ferrallitique			Andosol			Vertisol		
	Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>4</sup> *	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
Ito <i>et al.</i> (1998)	- †	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ BSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ P32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Volossiuk <i>et al.</i> (1995)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ BSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ P32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Porteous <i>et al.</i> (1997)	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	(+)
+ BSA	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
+ P32	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Kuske <i>et al.</i> (1998)	-	-	(+)	-	-	-	-	-	+	-	-	(+)
+ BSA	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
+ P32	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Jacobsen (1995)	+	+	+	-	-	(+)	(+)/-	(+)/-	+	-	-	-
+ BSA	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
+ P32	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
kit QIAamp	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+ BSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+ P32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* : trois répétitions sont effectuées pour chaque dose d'inoculum.

† : + : signal d'amplification d'intensité forte; (+) : signal d'amplification d'intensité faible; - : aucun signal d'amplification.

Les résultats appliqués à l'extraction des bactéries du sol conduisent à un taux d'extraction variant entre 10 et 90 %, mais pour la plupart, il se situe entre 30 et 50 %.

#### IV.6.2.3. Comparaison de l'efficacité de méthodes d'extraction indirecte d'ADN et d'additifs PCR pour la détection de *R. solanacearum* dans le sol

Afin de se rendre compte si la mise en oeuvre d'une méthode d'extraction d'ADN plus ou moins longue est nécessaire pour permettre la détection de *R. solanacearum* dans un sol, nous avons tout d'abord tenté d'appliquer la PCR directement après dispersion du sol puis récupération des bactéries soit par une centrifugation à basse vitesse soit par l'utilisation d'un gradient de Nycodenz, les bactéries étant par la suite lysées par choc thermique pour libérer l'ADN.

Il s'avère qu'il est impossible de détecter la présence de *R. solanacearum*, quelle que soit sa concentration d'inoculum, dans le sol lorsque les bactéries sont récupérées à l'issue d'une centrifugation à basse vitesse. L'utilisation d'additifs PCR comme la BSA ou la P<sub>32</sub> n'a aucun effet sur l'amplification. En revanche, si les bactéries sont récupérées sur gradient de Nycodenz, une amplification peut être obtenue. Une centrifugation supplémentaire à 13000 tr/min de l'anneau bactérien prélevé sur le gradient de Nycodenz, assurant une séparation des bactéries du Nycodenz, est cependant requise pour permettre l'obtention d'un signal d'amplification. L'intensité de ce signal est sensiblement améliorée par l'addition de BSA ou de P<sub>32</sub> (à 500 ng/ $\mu$ L) au mélange réactionnel PCR (figure IV-14).

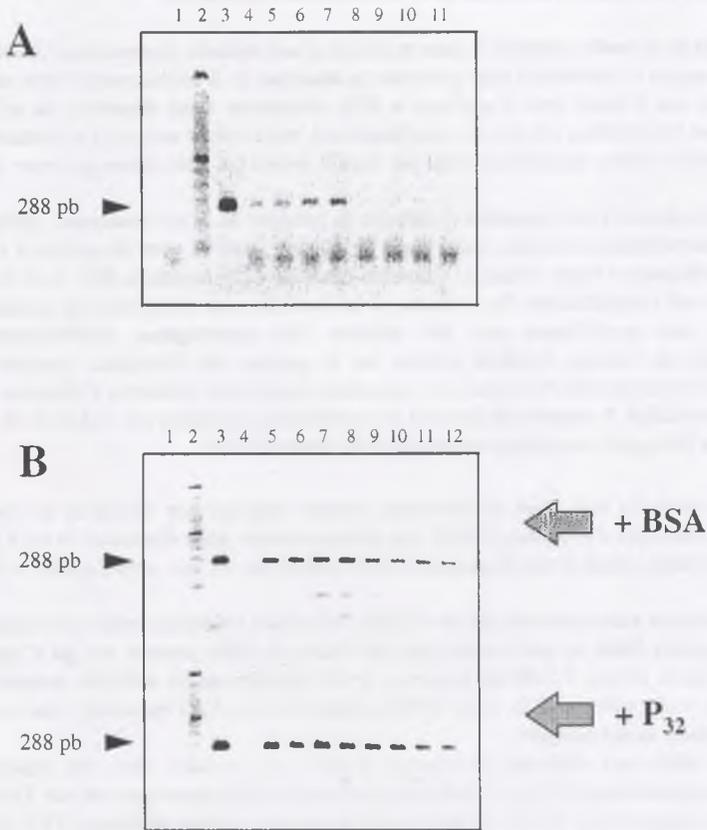
En raison du coût élevé du Nycodenz rendant utopique son utilisation en routine, différentes méthodes d'extraction d'ADN sont mises en oeuvre après dispersion du sol à l'aide de l'Ultra-Turrax suivie d'une récupération des bactéries du sol par centrifugation à basse vitesse.

Comparée à une extraction directe d'ADN, l'extraction indirecte conduit à un rendement d'extraction plus faible, ce qui se traduit par des bandes de faible intensité sur gel d'agarose, très faible même lorsque l'ADN est extrait par le kit QIAamp ou les méthodes adaptées de Volossiouk *et al.* (1995) et d'Ito *et al.*, (1998). Cependant, ces ADN présentent une couleur brune nettement moins marquée.

Les différentes méthodes d'extraction d'ADN sont évaluées pour leur capacité à permettre la détection par PCR de *R. solanacearum* inoculé à différents types de sol. De plus, différentes concentrations de BSA et de P<sub>32</sub> sont ajoutées au mélange réactionnel PCR et leur capacité à améliorer la détection est également évaluée. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau IV-19.

Les protocoles d'extraction d'ADN adapté de Volossiouk *et al.* (1995) et d'Ito *et al.* (1998) ne permettent pas l'obtention d'un signal d'amplification quelle que soit la concentration d'inoculum et quel que soit le type de sol. L'addition de BSA ou de P<sub>32</sub> au mélange PCR n'a, de plus, aucun effet quelle que soit la concentration de l'additif.

En revanche, les autres méthodes d'extraction autorise la détection de *R. solanacearum* dans le sol mais l'efficacité des méthodes apparaît variable selon le type de sol.



**Figure IV-14. Influence de l'ajout de BSA ou de P<sub>32</sub> (500 ng/μL) sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche A), inoculé à 10<sup>8</sup> ufc/mL à un échantillon de sol, après extraction des bactéries sur gradient de Nycodenz.**

(A) Piste 1 : témoin négatif; piste 2 : marqueur de taille (100 pb-BRL); piste 3 : témoin positif; pistes 4 à 7 : anneau bactérien centrifugé à 13000 tr/min; pistes 8 à 11 : anneau bactérien non centrifugé.

(B) Piste 1 : témoin négatif; piste 2 : marqueur de taille (100 pb-BRL); piste 3 : témoin positif; piste 4 : piste vide; pistes 5 à 8 : anneau bactérien centrifugé à 13000 tr/min; pistes 9 à 12 : anneau bactérien non centrifugé.

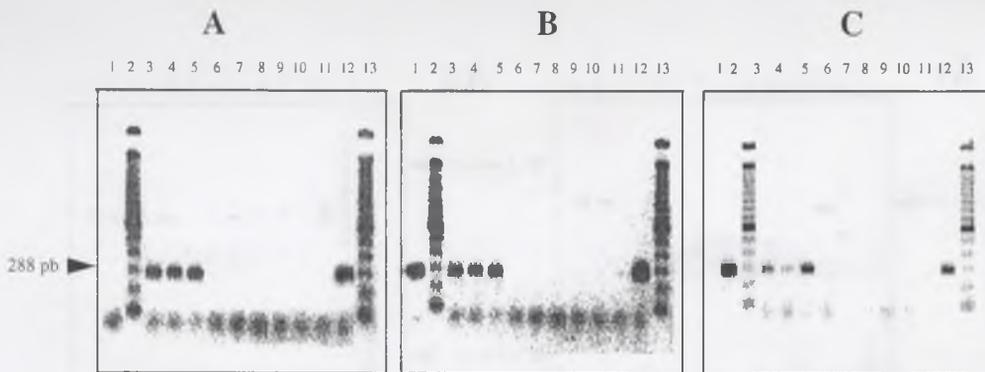


Figure IV-15. Détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche C), inoculé à un échantillon de sol brun, après extraction d'ADN selon le protocole du kit QIAamp de Qiagen (A), de Porteous *et al.* (1997) (B) et de Kuske *et al.* (1998) (C).

Piste 1, témoin négatif (A), témoin positif (B et C); pistes 2 et 13, marqueur de taille (100 pb-BRL); pistes 3 à 5, inoculation à  $10^8$  ufc/mL; pistes 6 à 8, inoculation à  $10^6$  ufc/mL; pistes 9 à 11, inoculation à  $10^4$  ufc/mL; piste 12, suspension bactérienne à  $10^8$  ufc/mL non inoculée au sol.

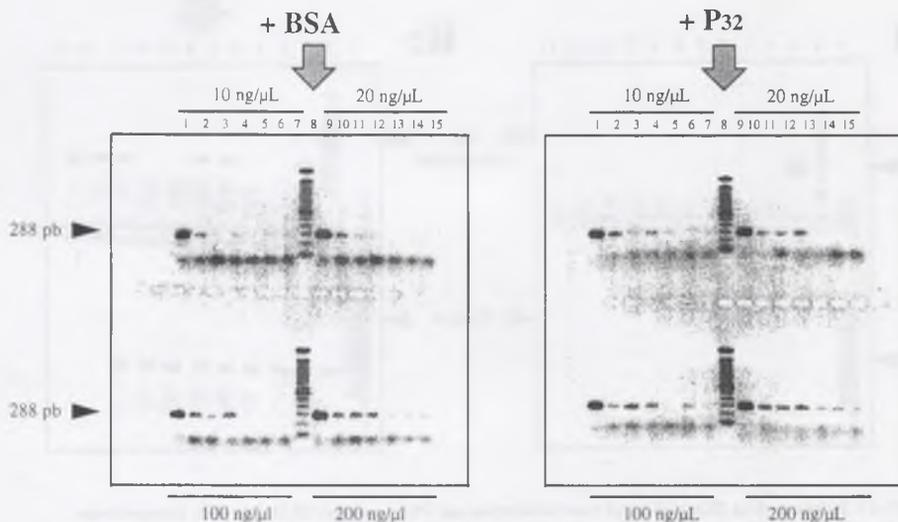
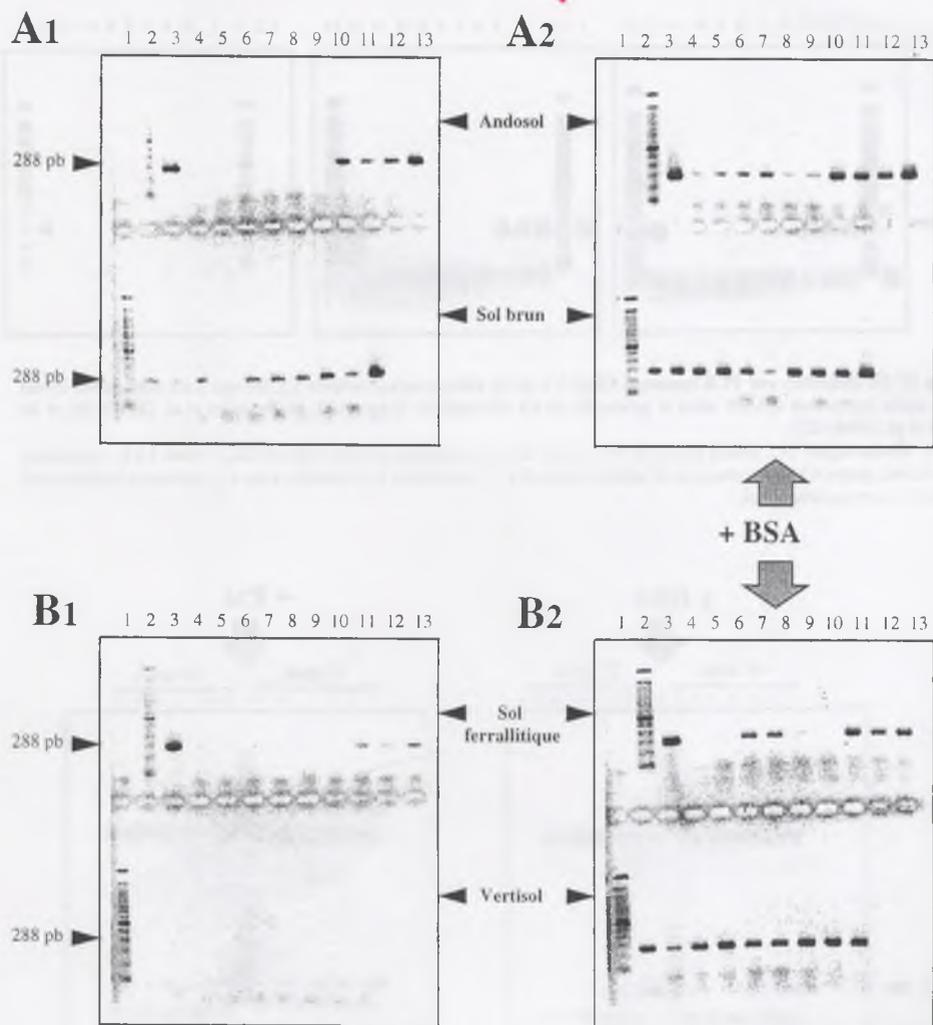


Figure IV-16. Influence de différentes concentrations de BSA et de P32 sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche C), inoculé à un échantillon de sol brun, après extraction d'ADN selon le protocole de Porteous *et al.* (1997).

Pistes 1 et 9, inoculation à  $10^8$  ufc/mL; pistes 2 à 4 et pistes 10 à 12, inoculation à  $10^6$  ufc/mL; pistes 5 à 7 et pistes 13 à 15, inoculation à  $10^4$  ufc/mL; piste 8, marqueur de taille (100 pb-BRL).



**Figure IV-17. Influence de la BSA (500 ng/ $\mu$ L) sur la détection par PCR (amorces OLI1-Y2) de *R. solanacearum* (souche A) selon la concentration d'inoculum et le type de sol après extraction d'ADN à l'aide des microbilles magnétiques (Jacobsen, 1995).**

(A1, A2, B1, B2- haut du gel) Piste 1 : témoin négatif; piste 2 : marqueur de taille (100 pb-BRL); piste 3 : témoin positif; pistes 4 à 6 : inoculation à  $10^4$  ufc/mL; pistes 7 à 9 : inoculation à  $10^6$  ufc/mL; pistes 10 à 12 : inoculation à  $10^8$  ufc/mL; piste 13 : suspension bactérienne à  $10^8$  ufc/mL.

(A1, A2, B1, B2- bas du gel) Piste 1 : marqueur de taille (100 pb-BRL); piste 2 à 4 : inoculation à  $10^4$  ufc/mL; pistes 5 à 7 : inoculation à  $10^6$  ufc/mL; pistes 8 à 10 : inoculation à  $10^8$  ufc/mL; piste 11 : suspension bactérienne à  $10^8$  ufc/mL.

- A partir du sol brun

Les protocoles faisant appel au kit QIAamp ou adaptés de Porteous et al. (1997) ou de Kuske et al. (1998) permettent d'obtenir un signal d'amplification pour la concentration d'inoculum la plus forte, c'est à dire  $10^8$  ufc/mL (figure IV-15). Cependant, le protocole de Kuske et al. (1998) conduit à l'obtention d'un signal de plus faible intensité que celui généré par les deux autres méthodes. En revanche, pour les concentrations d'inoculum de  $10^4$  et  $10^6$  ufc/mL, aucun signal d'amplification n'est détecté. Le protocole utilisant les micro-billes magnétiques (Jacobsen, 1995) s'avère très efficace car il permet d'obtenir des signaux pour toutes les concentrations d'inoculum avec une intensité supérieure à celle des trois autres protocoles (figure IV-17). Quel que soit le protocole d'extraction, l'intensité des signaux est proportionnelle à la concentration d'inoculum.

Les additifs BSA ou  $P_{32}$  ajoutés au mélange réactionnel augmentent l'intensité du signal d'amplification. Cet accroissement est fonction de la concentration des additifs et à 200 ng/ $\mu$ L des signaux d'amplification sont obtenus pour toutes les concentrations d'inoculum, quel que soit le protocole d'extraction (figure IV-16).

- A partir du sol ferrallitique

Les méthodes d'extraction de Porteous et al. (1997), Kuske et al. (1998) ne permettent pas la détection de *R. solanacearum*, quelle que soit la dose d'inoculum. L'utilisation des micro-billes magnétiques ne conduit à un signal d'amplification, de faible intensité, que si l'inoculum bactérien est de  $10^8$  ufc/mL. Seul le kit QIAamp est réellement efficace puisqu'il autorise la détection pour toutes les concentrations d'inoculum essayées.

L'ajout de  $P_{32}$  apparaît sans effet sur l'amplification. En revanche, l'utilisation de la BSA à 500 ng/ $\mu$ L permet d'augmenter sensiblement l'intensité du signal mais ne permet pas d'abaisser le seuil de détection, sauf pour le protocole de Jacobsen (1995) où le seuil de détection peut être abaissé à  $10^4$  ufc/mL (figure IV-17).

- A partir de l'andosol

L'application des protocoles de Porteous et al. (1997) et de Kuske et al. (1998) conduit à l'obtention d'un amplifiat respectivement pour les deux plus fortes doses et la plus forte dose d'inoculum. En revanche, le protocole de Jacobsen (1995) et l'utilisation du kit QIAamp se révèlent plus efficaces car ils peuvent permettre l'obtention d'un signal d'amplification pour toutes les doses d'inoculum, l'intensité du signal augmentant avec la concentration de l'inoculum.

L'utilisation de la BSA à 200 ng/ $\mu$ L ne permet pas d'accroître l'intensité des bandes d'amplification, mais à une concentration de 500 ng/ $\mu$ L, l'intensité du signal d'amplification est nettement améliorée. L'addition de  $P_{32}$  à 200 ng/ $\mu$ L suffit pour obtenir des bandes d'amplification très intenses. Toutefois, l'action de ces additifs n'est pas observée dans le cas des ADN extraits par les méthodes de Porteous et al. (1997) et de Kuske et al. (1998).

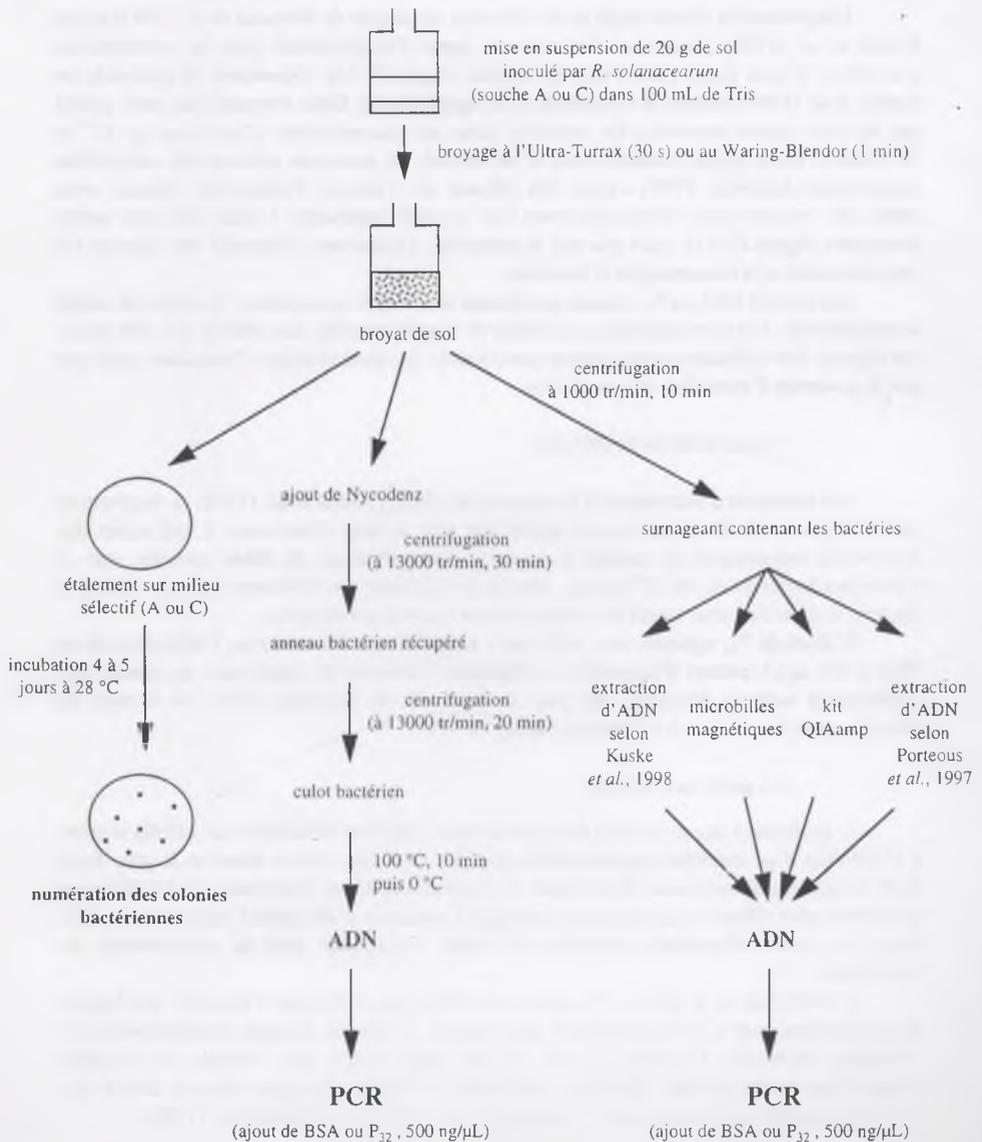


Figure IV-18. Méthodes permettant la détection efficace de *R. solanacearum* (souche A ou C) dans le sol.

- A partir du vertisol

L'emploi de micro-billes magnétiques (Jacobsen, 1995) paraît inopérant sur ce type de sol car aucun signal n'est obtenu. Les méthodes d'extraction de Kuske *et al.* (1998), de Porteous *et al.* (1997) ne donnent qu'une faible amplification et seulement avec la concentration d'inoculum la plus élevée. En revanche, le kit QIAamp permet la détection de *R. solanacearum*, quelle que soit la dose d'inoculum.

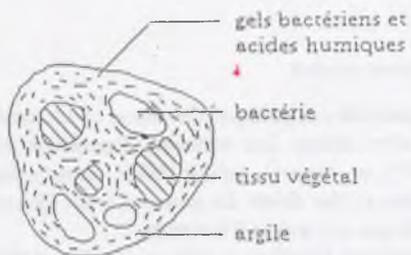
Comme pour l'andosol, l'addition au mélange réactionnel PCR de BSA à 200 ng/μL est sans effet sur la qualité de l'amplification alors qu'à 500 ng/μL une amélioration nette est observée. L'effet de l'ajout de BSA est particulièrement marqué dans le cas des ADN extraits à l'aide des micro-billes magnétiques (figure IV-17). L'addition de P<sub>32</sub> à 200 ng/μL permet également d'augmenter sensiblement l'intensité des signaux d'amplification. Cependant, l'emploi de ces additifs ne permet pas d'abaisser le seuil de détection dans le cas des ADN extraits par les méthodes de Porteous *et al.* (1997) et de Kuske *et al.* (1998).

Les protocoles des méthodes assurant une détection de *R. solanacearum* dans le sol sont schématisés dans la figure IV-18.

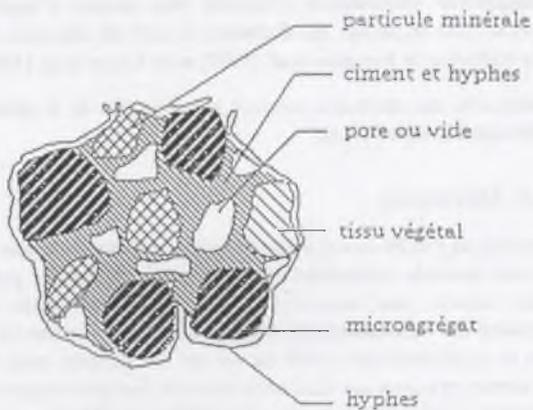
### IV.6.3. Discussion

L'extraction de l'ADN du sol, étape clé avant l'application d'une amplification par PCR ou de toute autre méthode moléculaire (dot-blot, southern-blot,...), peut être effectuée selon deux approches : directe, sans extraction préalable des bactéries du sol, et indirecte, avec extraction préalable des bactéries du sol. De très nombreuses méthodes directes ou indirectes d'extraction et de purification de l'ADN du sol ont été publiées mais beaucoup d'entre elles sont lourdes à mettre en oeuvre car elles nécessitent de multiples étapes avant l'obtention d'un ADN suffisamment purifié pour permettre l'amplification. En effet, l'extraction de l'ADN du sol résulte toujours en une coextraction d'acides humiques, fulviques et argiles, éléments connus pour leurs effets inhibiteurs sur la réaction d'amplification. L'objectif est d'essayer de développer une méthode capable d'obtenir un bon rendement d'une part et de réduire l'interférence des éléments inhibiteurs d'autre part. Nous avons donc évalué différents protocoles, selon une approche directe ou indirecte, pour leur capacité à détecter par PCR la présence de *R. solanacearum* dans différents types de sol.

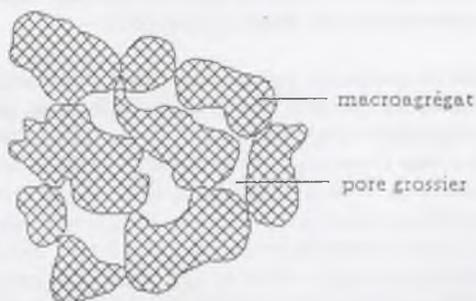
L'ensemble des protocoles appliqués conduit à l'extraction d'ADN excepté celui de Jacobsen (1995) selon une approche directe, les particules de sol gênant la bonne récupération des micro-billes magnétiques ayant capturé l'ADN. Des différences de rendement d'extraction sont toutefois observées. L'extraction directe de l'ADN du sol comparée à l'extraction indirecte permet l'obtention d'un meilleur rendement d'ADN, ce qui est logique puisque l'ADN provenant d'une extraction directe est en fait un mélange d'ADN issus de cellules eucaryotes ou procaryotes et d'ADN extracellulaires alors que seul l'ADN bactérien est extrait par l'autre méthode. En revanche, ce meilleur rendement d'extraction est accompagné par une diminution de la pureté de l'ADN car des quantités plus importantes de particules humiques ou d'argiles du sol sont également coextraites, ce qui confirme les résultats d'autres équipes (Ogram *et al.*, 1987; Steffan *et al.*, 1988; Leff *et al.*, 1995; Nesme *et al.*, 1995b). La présence de ces contaminants est confirmée par une couleur brune des culots d'ADN extraits. L'action du PVPP, connu pour son



Microagrégat  
( $d < 50 \mu m$ )



Macroagrégat  
( $d > 250 \mu m$ )



Structure construite

Figure IV-19. Schéma d'une structure construite de sol (adapté de Bruckert, 1979).

aptitude à adsorber les acides humiques (Holben *et al.*, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Young *et al.*, 1993; Wilson, 1997), semble pourtant réelle puisque sans son utilisation la couleur brune des culots d'ADN est encore plus intense, mais il est clair que son action n'est pas suffisante. En effet, cette coextraction a un effet direct sur l'amplification par PCR puisque parmi les méthodes d'extraction d'ADN essayées seule l'application du kit QIAamp permet l'obtention d'un amplifiat, mais uniquement dans deux types de sol et dans le cas de fortes doses d'inoculum ( $10^8$  ufc/mL). Cependant, il est malgré tout possible de surmonter cette inhibition d'amplification par une étape supplémentaire de purification de l'ADN. L'ADN purifié peut alors permettre l'application mais cette étape supplémentaire de purification se traduit par des pertes d'ADN très importantes, ainsi seules des concentrations fortes de *R. solanacearum*, supérieures ou égales à  $10^8$  ufc/mL peuvent être détectées. Ce résultat est similaire à celui obtenu par Ito *et al.* (1998) pour la détection de *R. solanacearum*. D'autres méthodes de purification de l'ADN extrait du sol ont été utilisées avec succès, telles que le gradient de chlorure de césium en présence de bromure d'éthidium (Jacobsen & Rasmussen, 1992) les minicolonnes de centrifugation de type Elutip (Tsai & Olson, 1991; Picard *et al.*, 1992; Nesme *et al.*, 1995b) ou Sephadex (Nesme *et al.*, 1995b; Kuske *et al.*, 1998) mais ces méthodes conduisent également à des pertes importantes d'ADN ce qui a pour effet de diminuer la sensibilité de la détection d'ADN par PCR.

L'extraction indirecte de l'ADN implique une extraction préalable des bactéries du sol. Deux étapes sont considérées pour extraire les bactéries du sol : la dispersion du sol d'une part et la séparation des cellules bactériennes des particules de sol d'autre part.

Un sol contenant de l'argile (entre 30 à 60 %) et des particules organiques, telles que les acides humiques, représente généralement une structure construite formée d'agrégats stables ou macro-agrégats, issus eux-mêmes de l'association de micro-agrégats (figure IV-19). Les cellules microbiennes peuvent être localisées soit entre les micro-agrégats du sol soit à la surface des agrégats en y adhérant par de nombreux mécanismes opérant simultanément (répulsion électrostatique, forces attractives telles les forces de van der Waals, ...) (Marshall, 1975; Moreau, 1993; Bakken & Lindahl, 1995). De plus, les exopolysaccharides sont grandement impliqués dans l'établissement de liaisons fortes entre les bactéries et les particules de sol (incluant les argiles), et dans l'agrégation du sol (Marshall, 1975; Allison & Sutherland, 1987; Martens & Frankenberger, 1992; Chenu, 1993; Moreau, 1993). Une dispersion maximale du sol est donc essentielle pour libérer les bactéries emprisonnées dans les micro-agrégats et dissocier les bactéries des particules de sol. La dispersion du sol peut être effectuée par des techniques physique ou chimique ou par une combinaison des deux (Bakken & Lindahl, 1995; Lindahl, 1996). L'utilisation du Waring Blendor, méthode la plus fréquemment employée, ou de l'Ultra-Turrax pour la dispersion physique du sol donne des taux d'extraction de *R. solanacearum* équivalents de l'ordre de 30 à 50 %. Ces taux d'extraction sont similaires à ceux obtenus par d'autres auteurs (Crozat & Cleyet-Marel, 1984; Ramsay, 1984; MacDonald, 1986; Steffan *et al.*, 1988; Lindahl & Bakken, 1995). Aucune des méthodes ne permet de récupérer la totalité des bactéries d'un sol même lorsque celui est inoculé artificiellement, une forte proportion de bactéries restant adsorbée à la surface des particules de sol et en particulier des argiles. L'augmentation de la durée ou du nombre de broyages, pourtant recommandée par Lindahl (1996) pour améliorer le rendement d'extraction, n'a pas d'effet sur l'extraction de *R. solanacearum* du sol. Finalement, nous avons choisi d'utiliser l'Ultra-Turrax dans nos expériences ultérieures car il est plus simple d'emploi que le Waring Blendor. Une autre

méthode fréquemment utilisée intègre l'emploi des ultra-sons pour rompre les agrégats de sol mais en raison des risques importants de lyse des bactéries, risque non observé dans le cas d'utilisation du Waring Blendor (Trevors, 1992; Lindahl & Bakken, 1995), nous n'avons pas retenu cette méthode. Afin d'effectuer une dispersion plus efficace, différents éléments sont utilisables en particulier pour disperser les polymères extracellulaires impliqués dans l'adhésion des bactéries aux surfaces offertes par les particules de sol (Bakken & Lindahl, 1995; Lindahl, 1996). Nous avons choisi, pour mettre en suspension les échantillons de sol, le tampon Tris car il a été montré qu'il s'agit d'un bon extractant des populations bactériennes naturelles du sol (Ramsay, 1984). Nos résultats révèlent que le volume de Tris employé n'a pas d'influence sur le rendement d'extraction et finalement nous avons choisi 100 mL, pour 20 g de sol, comme volume standard dans nos expériences. En outre, l'utilisation de détergents tels que le Tween 80, le triton X-100 et le PEG, pourtant rapportés comme efficaces (Bakken, 1985; MacDonald, 1986; Herron & Wellington, 1990; Jacobsen & Rasmussen, 1992; Reid & Schafer, 1999), ne permettent pas d'améliorer significativement le rendement d'extraction de *R. solanacearum* des échantillons de sol. Cependant, nos résultats confortent ceux de Lindahl et Bakken (1995) qui n'ont mis en évidence aucune amélioration. Par ailleurs, certains auteurs préconisent l'emploi de résines échangeuses d'ions de type Dowex A1 (MacDonald, 1986) ou Chélex 100 (Herron & Wellington, 1990; Jacobsen & Rasmussen, 1992) alors que d'autres montrent qu'elles n'ont aucun effet sur le rendement d'extraction (Lindahl & Bakken, 1995). L'utilisation de flocculants,  $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{MgCO}_3$  par exemple, est également parfois recommandée pour éliminer les particules argileuses et humiques mais le risque de perte de bactéries est important en raison de l'adsorption des bactéries sur ces particules en particulier dans le cas des sols tropicaux (Crozat & Cleyet-Marel, 1984; Bakken & Lindahl, 1995). Il est clair à l'issue de ces résultats qu'il n'existe pas de protocole universel d'extraction des bactéries du sol et que les caractéristiques physico-chimiques et biologiques propres à chaque type de sol sont probablement à l'origine des divergences observées.

Deux méthodes, la centrifugation à basse vitesse et le gradient de Nycodenz recommandé notamment par Bakken et Lindahl (1995) et Nesme (communication personnelle), sont comparées pour leur efficacité à séparer *R. solanacearum* des particules de sol après dispersion. La centrifugation à basse vitesse semble améliorer le rendement d'extraction des bactéries du sol. Ce résultat est à nuancer car même si le nombre de bactéries extraites apparaît significativement plus élevé après une centrifugation à basse vitesse, il est toutefois possible qu'en réalité il y ait une perte de bactéries par effet de gravité; la centrifugation, en éliminant les éléments du sol potentiellement inhibiteurs de la croissance bactérienne sur milieu de culture, peut entraîner une augmentation de l'estimation de la population bactérienne. Par ailleurs, il apparaît que les différentes vitesses (500 et 1000 tr/min) et durées (5 et 10 min) de centrifugation essayées n'ont pas d'effet sur la quantité de bactéries récupérées ce qui n'est pas le cas pour la séparation réalisée à l'aide du Nycodenz où une durée courte (20 min au lieu de 60 min) d'une centrifugation à 13000 tr/min améliore significativement la récupération des bactéries. Les deux méthodes offrent des rendements de récupération des bactéries équivalents mais leurs capacités à séparer efficacement les bactéries des particules du sol sont nettement différentes. En effet, la pureté des bactéries récupérées est grandement améliorée par la séparation sur gradient de densité. Cette différence de purification se traduit par la possibilité de détecter *R. solanacearum* par PCR directement après récupération des bactéries sur gradient de Nycodenz (suivie d'une lyse par choc thermique) ce qui n'est pas le cas après une centrifugation à basse vitesse et ce quelle que soit la concentration bactérienne inoculée au sol. Cependant, même si l'amplification

est possible, l'inhibition de l'amplification n'apparaît pas complètement levée car l'addition de BSA et de  $P_{32}$  au mélange réactionnel PCR engendre une augmentation sensible de l'intensité des signaux d'amplification obtenus. Cette levée d'inhibition apportée par l'utilisation de ces deux additifs confirme les résultats rapportés par d'autres équipes (Tebbe & Vahjen, 1993; Nesme *et al.*, 1995b; Kreader, 1996; McGregor *et al.*, 1996; Rosado *et al.*, 1996). Malgré son efficacité, le Nycodenz présente l'inconvénient d'un coût trop élevé rendant son utilisation en routine impossible.

L'application de méthodes d'extraction d'ADN après récupération des bactéries séparées d'une partie des particules de sol par centrifugation à basse vitesse permet la détection de *R. solanacearum* par PCR. En effet, bien que le rendement d'extraction d'ADN soit plus faible comparé à celui résultant d'une extraction directe, la séparation des cellules bactériennes précédant l'extraction de leur ADN réduit les problèmes des ADN contaminants extracellulaires ou d'origine eucaryotique, mais aussi des particules humiques ou d'argile interférant avec les réactions enzymatiques comme l'amplification par PCR (Holben *et al.*, 1988; Steffan *et al.*, 1988; Tebbe & Vahjen, 1993). L'action du PVPP assure une élimination complémentaire des acides humiques ce qui se traduit par l'obtention de culots d'ADN nettement plus clairs comparée aux culots issus d'une extraction directe. Toutefois cette action n'est pas suffisante pour lever les inhibitions d'amplification observées. Ce phénomène d'inhibition peut être surmonté par l'emploi d'additifs, la BSA ou la  $P_{32}$ , au mélange réactionnel PCR. Néanmoins, l'efficacité de ces additifs et des différents protocoles d'extraction d'ADN essayés est variable. L'ensemble des résultats obtenus indique une grande variabilité des éléments inhibiteurs de la PCR, tant au niveau qualitatif que quantitatif, selon le type de sol. Les protocoles de Volossiouk *et al.* (1995) et d'Ito *et al.* (1998) sont inopérants quel que soit le type de sol et même avec addition de BSA ou de  $P_{32}$  au mélange PCR. Les protocoles de Porteous *et al.* (1997) et de Kuske *et al.* (1998) permettent l'obtention d'un signal d'amplification mais uniquement lorsque les additifs PCR sont employés; en revanche, l'efficacité de ces additifs est nulle dans le cas du sol ferrallitique et faible dans le cas du vertisol. L'extraction d'ADN par utilisation des microbilles magnétiques (Jacobsen, 1995) apparaît plus efficace que les protocoles précédents car les signaux d'amplification sont plus intenses mais pour le sol ferrallitique, seules de fortes concentrations de *R. solanacearum* peuvent être détectées même en présence des additifs PCR. Cependant, l'efficacité variable des additifs PCR peut être attribuée au fait que, selon le type de sol, des quantités variables d'ADN non-cible (autres que celui de *R. solanacearum*) sont présentes. Nous avons pu constater que les quantités d'ADN détectées dans le sol ferrallitique et le vertisol sont plus importantes que dans l'andosol et surtout dans le sol brun. Il a été montré à de multiples reprises que le seuil de sensibilité peut être affecté par la quantité d'ADN non-cible présente dans les échantillons de sol (Picard *et al.*, 1992; Nesme *et al.*, 1995; Kuske *et al.*, 1998), ce qui peut justifier que les méthodes employées assurent plus facilement la détection de faibles niveaux de populations de *R. solanacearum* dans le cas du sol brun.

Enfin, l'utilisation du kit QIAamp est de loin la méthode la plus efficace en permettant, en combinaison avec la BSA ou le  $P_{32}$ , la détection de *R. solanacearum*, quelle que soit la concentration inoculée et quel que soit le type de sol. Enfin, pour vérifier l'efficacité de la méthode en conditions naturelles, nous l'avons utilisé pour détecter la présence de la bactérie dans la parcelle expérimentale « le vallon ». Cette tentative s'est révélée fructueuse, ce qui montre bien son intérêt dans la détection de *R. solanacearum* dans le sol.

## IV.7. Discussion générale

Afin d'optimiser l'efficacité des mesures de lutte pouvant être mises en oeuvre contre le flétrissement bactérien, il est indispensable de disposer d'outils de diagnostic performants. En effet, la maladie peut être contrôlée plus efficacement si l'épidémiologie de l'agent pathogène est précisée. En particulier, la détection dans le sol, la semence ou la plante est un élément décisionnel clé pour la gestion des cultures. Aussi, l'absence de la bactérie dans les eaux d'irrigation doit être vérifiée pour éviter toute introduction de la maladie, en particulier dans les cultures maraîchères gérées en hors sol.

Les critères requis pour un outil de diagnostic de qualité sont la spécificité, la sensibilité, la rapidité, la reproductibilité, la facilité de mise en oeuvre et le faible coût d'utilisation. Les outils les plus couramment employés dans les laboratoires pour le diagnostic du flétrissement bactérien sont les milieux de culture semi-sélectifs, les méthodes immunologiques telles que l'ELISA et l'immunofluorescence, et le test du pouvoir pathogène. Ils ne possèdent pas toutes les caractéristiques requises pour une identification et une détection efficaces (Seal, 1998a). Depuis les années 1990, les techniques de biologie moléculaire et en particulier la PCR se sont révélées être une nouvelle voie d'investigation très déterminante pour l'identification et la détection des bactéries phytopathogènes, et notamment de *R. solanacearum*.

Dans le cadre de nos recherches menées à la Réunion où cohabitent trois populations de *R. solanacearum* ayant des caractéristiques pathologiques et écologiques différentes, les outils PCR développés par Seal et ses collaborateurs (Seal *et al.*, 1992a; Seal *et al.*, 1992b; Seal *et al.*, 1993) nous ont semblé très intéressants à évaluer. Cependant, l'application de ces outils pour l'identification des populations réunionnaises de *R. solanacearum*, ne s'avère pas totalement satisfaisante. En effet, les amorces PS96H et PS96I spécifiques de l'espèce *R. solanacearum* (Seal *et al.*, 1992a) ne permettent pas l'obtention d'un signal d'amplification pour les souches de biovar 1 et seules les souches de biovars 2 et 3 sont reconnues. En outre, un manque de reproductibilité et de spécificité est observé lors de l'utilisation des amorces T3A-T5A devant assurer la discrimination des trois biovars présents à la Réunion (Seal *et al.*, 1992b). Enfin, le couple d'amorces OLI1-Y2 spécifique du groupe *R. solanacearum*/*P. syzygii*/BDB (Seal *et al.*, 1993) montre une spécificité parfois douteuse, déjà rapportée antérieurement (Caruso *et al.*, 1998; Seal, 1998b), ce qui implique une confirmation des résultats obtenus par l'emploi d'un autre outil de diagnostic. Néanmoins, comme cet outil est très rapide à mettre en oeuvre, très reproductible et d'une très bonne sensibilité, nous l'avons largement utilisé et il s'est révélé très utile dans nos travaux particulièrement lors de la phase de mise au point et d'adaptation de l'outil moléculaire à la détection de *R. solanacearum* dans des milieux comme la semence et le sol où sont présents de nombreux inhibiteurs de la réaction d'amplification.

Aucun autre outil PCR n'étant disponible, nous avons été amenés à rechercher des amorces permettant l'amplification spécifique des souches de *R. solanacearum* et la différenciation des trois biovars présents à la Réunion. L'exploration des gènes *hrp* s'est révélée être un choix pertinent puisque six couples d'amorces assurant l'amplification spécifique (à l'exception de deux taxons, *P. syzygii* et BDB, phylogénétiquement proches de

*R. solanacearum* mais localisés uniquement en Indonésie) et reproductible des souches de *R. solanacearum* ont pu être obtenus. A partir de là, la technique N-PCR a été appliquée afin de développer un outil très sensible capable de détecter de très faibles niveaux de populations de *R. solanacearum* et donc de mettre en évidence, le cas échéant, des infections latentes qui constituent une source majeure de dissémination de la maladie (Seal et Elphinstone, 1994). Par ailleurs, la digestion des produits d'amplification par une enzyme de restriction, *HindII*, (technique N-PCR-RFLP) peut y être associée afin d'autoriser une discrimination rapide (moins d'un jour) des trois populations de *R. solanacearum* existantes à la Réunion. La différenciation des trois biovars par l'outil moléculaire est une avancée importante car elle permet d'éviter l'application de la méthode traditionnelle de détermination des biovars (Hayward, 1964) nécessitant un délai d'obtention des résultats d'une à trois semaines. Cet outil, bien que mis au point sur les souches réunionnaises de *R. solanacearum*, garde tout son intérêt pour le diagnostic du flétrissement bactérien dans de nombreuses autres régions où soit une seule population de *R. solanacearum* est rapportée, c'est le cas des Etats-Unis (biovar 1) et de l'Europe de l'Ouest (biovar 2), soit plusieurs populations cohabitent, par exemple en Australie, Inde, Indonésie, Sri Lanka (biovar 2, 3 et 4) en Chine (biovars 2, 3, 4, et 5) et dans les Antilles Françaises (biovars 1 et 3). Cependant, ce outil ne permet pas la distinction des biovars 1 d'origine Américaine, 2 et N2 d'une part et des biovars 3 et 4 d'autre part. Un autre intérêt est que cet outil est capable de détecter la présence simultanée de plusieurs biovars dans une même plante, ce que nous avons pu observer suite à l'inoculation concomitante de plants de tomate par une souche de biovar 2 et une souche de biovar 3 de *R. solanacearum*.

L'outil moléculaire mis au point a été évalué pour l'efficacité à détecter les populations de *R. solanacearum* au sein des principaux réservoirs potentiels d'inoculum que sont la plante, l'eau, la semence et le sol. La fiabilité de cet outil pour la détection de *R. solanacearum* a tout d'abord été vérifié chez la plante par comparaison avec la mise en culture sur milieu semi-sélectif qui est la méthode de référence. La N-PCR et la détection sur milieu semi-sélectif s'avèrent être des méthodes très complémentaires. Les deux méthodes sont de sensibilité équivalente mais la N-PCR permet d'établir un diagnostic plus rapide et plus fiable, cependant elle est aussi plus coûteuse et ne permet pas de distinguer les cellules viables et non viables, ce qui peut entraîner une surestimation du potentiel d'inoculum. Enfin, il apparaît clairement que l'utilisation conjointe de la N-PCR et la culture sur milieu semi-sélectif constitue un excellent outil pour assurer un diagnostic fiable du flétrissement bactérien à partir d'échantillons de plantes. L'outil moléculaire validé sur un grand nombre d'échantillons de plantes appartenant à diverses espèces végétales a ensuite été adapté aux autres milieux (eau, semences et sol). L'obtention d'un outil moléculaire capable de détecter efficacement *R. solanacearum* dans ces milieux est d'un grand intérêt car l'isolement et la numération sur milieu gélosé sont le plus souvent inopérants en raison de la richesse et de la complexité de la flore bactérienne connexe (sol, semence) et/ou de très faibles concentrations de *R. solanacearum* (eau).

La principale difficulté rencontrée lors de l'application de l'outil moléculaire à la détection de *R. solanacearum* dans les échantillons biologiques est une inhibition de la réaction d'amplification qui réduit la sensibilité de la méthode de détection et/ou génère de faux résultats négatifs. La présence du phénomène d'inhibition requiert alors une étape préliminaire de préparation de l'échantillon, plus ou moins complexe selon le type d'échantillon, avant la mise en oeuvre de la PCR. Pour certains types d'échantillons, la préparation est très simple et

consiste en une macération des tissus des échantillons de plantes dans du tampon Tris ou en la combinaison d'une filtration et d'une centrifugation pour les échantillons d'eau; elle est ensuite suivie d'un choc thermique pour libérer l'ADN des cellules. Pour d'autres échantillons, la préparation est nettement plus laborieuse car elle nécessite l'élimination des éléments inhibiteurs de la PCR par extraction et/ou purification de l'ADN. Un certain nombre d'additifs aux tampons utilisés et aux mélanges réactionnels de la PCR, ayant une efficacité déjà rapportée dans la littérature, ont été essayés pour lever les phénomènes d'inhibition. Certains ont montré l'effet escompté mais d'autres n'ont aucune action. De plus, les produits montrent une efficacité variable selon le type d'échantillon. A titre d'exemple, la combinaison PVPP/BSA est très performante dans le cas des échantillons de plante même si son efficacité reste limitée pour les échantillons de géranium. Cette combinaison est également d'un grand intérêt pour les échantillons de sol bien qu'appliquée seule elle ne soit pas suffisante. En revanche, le PVPP se révèle totalement inefficace dans le cas des semences. Un autre exemple est celui de la P<sub>32</sub> qui permet d'améliorer nettement la sensibilité de la détection moléculaire dans des échantillons de sol ou de semences de tomate mais qui est inefficace dans le cas d'échantillons de semences d'aubergine.

Par ailleurs, deux méthodes d'extraction de l'ADN, l'une basée sur l'utilisation de mini-colonnes de centrifugation (kit QIAamp) pour purifier l'ADN et l'autre utilisant des microbilles magnétiques pour extraire l'ADN cible de l'ADN total et d'un milieu potentiellement inhibiteur, sont simples et rapides à mettre en oeuvre. Le kit QIAamp est efficace pour l'ensemble des échantillons quelle que soit leur origine et tout particulièrement dans le cas des broyats de graines et des échantillons de sol. En revanche, l'efficacité de la capture magnétique reposant sur des affinités nucléotidiques, technique originale et certainement plus spécifique et reproductible comparée à l'immuno-capture, est sans ambiguïté pour les échantillons d'eau, de sol et de macérats de graines mais demeure aléatoire pour les extraits de plantes et les broyats de graines. Il est probable que ce sont les très nombreuses particules présentes dans ces derniers milieux qui masquent les sites d'affinité des billes et empêchent alors la capture de l'ADN cible. Une clarification des milieux par décantation et/ou centrifugation et/ou filtration devrait permettre d'accroître significativement l'efficacité des microbilles magnétiques. Il est probable également qu'un aimant plus puissant permettrait de contourner cette difficulté.

L'ensemble des résultats souligne la grande variabilité des éléments inhibiteurs de la PCR, tant au niveau qualitatif que quantitatif, selon l'espèce végétale, l'âge et l'état physiologique de la plante, le type d'eau, l'origine des semences et le type de sol. Cette variabilité implique d'adapter le protocole expérimental à chaque type d'échantillon mais plusieurs procédures apparaissent applicables à chaque type d'échantillon. Toutefois, ces conclusions basées sur le résultat de nos recherches devront être confirmées sur un plus grand nombre d'échantillons. L'utilisation du kit QIAamp est probablement la méthode de préparation de l'échantillon la plus fiable mais il s'agit également de la méthode la plus coûteuse.

La mise au point d'un protocole assurant une détection certaine et efficace de *R. solanacearum* dans le sol constitue un des résultats majeurs de l'étude car jusqu'à présent la mise en culture ou l'utilisation de réactifs sérologiques plus ou moins spécifiques se sont révélés insuffisants, voire inopérants; les seules méthodes applicables étant qualitatives et peu sensibles car basées sur l'apparition de symptômes de flétrissement chez des plantes sensibles. Le protocole présente l'avantage d'être applicable à différents types de sol sans incidence sur l'efficacité de la détection. Le prochain objectif du laboratoire est d'adapter l'outil moléculaire à la quantification de l'inoculum par la méthode du « nombre le plus probable » (MPN) en association avec une détection par PCR, ce qui est essentiel pour pouvoir estimer des risques d'infection dans une parcelle. Une telle association MPN-PCR a déjà été appliquée avec succès pour énumérer *Agrobacterium tumefaciens* dans le sol (Picard *et al.*, 1992). D'autres méthodes de quantification basées sur la PCR existent, comme la PCR compétitive (Hu *et al.*, 1995; Möeller & Jansson, 1997), mais leur emploi n'est pas encore très développé. En effet, la quantification par PCR doit être employée avec prudence en particulier dans un milieu comme le sol où une grande variabilité de répartition des populations bactériennes existe (Johnson & Curl, 1972) et même si un très large échantillonnage est effectué, il peut être insuffisant car une forte proportion des bactéries du sol est probablement difficilement accessible, voire inaccessible en raison de fortes liaisons entre les cellules bactériennes et les particules du sol (Bakken & Lindahl, 1995). En outre, là encore, la préparation de l'échantillon ainsi que le nombre élevé de répétitions nécessaires à la quantification induisent une augmentation du coût déjà élevé d'utilisation de la PCR.

Le coût de la PCR est, à coup sûr, un frein à son utilisation en routine, particulièrement pour le diagnostic d'une maladie telle que le flétrissement bactérien qui est présent dans de nombreux pays en voie de développement. En effet, malgré les avantages de la technique PCR employée pour la détection de *R. solanacearum* (spécificité, sensibilité et rapidité), elle n'est pas encore devenue l'outil de diagnostic de choix de la majorité des laboratoires, à cause du coût des équipements requis et celui du fonctionnement (Seal, 1998a). De plus, cette technique requiert une solide expérience de la part des utilisateurs car elle est facilement affectée par des erreurs humaines. De légères déviations des optima de concentrations définis pour chaque constituant du mélange réactionnel conduisant à une perte importante de spécificité et de sensibilité. Néanmoins, on peut raisonnablement penser qu'à l'avenir la technique PCR, de par ses avantages conférés, connaîtra un développement encore plus considérable qu'actuellement et que son prix de revient diminuant significativement, elle pourra être utilisée en routine, en particulier pour les pays en voie de développement où le flétrissement bactérien demeure une contrainte économique majeure.

**V. BIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE DE  
*RALSTONIA SOLANACEARUM***

## V.1. Rôle de l'eau dans la survie et la dissémination de *R. solanacearum*

### Introduction

Puisque la maîtrise des réservoirs d'inoculum par une optimisation des mesures prophylactiques est l'axe fort du laboratoire, il était particulièrement important de tenter d'apporter des réponses aux questions concernant la biologie et l'épidémiologie de *R. solanacearum* associée à l'eau, la semence et le sol.

Même si l'eau est considérée comme un facteur clé de la dissémination de la bactérie, il nous semblait important de le confirmer. De plus, très peu d'études ont été réalisées sur l'aptitude de la bactérie à se conserver dans l'eau. Déterminer si l'eau est réellement un réservoir d'inoculum et une source de dissémination efficace est essentiel dans le contexte réunionnais, en particulier en relation avec le projet de basculement des eaux du versant Est de l'île, où la bactérie est présente, vers le versant Ouest où les cultures maraîchères sont appelées à se développer.

Le travail présenté est une approche expérimentale concernant trois aspects du rôle de l'eau : (i) la durée de survie de *R. solanacearum* dans une eau plus ou moins pure, (ii) la capacité d'une eau contaminée par *R. solanacearum* de transmettre le flétrissement bactérien et (iii) l'évaluation de l'efficacité de méthodes simples de désinfection d'une eau contaminée par *R. solanacearum*.

### V.1.1. Matériels et méthodes

#### V.1.1.1. Matériels

##### V.1.1.1.1. Souches bactériennes

La souche A, de biovar 3 (race 1) et la souche C, de biovar 2 (race 3), sélectionnées pour leur résistance naturelle à certains antibiotiques (Nicole, 1995), sont utilisées. Leur pouvoir pathogène, régulièrement vérifié, les situe dans la moyenne des souches sauvages de même biovar.

##### V.1.1.1.2. Types d'eau

Plusieurs types d'eau sont choisis pour ces expériences : une eau osmosée (eau d'irrigation déionisée au travers d'une membrane d'osmose), une eau de ville (eau d'irrigation filtrée), une eau d'irrigation prélevée dans un réservoir et une eau d'irrigation prélevée dans une galerie située en amont du réservoir.

##### V.1.1.1.3. Matériel végétal et dispositif expérimental

Des graines de tomate de variété Roma VF, variété sensible au flétrissement bactérien et la plus couramment cultivée sur l'île de la Réunion, sont semées dans des pots contenant un sol artificiel composé de 2/3 de terreau (Floradur B) et de 1/3 de tourbe (TKZ). Les pots sont

placés directement après semis (expérience au stade semis) ou après 15 jours (expérience au stade plantule; les plants sont alors repiqués) en chambre climatique à 30 °C et sous humidité relative de 90 à 95 % (planche 4). En outre, si nécessaire, des traitements (insecticide, fongicide et engrais) sont appliqués.

#### V.1.1.2. Méthodes

V.1.1.2.1. Etude de la durée de survie de *R. solanacearum* dans différents types d'eau

- Analyse de la qualité microbiologique initiale des eaux

Des prélèvements (cinq répétitions) sont effectués et étalés sur différents milieux de culture : milieu LPGA, milieu de Granada et Sequeira modifié, milieux sélectifs des souches A et C. Les boîtes de Petri sont mises à incuber à 28 °C durant trois à cinq jours.

- Préparation des échantillons

Pour chaque type d'eau, des réserves de 500 mL sont constituées. La souche A et la souche C de *R. solanacearum* y sont mises en suspension, séparément, à différentes concentrations :  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^7$  ufc/mL.

- Suivi des populations bactériennes

Des prélèvements d'eau sont effectués régulièrement afin de suivre la dynamique des populations bactériennes au cours du temps dans chaque type d'eau. Les réserves d'eau sont agitées à l'aide d'une plaque rotative pendant 30 min et trois échantillons de 1 mL sont prélevés dans chaque réserve. Chaque prélèvement est étalé trois fois (50 µL) sur milieux sélectifs (A ou C). Une numération des colonies bactériennes est réalisée après une période d'incubation de quatre à cinq jours à 28 °C.

V.1.1.2.2. Etude de la capacité de l'eau d'irrigation à disséminer *R. solanacearum*

Une première étape est de montrer qu'une eau d'irrigation artificiellement chargée en *R. solanacearum* peut être responsable du développement de flétrissement de plantes sensibles; une seconde, que des plants flétris peuvent être à l'origine de la contamination d'une eau et que cette eau utilisée pour irriguer des plants sensibles peut également engendrer des symptômes de flétrissement.

- Utilisation d'une eau artificiellement contaminée

La contamination des plants est réalisée soit au stade semis, avec l'une ou l'autre des souches A et C, soit au stade plantule de une à deux feuilles, avec la souche A.

L'irrigation quotidienne des plants est effectuée à l'aide d'une eau non filtrée et stockée dans un réservoir du laboratoire. Pour chacune des souches A et C, des réserves d'eau de 2,5 L



Planche 4. Vue du dispositif expérimental en chambre climatique.

sont constituées, contenant des concentrations bactériennes de  $10^3$ ,  $10^5$  ou  $10^8$  ufc/mL ainsi qu'une réserve d'eau témoin.

Pour chacune des deux souches et pour chaque stade cultural, quatre « parcelles » de 25 graines ou plants de tomate sont arrosées quotidiennement et pendant la première semaine avec chacun des types d'eau définis ci-dessus, puis jusqu'au terme de l'expérience avec une eau d'irrigation non contaminée artificiellement.

Pendant les jours suivant la contamination, le taux de germination est évalué régulièrement et l'évolution des symptômes de flétrissement est notée. Les plants présentant des symptômes de flétrissement sont récoltés pour y vérifier la présence de *R. solanacearum*. L'hypocotyle de la tige est sectionné, broyé et mis à macérer dans 5 mL de tampon Tris et le macérat ensemencé sur le milieu sélectif approprié. A l'issue de l'expérience, tous les plants (flétris ou non) sont récoltés, broyés et mis à macérer, et les macérats ensemencés sur milieux sélectifs.

Pendant la période d'irrigation avec de l'eau contaminée, des prélèvements de chaque type d'eau sont effectués quotidiennement et étalés sur les milieux sélectifs afin de suivre la dynamique de la population bactérienne et de pouvoir apprécier la contamination effectuée quotidiennement.

- Utilisation d'une eau naturellement contaminée

Cinq plants de tomate (variété Roma VF) âgés d'un mois, installés dans du terreau contenu dans des pots (un plant par pot), sont inoculés au niveau de la tige par la souche A de *R. solanacearum* (concentration  $10^8$  ufc/mL). Ces plants, ayant rapidement flétris, sont éliminés et un échantillon de chaque sol (200 g environ) est prélevé pour estimer la population de *R. solanacearum* dans chaque sol : environ 20 g de terreau sont mis en suspension dans 450 mL de tampon Tris puis broyés à l'aide de l'Ultra-Turrax (30 s à vitesse maximale 24000 tr/min); trois prélèvements sont alors ensemencés (50  $\mu$ L, trois répétitions) sur le milieu de culture spécifique de la souche A.

Un arrosage quotidien (un litre d'eau non contaminée) de chaque pot est effectué pendant une période d'environ un mois. Pour chaque sol, l'eau récupérée par percolation, environ 500 mL, sert alors à irriguer 50 plants de tomate (variété Roma VF) maintenus en chambre climatique à 30 °C. Un suivi des populations bactériennes dans le percolat est réalisé aux jours 1, 9, 16 et 35 par ensemencement du milieu sélectif A. De même, l'évolution des symptômes de flétrissement observés est notée régulièrement.

#### V.1.1.2.3. Mise en place d'un protocole de décontamination d'une eau d'irrigation chargée en *R. solanacearum*

Deux protocoles de décontamination sont comparés : le premier est un traitement de l'eau par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 12 degrés chlorométriques (°chl.), procédure habituelle de désinfection des eaux; le second est une filtration de l'eau contaminée afin d'en retenir la charge bactérienne.

Trois réserves d'eau de 200 mL sont préparées avec des concentrations différentes de la souche A :  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^7$  ufc/mL.

- Décontamination par une solution d'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 12 °chl.

Trois doses d'eau de javel à 12 °chl. sont comparées : 10, 20 et 30 ppm par litre d'eau traitée. Ces doses correspondent aux normes européennes régissant la potabilité d'une eau, la décontamination des eaux ne devant pas affecter en effet leur qualité. Chaque dose est appliquée à chaque suspension bactérienne, ce qui correspond à neuf combinaisons. Pour cela, 2, 4 et 6  $\mu\text{L}$ , correspondant respectivement aux doses de 10, 20 et 30 ppm d'eau de javel à 12 °chl., sont mélangés à 200 mL de chaque suspension bactérienne et la durée de contact est de 20, 45 ou 55 min.

Trois prélèvements de 1 mL de chaque eau traitée sont réalisés avant, puis 20, 45, 55 min après le mélange avec la solution d'eau de javel; 50  $\mu\text{L}$  (trois répétitions) de chaque prélèvement sont ensuite ensemencés sur le milieu de culture spécifique de la souche A.

- Décontamination par filtration

Les suspensions bactériennes (30 mL) sont décontaminées par filtration sous vide sur une membrane en nitrocellulose de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ ; trois répétitions sont effectuées pour chaque solution. Un prélèvement de 1 mL du filtrat récupéré est réalisé après chaque filtration et 50  $\mu\text{L}$  (trois répétitions) sont ensemencés sur le milieu de culture spécifique de la souche A.

#### V.1.1.2.3. Analyses statistiques des données

La comparaison des estimations des populations bactériennes est effectuée après une transformation logarithmique. La valeur nulle étant arbitraire, afin de pouvoir effectuer des analyses statistiques elle est remplacée par la valeur 10 ufc/mL correspondant à la moyenne de l'estimation variant entre 0 et la limite inférieure de détection, ici 20 ufc/mL, ce qui permet d'en prendre le logarithme.

Les taux de flétrissement et les taux de germination, qui sont des pourcentages, subissent une transformation de type  $y = \arcsin \sqrt{(x/100)}$  avant la mise en œuvre d'une analyse de variance.

Les analyses de variance ne sont réalisées sur les données que si les conditions requises sont remplies : homogénéité des variances et distribution normale des données. Elles sont suivies, le cas échéant, d'une comparaison des moyennes (méthode des ranges de Duncan). En cas d'impossibilité d'effectuer une analyse de variance, les données sont comparées par application d'une statistique d'ordre (test de Kramer).

Dans le cas de l'étude de l'évolution du taux de flétrissement ou des populations en fonction du temps, une modélisation est réalisée selon un modèle linéaire avec ou sans transformation préalable des données (courbe d'évolution de type sigmoïde).

Tableau V-1. Evolution du niveau de la population de *R. solanacearum* dans de l'eau maintenue à 20-25 °C, en fonction de la nature de l'eau, de la souche bactérienne et de la concentration initiale de l'inoculum.

Type d'eau	Jour après inoculation	Souche					
		A			C		
		Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	
Eau osmosée	0	1,33 *	5,39	6,18	2,96	4,85	6,93
	1	1,48	3,00	7,18	3,77	5,43	7,32
	4	1,52	2,45	7,17	2,67	4,78	7,21
	8	1,03	2,36	6,58	3,31	5,11	7,11
	11	1,06	1,13	7,02	4,17	4,48	7,18
	16	1,03	1,34	6,86	3,96	4,17	6,63
	24	2,46	3,18	6,00	2,83	2,36	5,05
	37	1,47	1,13	5,98	2,72	3,21	5,26
	51	1,17	2,19	5,63	1,90	3,30	5,30
	76	0,00 †	0,00	0,00	1,07	3,29	5,92
96	0,00	0,00	0,00	1,03	2,80	3,93	
Eau de ville	0	2,73	5,24	7,33	3,18	5,24	7,40
	1	3,28	4,59	5,02	2,22	3,58	5,33
	4	3,49	4,62	5,00	2,63	3,03	2,12
	8	3,18	3,36	3,38	3,38	3,12	4,54
	11	1,49	2,81	2,75	2,40	3,31	5,92
	16	2,35	3,29	3,52	2,92	2,61	6,04
	24	3,07	2,82	3,29	4,04	3,82	4,00
	37	2,68	3,88	4,17	3,00	2,41	2,92
	51	3,60	1,73	1,67	2,32	2,71	3,44
	76	0,00	2,90	1,22	1,65	2,55	2,86
96	0,00	0,00	0,00	0,00	1,20	1,12	
Eau d'irrigation (réservoir)	0	3,31	5,03	7,48	2,68	4,98	6,66
	1	2,43	4,75	7,33	2,87	5,02	7,02
	6	1,03	3,00	5,34	1,04	2,05	5,12
	9	1,07	3,00	4,00	0,00	5,35	7,16
	12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,11
Eau d'irrigation (galerie)	0	3,31	5,45	7,34	2,54	4,88	6,82
	1	1,85	4,12	7,42	2,43	4,31	6,21
	6	0,00	2,00	5,14	1,12	2,25	4,34
	9	0,00	2,03	4,00	0,00	4,16	5,16
	12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	1,23

\* : estimation des populations de *R. solanacearum* exprimée en valeur logarithmique.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

## V.1.2. Résultats

### V.1.2.1. Survie de *R. solanacearum* dans différents types d'eau

#### V.1.2.1.1. Qualité microbiologique des eaux utilisées

L'eau osmosée et l'eau de ville se révèlent stériles puisque aucune colonie n'est détectée sur les milieux de culture utilisés. En revanche, les eaux d'irrigation sont chargées de bactéries capables de se multiplier sur ces mêmes milieux (de 60 à 130 ufc/mL selon le prélèvement). Une identification sommaire montre qu'il s'agit essentiellement de bactéries coliformes, de streptocoques et de *Pseudomonas* sp.. Néanmoins, aucune de ces bactéries n'est capable de se multiplier sur les milieux sélectifs des souches A et C, ces milieux seront donc utilisés pour la suite de l'étude.

#### V.1.2.1.2. Durée de survie de *R. solanacearum* dans différents types d'eau

L'évolution des populations de *R. solanacearum* (souches A et C) dans différents types d'eau est évaluée à une température comprise entre 20 et 25 °C, température moyenne du laboratoire (tableau V-1). Quel que soit le type d'eau considéré, la population bactérienne y décroît plus ou moins rapidement. Deux types d'évolution peuvent être distingués : dans les eaux relativement pures (eau osmosée et eau de ville), la durée de survie de la bactérie dépasse plusieurs mois alors que dans les eaux d'irrigation, elle n'est que de quelques jours.

En effet, dans l'eau osmosée, les différentes populations de la souche A sont apparues relativement stables jusqu'à 51 jours d'incubation pour atteindre une valeur nulle à 76 jours, même pour la concentration initiale la plus élevée. Les populations de la souche C n'ont pas atteint ce seuil minimal même après 96 jours d'incubation, excepté pour la concentration initiale la plus faible.

Dans l'eau de ville, les populations des deux souches ont diminué régulièrement jusqu'à une disparition quasi totale des populations à 96 jours. Cependant, cette décroissance est apparue plus rapide pour la souche A que pour la souche C.

En revanche, dans les eaux d'irrigation du réservoir et de la galerie, toutes les populations ont diminué rapidement pour atteindre le niveau zéro entre 6 et 12 jours selon le niveau d'inoculum initial. Cette décroissance rapide a été accentuée à partir du sixième jour pour la souche A comme pour la souche C.

Afin de pouvoir effectuer des comparaisons statistiques pertinentes, l'évolution des populations dans chaque type d'eau est modélisée selon un modèle linéaire ou sigmoïde décroissant et c'est celui donnant les résultats les plus significatifs qui est retenu. Tous les ajustements effectués ont été significatifs comme l'indique le test de Student associé au coefficient de corrélation  $r^2$  (annexe 19).

Dans l'eau osmosée, la population de la souche C a diminué lentement à un taux significativement non différent de zéro selon la concentration bactérienne initiale. La durée maximum de survie estimée est comprise entre 125 et 239 jours et ne varie pas significativement en fonction de l'inoculum initial (figure V-1). En revanche, pour la souche A, aucune évolution significative n'est mise en évidence : le coefficient de régression n'est pas significativement différent de zéro. La souche A semble donc se maintenir de façon quasi

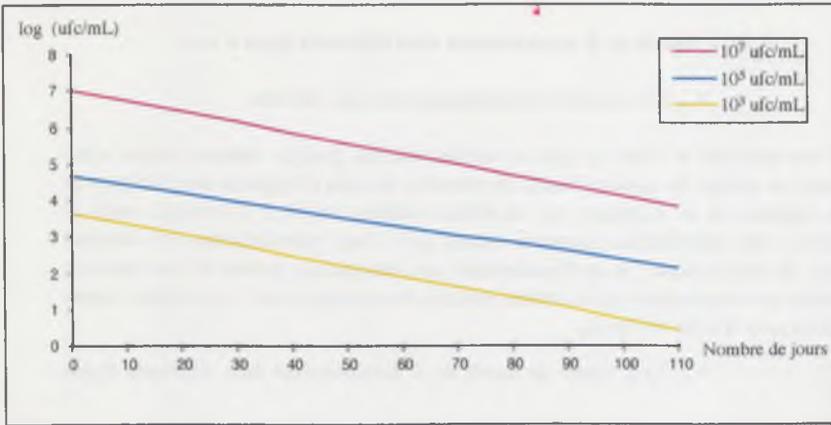


Figure V-1. Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau osmosée, en fonction du niveau d'inoculum initial (après modélisation).

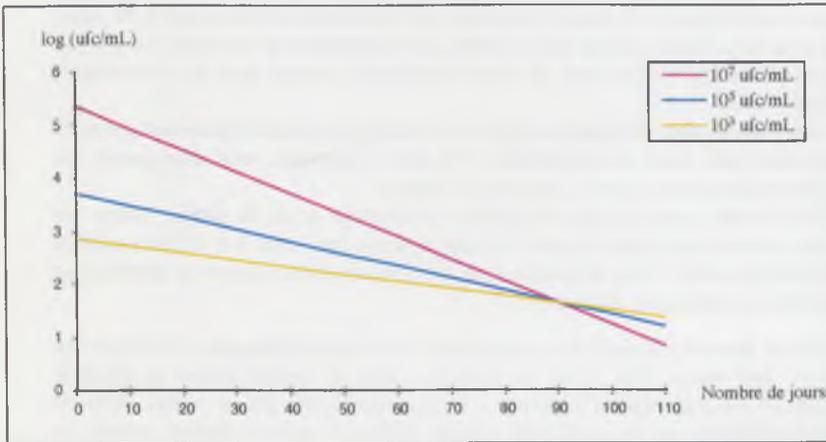


Figure V-2. Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau de ville, en fonction du niveau d'inoculum initial (après modélisation).

Tableau V-2. Evolution du niveau de la population de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction de la température, de la souche et de la concentration initiale de l'inoculum.

Type d'eau	Jour après inoculation	Souche					
		A			C		
		Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
		10 <sup>7</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>
Eau d'irrigation (20-25 °C)	0	3,53 *	5,44	7,91	3,23	5,04	8,13
	1	3,71	5,55	8,68	3,16	5,06	6,00
	2	4,06	5,69	8,87	2,89	3,00	6,06
	3	4,06	5,47	7,64	2,95	3,45	6,04
	4	4,14	5,60	6,95	2,44	4,52	7,85
	5	3,92	5,13	7,93	2,21	4,76	8,01
	7	3,96	5,17	7,92	1,80	3,97	7,86
	9	3,90	5,12	7,57	1,12	2,80	3,97
	11	1,64	3,45	3,06	0,00	0,00	4,40
	13	1,42	2,92	3,95	0,00	0,00	4,05
	15	0,00 †	0,00	0,00	0,00	0,00	3,21
	18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,67
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,62	
Eau d'irrigation (28 °C)	0	3,34	5,09	8,06	3,25	5,10	8,02
	1	2,81	4,66	8,12	3,17	4,22	6,06
	2	2,40	3,71	8,24	2,88	3,34	7,65
	3	2,06	3,21	8,32	2,84	4,35	8,00
	4	1,51	3,23	7,89	2,07	3,74	7,64
	5	1,15	2,50	6,14	1,76	4,22	7,43
	7	0,00	2,07	4,61	0,00	2,81	5,41
	9	0,00	0,00	4,56	0,00	2,06	3,26
	11	0,00	0,00	2,97	0,00	0,00	0,00
	13	0,00	0,00	2,76	0,00	0,00	0,00
	15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

\* : estimation des populations de *R. solanacearum* exprimée en valeur logarithmique.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

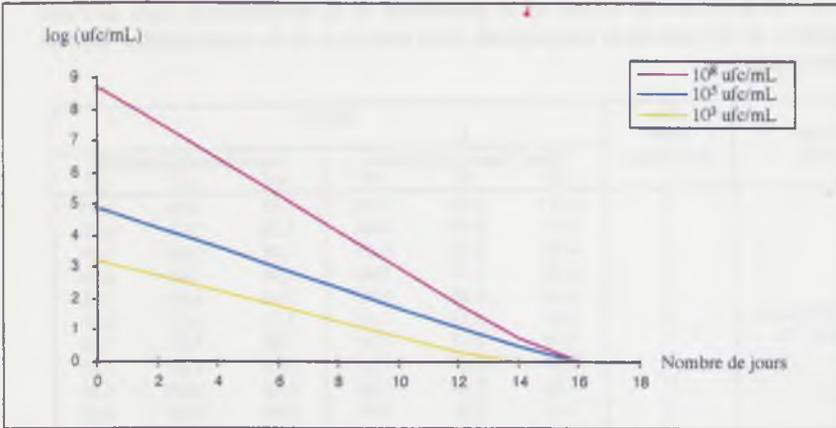


Figure V-3. Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction du niveau d'inoculum initial, à 20-25°C (après modélisation).

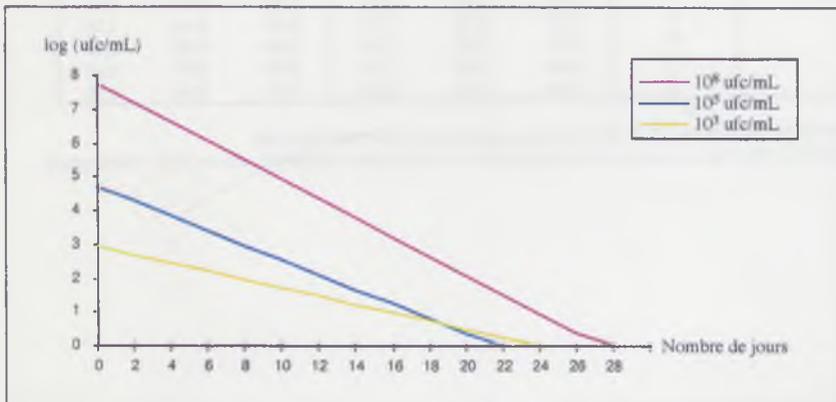


Figure V-4. Evolution des populations de la souche C de *R. solanacearum* dans de l'eau d'irrigation, en fonction du niveau d'inoculum initial, à 28°C (après modélisation).

infinie. Une analyse de variance des données tenant compte du facteur date révèle d'importantes variations au sein des données d'une même date, ce qui permet d'expliquer l'absence de différences significatives. Toutefois, si les données sont regroupées par "périodes", les variations sont atténuées et des différences significatives sont mises en évidence : le niveau de début est supérieur à celui de la fin d'expérience, ce qui indique une décroissance, quoique faible, des populations au cours du temps.

Dans l'eau de ville, le niveau des populations bactériennes diminue également mais à un taux faible. Les pentes des droites de régression ont une valeur toujours faible (figure V-2). La durée moyenne de survie est estimée à 130 jours pour la souche A et à 150 jours pour la souche C, mais les différences ne sont pas significatives. Cependant, la pente de la droite de régression relative à la concentration la plus élevée de la souche A est significativement supérieure à celle correspondant à la concentration la plus faible, la perte de charge bactérienne apparaît être fonction de la concentration initiale.

Les paramètres des droites de régression correspondant à la dynamique de la souche C dans l'eau osmosée et dans l'eau de ville, ne sont pas significativement différents.

Dans les eaux d'irrigation, la durée de survie de *R. solanacearum* est beaucoup plus courte, de deux à trois semaines. En effet, la durée de survie estimée de la souche A est comprise entre 14 et 16 jours indépendamment de la concentration initiale d'inoculum. Les pentes associées aux droites de régression sont en revanche différentes significativement selon la concentration initiale : les valeurs sont de -0,508 pour la concentration la plus forte, de -0,302 et -0,180 respectivement pour les deux autres concentrations, valeurs toutes significativement différentes. Pour la souche C, la durée de survie est estimée entre 16 et 18 jours et les pentes des droites ne sont pas significativement différentes selon la concentration initiale.

L'important écart de durée de survie des souches dans l'eau osmosée ou dans l'eau de ville d'une part, et dans l'eau d'irrigation d'autre part, nous conduit à tester un autre type d'eau d'irrigation.

Un nouvel échantillon d'eau d'irrigation est prélevé en amont de la distribution d'eau de ville filtrée précédemment testée. La charge bactériologique de cette eau est de 60 ufc/mL. La conservation des souches A et C est suivie dans cette nouvelle eau placée soit à 20-25 °C soit à 28 °C. Les niveaux d'inoculum initiaux comparés sont de  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^8$  ufc/mL.

L'élimination complète des populations intervient en moins de 21 jours (tableau V-2). Les populations de la souche A le sont au bout de 15 jours, quelle que soit la concentration initiale ou la température, sauf pour les deux concentrations les plus faibles placées à 20-25 °C pour lesquelles l'élimination est anticipée (sept à neuf jours). Les populations de la souche C sont éliminées au bout de 11 jours, à l'exception de la plus forte concentration placée à 28 °C pour laquelle la survie est de 21 jours. Dans toutes les situations, la baisse significative des populations n'intervient que pendant la deuxième semaine.

La modélisation de l'évolution permet d'estimer la durée de survie de la bactérie dans l'eau d'irrigation à 20 jours : de 16 à 18 jours à 20-25 °C et de 21 à 25 jours à 28 °C pour la souche A sans que les différences soient significatives. Si la durée de survie n'est pas affectée par la concentration initiale, en revanche la vitesse d'évolution en dépend. Pour la souche C, la durée de survie varie significativement selon la température, de 13 à 15 jours à 20-25 °C (figure V-3) contre 21 à 27 jours à 28 °C (figure V-4); et il en est de même de la vitesse d'évolution en particulier pour la concentration initiale la plus forte.

**Tableau V-3. Evolution du pourcentage de germination de graines de tomate après irrigation par une eau contaminée par *R. solanacearum*, en fonction de la souche et de la concentration bactérienne.**

Jour après inoculation	Témoins 1	Témoins 2	Souche					
			A			C		
			Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
			10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>
3	0	10	0	0	0	18	15	13
4	12	35	17	17	14	65	48	61
5	72	80	61	56	61	82	82	73
6	72	85	67	90	80	85	90	83
7	92	88	85	94	82	90	92	84
8	93	90	89	94	84	91	92	85
9	94	90	89	94	90	91	92	85
10	94	90	89	94	90	91	92	85

**Tableau V-4. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès le semis, par de l'eau contaminée par *R. solanacearum*, en fonction de la souche et de la concentration initiale de l'inoculum.**

Jour après inoculation	Souche					
	A			C		
	Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>
7	0	0	1	0	0	0
14	1	0	10	0	1	2
21	1	3	18	0	2	22
28	2	6	27	0	2	40
35	2	6	30	0	3	44
42	3	6	31	0	3	47
47	3	6	32*	1	4	54

\* : l'analyse des plants sans symptômes réalisée à J+48 révèle que neuf plants sont fortement contaminés par *R. solanacearum*.

**Tableau V-5. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, au stade jeune plantule, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum*, en fonction de la concentration initiale de l'inoculum.**

Jour après inoculation	Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup>
6	1	1	3
8	3	5	6
12	4	10	22
16	4	11	32
20	4	12	43
24	4	12	47
28	4	12*	49*

\* : l'analyse des plants sans symptômes réalisée à J+29 révèle que huit plants (10<sup>8</sup> ufc/mL) et neuf plants (10<sup>5</sup> ufc/mL) sont contaminés par *R. solanacearum*.

### V.1.2.2. Etude de la capacité de l'eau d'irrigation à disséminer *R. solanacearum*

#### V.1.2.2.1. Utilisation d'une eau artificiellement contaminée

##### • Contamination dès le semis

L'irrigation quotidienne des semis pendant sept jours avec une eau chargée artificiellement en *R. solanacearum* a apporté des quantités estimées à :  $5,6 \cdot 10^4$ ;  $1,9 \cdot 10^6$  et  $1,4 \cdot 10^9$  ufc pour la souche A, et  $4,7 \cdot 10^3$ ;  $3,0 \cdot 10^5$  et  $2,8 \cdot 10^8$  ufc pour la souche C.

Les taux de germination relatifs aux différents traitements ne sont pas significativement différents : 90 et 94 % pour les témoins et de 85 et 94 % pour les semis arrosés par les eaux contaminées par l'une ou l'autre souche (tableau V-3). En revanche, on constate que durant les cinq premiers jours, le taux de germination des graines arrosées par une eau contaminée par la souche A est significativement inférieur à celui des graines témoins et qu'à l'opposé celui des graines arrosées par une eau contaminée par la souche C est significativement supérieur.

Un flétrissement des plantules issues des semences est observé avec un taux faible même pour la concentration la plus élevée (respectivement 32 % et 54 % pour les souches A et C). Pour les autres concentrations, seules quelques plantules ont exprimé la maladie (tableau V-4).

Les premiers symptômes de flétrissement se sont manifestés sept jours après le semis dans le cas d'une contamination avec la souche A, et à partir du quatorzième jour pour la souche C, pour les concentrations les plus élevées. Des flétrissements sont apparus régulièrement pendant les 30 premiers jours, puis de façon plus sporadique jusqu'à atteindre des valeurs stables : 3, 6 et 32 % avec la souche A et 1, 4 et 54 % avec la souche C, respectivement pour les concentrations bactériennes initiales de  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^8$  ufc/mL. L'analyse des plants non flétris effectuée à la fin de la période d'observation ne permet pas de suspecter d'éventuels flétrissements tardifs, excepté pour la concentration la plus élevée de la souche A où neuf plants fortement contaminés par *R. solanacearum* ont été constatés (tableau V-4).

L'ajustement des données à une courbe de type sigmoïde (annexe 20) permet de comparer les paramètres d'évolution du flétrissement en fonction du temps et confirme les différences de vitesse d'évolution en fonction de la concentration bactérienne d'une même souche (figures V-5 et V-6). Il met aussi en évidence une différence de comportement des deux souches par comparaison des ordonnées à l'origine des droites de régression (-1,695 pour A et -3,344 pour C); la souche C induisant les premiers flétrissements plus tardivement mais pour un taux final de flétrissement plus élevé.

##### • Contamination au stade plantule

Les populations bactériennes de la souche A apportées par l'eau d'irrigation pendant une semaine sont du même ordre de grandeur que lors de l'expérience précédente : respectivement de  $5,2 \cdot 10^3$ ;  $2,1 \cdot 10^5$  et  $4,9 \cdot 10^9$  ufc. Des symptômes de flétrissement sont observés, les premiers apparaissant dès le sixième jour (tableau V-5). Pour les concentrations faibles, le taux de flétrissement final est resté limité à respectivement 4 et 12 %; en revanche, il a atteint 49 % pour la concentration la plus élevée. Comme précédemment, le nombre de cas de flétrissement augmente progressivement pendant les 20 premiers jours et sporadiquement par la suite.

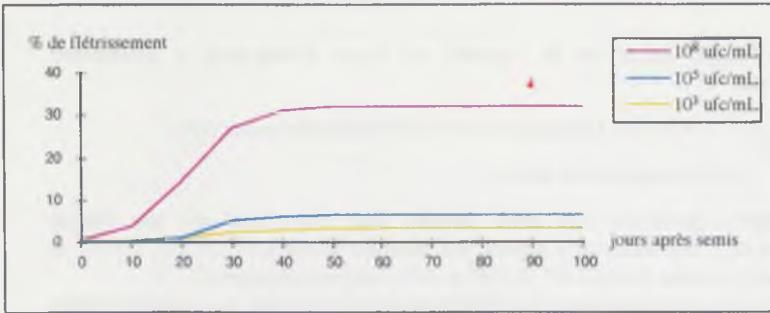


Figure V-5. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès les semis, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

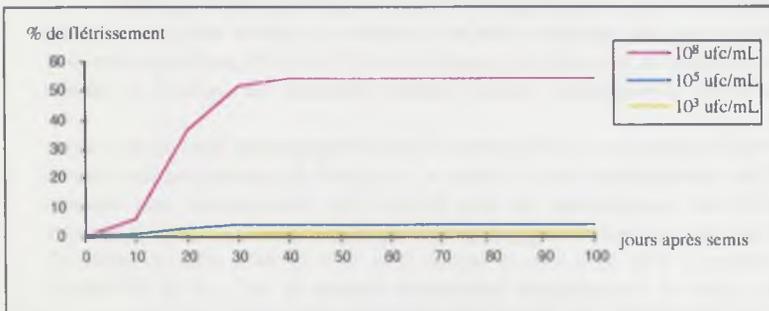


Figure V-6. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, dès le semis, par de l'eau contaminée par la souche C de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

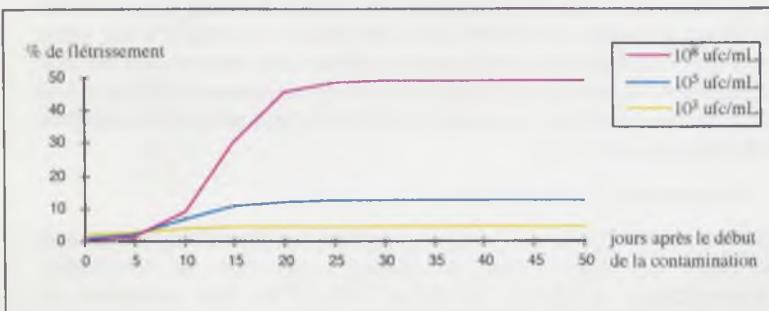


Figure V-7. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, au stade jeune plante, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum* en fonction de la concentration initiale d'inoculum (après modélisation).

**Tableau V-6. Estimation des populations de *R. solanacearum* dans le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.**

Pot	Population bactérienne (ufc/g de terreau)
1	5,49 10 <sup>6</sup>
2	1,80 10 <sup>5</sup>
3	6,32 10 <sup>7</sup>
4	2,43 10 <sup>7</sup>
5	1,39 10 <sup>7</sup>

**Tableau V-7. Evolution des populations de *R. solanacearum* extraites des eaux percolées à travers le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.**

Pot	Population bactérienne [log (ufc/mL)]			
	J+1	J+9	J+16	J+35
1	5,69	5,41	5,31	4,22
2	3,69	3,11	2,43	2,39
3	4,53	3,31	2,95	1,60
4	4,25	3,47	3,04	2,43
5	4,53	3,27	3,37	2,49

**Tableau V-8. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après arrosage quotidien par les eaux percolées à travers le terreau de pots ayant supporté des plants de tomate flétris.**

Jour d'arrosage	Pourcentage de flétrissement				
	Pot 1	Pot 2	Pot 3	Pot 4	Pot 5
10	2	0	0	0	0
13	4	0	0	2	0
14	6	0	4	4	0
16	18	0	6	6	0
17	24	4	10	10	4
19	38	18	12	18	10
21	44	42	22	36	20
23	46	46	28	52	24
25	60	48	44	54	28
27	78	64	56	66	52
29	82	78	78	78	76
31	90	86	88	86	84
33	100	96	98	94	96
35	100	100	100	100	100

**Tableau V-9. Influence de l'eau de javel sur les populations de *R. solanacearum* (souche A) dans l'eau d'irrigation, en fonction de la concentration bactérienne initiale, de la concentration en eau de javel et de la durée de contact.**

Durée de traitement (min)	Concentration en eau de javel (ppm)	Inoculum initial (ufc/mL)		
		10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
0		3,32 *	5,44	7,31
20	10	0,00 †	0,00	3,04
	20	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	0,00
40	10	0,00	0,00	3,43
	20	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	0,00
55	10	0,00	0,00	3,52
	20	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	0,00

\* : estimation des populations de *R. solanacearum* exprimée en valeur logarithmique.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**Tableau V-10. Influence de la filtration sur la présence de *R. solanacearum* (souche A) dans l'eau d'irrigation, en fonction de la concentration initiale d'inoculum.**

Population estimée	Inoculum initial (en ufc/mL)		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>
avant filtration	2,94 *	4,98	7,03
après filtration n°1	0,00 †	1,22	4,15
après filtration n°2	0,00	1,81	3,56
après filtration n°3	0,00	0,00	0,00

\* : estimation des populations de *R. solanacearum* exprimée en valeur logarithmique.

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

L'analyse des plants non flétris à la fin de la période d'observation met en évidence neuf et huit plants fortement contaminés, respectivement pour les concentrations bactériennes initiales inoculées de  $10^8$  et  $10^5$  ufc/mL.

La modélisation de l'évolution et la comparaison des paramètres (annexe 20), montrent que l'évolution des symptômes de flétrissement dépend significativement du taux de la concentration bactérienne dans l'eau d'irrigation (figure V-7).

#### V.1.2.2.2. Utilisation d'une eau naturellement contaminée

Le flétrissement des plants de tomate inoculés au niveau de la tige par la souche A de *R. solanacearum* a conduit à la contamination du terreau, initialement sain, sur lequel les plants étaient cultivés. En effet, des niveaux de populations bactériennes élevés, de l'ordre de  $10^5$  à  $10^7$  ufc/g de terreau, sont mis en évidence (tableau V-6).

L'analyse, à J+1, de l'eau d'arrosage récupérée après percolation à travers le terreau débarrassé des plants flétris, révèle la présence de la souche A à des concentrations comprises, entre 3,7 et 5,7 [log (ufc/mL)] (tableau V-7). A l'issue d'un arrosage quotidien durant 35 jours, la souche A est encore détectée dans l'eau percolée à des concentrations comprises entre 1,6 et 4,22 soit une diminution d'une à trois unités logarithmiques selon les terreaux. L'apport total de bactéries au bout de 35 jours d'arrosage quotidien des jeunes plants de tomate est estimé entre 5 et 7 unités logarithmiques.

Les eaux percolées utilisées pour irriguer les jeunes plants de tomate induisent le développement de symptômes de flétrissement (tableau V-8). Les premiers symptômes se manifestent à partir du dixième jour pour les plants contaminés par l'eau la plus chargée en *R. solanacearum* et à partir du dix-septième jour pour les plants contaminés par l'eau la moins chargée. Une évolution rapide du flétrissement est alors constatée qui aboutit, après 35 jours, à la mort de la totalité des plants.

#### V.1.2.3. Efficacité de techniques de décontamination d'une eau d'irrigation

##### V.1.2.3.1. Désinfection par de l'hypochlorite de sodium à 12 °chl.

Après 20 min de contact, une forte réduction des populations est constatée quelle que soit la dose d'eau de javel (tableau V-9). Avec une solution d'eau de javel à 10 ppm, la suspension bactérienne la plus concentrée initialement ( $10^7$  ufc/mL) est réduite à la valeur logarithmique moyenne de 3. Avec 20 ou 30 ppm, les populations disparaissent totalement même pour la concentration initiale la plus élevée. La prolongation de la durée de contact jusqu'à 55 min ne modifie pas significativement les résultats.

##### V.1.2.3.2. Décontamination par filtration

Pour un seul des trois essais, la filtration sur membrane de porosité  $0,2 \mu\text{m}$  de l'eau d'irrigation contaminée par *R. solanacearum* (concentrations d'inoculum :  $10^3$ ,  $10^5$  et  $10^7$  ufc/mL) permet d'éliminer totalement les bactéries. Pour les deux autres essais, la filtration permet seulement de diminuer les niveaux d'inoculum, excepté pour la concentration d'inoculum la plus faible (tableau V-10).

### V.1.3. Discussion

Le premier objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de conservation de *R. solanacearum* dans l'eau. Nous avons développé une approche expérimentale sur trois types d'eau : eau osmosée, eau de ville et eau d'irrigation. Le choix est arbitraire mais permet de comparer des eaux de qualités différentes.

Les analyses révèlent que *R. solanacearum* peut se conserver dans l'eau mais la durée de survie est variable, de deux semaines à plusieurs mois selon la qualité de l'eau. Les deux souches que nous avons utilisées, A et C, appartenant respectivement aux biovars 3 et 2, sont représentatives des populations de *R. solanacearum* existantes dans l'île de la Réunion. Elles ne présentent pas un comportement différent pour ce qui concerne la durée de survie dans les trois types d'eau que nous avons sélectionnés. Toutefois, la température est un facteur pouvant affecter la durée de survie de la souche C alors qu'aucun effet n'a été constaté pour la souche A. En effet, la durée de survie de la souche C est significativement plus courte à 20-25 °C qu'à 28 °C. Ce résultat est assez surprenant dans la mesure où les souches de biovar 2 sont connues comme plus adaptées aux températures fraîches que les souches de biovar 3.

Une eau purifiée comme l'eau osmosée ou partiellement purifiée comme l'eau de ville semble favoriser la survie de la bactérie même si une élimination progressive est observée. Ce résultat confirme ceux obtenus auparavant par Wakimoto *et al.* (1982) et Sunaina *et al.* (1998) qui ont montré que *R. solanacearum* survivait très bien dans de l'eau pure et pouvait même s'y multiplier. Si la quantité des populations de *R. solanacearum* a peu varié au cours du temps, en revanche, leur qualité s'est apparemment modifiée car la plupart des colonies observées sur milieu sélectif présentait un contour régulier et une absence de mucus, qui caractérisent les formes avirulentes de l'espèce. Il est fortement probable, du fait de leur croissance sur milieu sélectif, qu'il s'agit bien de colonies de *R. solanacearum*. Une telle conversion phénotypique a déjà été observée dans la plante (Buddenhagen & Kelman, 1964; Denny *et al.*, 1994) et est suspectée d'avoir un rôle dans la phase saprophyte de la bactérie, en particulier dans le sol (Denny *et al.*, 1994; Digat & Caffier, 1996). Par conséquent, il serait particulièrement important de confirmer que ce même phénomène intervient lors de la conservation dans les eaux. De même, une vérification du maintien de l'agressivité des populations bactériennes en survie dans l'eau, ce qui n'a pas été effectué dans notre cas, serait essentielle.

Dans une eau d'irrigation, quelle que soit la charge bactérienne initiale, la survie de *R. solanacearum* a rarement dépassé deux semaines. Ces résultats confirment ceux obtenus à partir d'eaux de surface ou d'un mélange eau/boue, donc des eaux riches en matières organiques, au sein desquels *R. solanacearum* a été capable de survivre respectivement de 17 à 33 jours et de 6 à 24 jours (Janse, 1996; Janse *et al.*, 1998). L'analyse bactériologique de l'eau d'irrigation que nous avons utilisée révèle la présence de populations bactériennes naturelles abondantes, en particulier des *Pseudomonas* fluorescents, que l'on trouve également fréquemment dans les sols. En outre, cette eau d'irrigation est chargée d'une boue fine qui se maintient en suspension. La disparition rapide de *R. solanacearum* dans ce type d'eau pourrait alors s'expliquer par un effet antibiotique de la part des populations bactériennes naturelles, par exemple de l'espèce *P. fluorescens* qui est connue pour son antagonisme envers *R. solanacearum* (Nesmith & Jenkins, 1985; Aspiras & Cruz, 1986; Shekhawat *et al.*, 1993). Une autre hypothèse serait une activité toxique des particules en suspension dans l'eau d'irrigation. La vérification de ces hypothèses requiert des expériences associant une eau assez

pure (eau osmosée ou eau de ville) artificiellement contaminée par *R. solanacearum* et soit des populations bactériennes naturellement présentes dans les eaux d'irrigation, soit des boues récupérées d'eaux d'irrigation et débarrassées de leurs populations bactériennes.

Cependant, il faut noter que de larges variations de concentrations des populations bactériennes sont observées au cours du temps. Cette fluctuation pourrait avoir pour origine une formation d'agrégats ou de biofilms par les bactéries. La formation de biofilms dans l'eau a déjà été rapportée, ce phénomène interviendrait pour assurer une meilleure survie des bactéries dans des conditions environnementales difficiles (Allison & Sutherland, 1987; Beveridge *et al.*, 1997; Kalmbach *et al.*, 1997; Neu & Lawrence, 1997; Schwartz *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 1999). Lors des prélèvements et malgré une agitation énergique, il est possible que les agrégats ne soient pas tous dispersés et que les colonies observées en culture soient plus le résultat de la multiplication d'un agrégat de cellules que d'une seule cellule bactérienne. L'agitation n'ayant pas été suffisamment standardisée lors de l'expérience, la formation des biofilms pourrait ainsi expliquer les variations constatées dans l'évolution des populations bactériennes.

De ces résultats, on peut conclure que, quel que soit la souche et le niveau initial de la population, la pression exercée par le milieu aqueux entraîne une mortalité dans un délai qui ne dépend que de la qualité de l'eau.

Le second objectif de l'étude concerne le rôle de l'eau d'irrigation comme source de dissémination de la bactérie et le rôle joué dans le développement de la maladie.

Les expérimentations mises en place révèlent qu'une irrigation effectuée avec une eau artificiellement contaminée par *R. solanacearum* peut être responsable du flétrissement de plantes sensibles. De plus, l'importance de la maladie est apparue directement corrélée à la charge bactérienne de l'eau puisque les eaux fortement chargées ont entraîné l'apparition de nombreux cas de flétrissement (entre 30 et 50 % au bout d'un mois selon les expériences) alors que les eaux plus faiblement chargées n'en ont induit que très peu (entre 0 et 12 %).

La comparaison des taux de flétrissement obtenus confirme la différence d'agressivité des souches. En effet, si les premiers cas de flétrissement induits par la souche A (biovar 3) ont été observés plus tôt que ceux provoqués par la souche C (biovar 2), le taux final de flétrissement dû à cette dernière est significativement plus élevé, ce qui confirme ainsi les résultats antérieurs du laboratoire.

L'impact de la contamination de l'eau d'irrigation par *R. solanacearum* concerne aussi bien le stade graine que le stade plantule. Cependant, la graine paraît beaucoup moins sensible que la plantule. En effet, le taux de germination des graines n'est pas significativement affecté par l'arrosage par une eau contaminée et le taux de flétrissement est moins élevé par une contamination au stade graine que par une contamination au stade plantule. Néanmoins, on remarque une inhibition partielle et temporaire de la germination lors d'un arrosage par une eau contaminée par la souche A et à l'opposé, une stimulation toute aussi temporaire en présence de la souche C. Ces effets pourraient être dus à des métabolites produits par les bactéries apportées lors de l'arrosage; ces substances seraient rapidement dégradées par la microflore bactériennes du mélange terreau-tourbe, ce qui justifie la caractère temporaire des effets. Les résultats obtenus corroborent ceux présentés dans le chapitre V.2. qui ont montré la faible sensibilité des semences lors d'une contamination artificielle réalisée en chambre climatique. Cette réceptivité réduite de la graine est probablement liée à la faible surface offerte à la contamination bactérienne, d'autant plus faible que la fraction la plus importante, le tégument est probablement résistant à la pénétration de l'agent pathogène; seule la jeune radicule encore

peu développée l'est suffisamment pour permettre l'initiation de l'infection. Dans le cas des plantules, les bactéries, apportées dans le sol par l'eau d'irrigation contaminée, ayant une surface de pénétration possible au niveau des racines plus grande que dans le cas des semences, la contamination est donc plus efficace et le taux de flétrissement, par conséquent, plus élevé.

La contamination d'une culture par une eau d'irrigation a donc une incidence moindre sur le développement de la maladie lorsque cette contamination s'effectue au stade semis. En revanche, une eau d'irrigation, même faiblement chargée en *R. solanacearum*, constitue une source d'inoculum contribuant à la contamination du sol, lui-même connu comme réservoir de la bactérie. L'accumulation de cette eau contaminée dans le sol peut conduire à une intensification de la maladie. Ce phénomène d'accumulation dans le sol et son incidence sur la maladie est clairement mis en évidence lors d'une expérience complémentaire pour laquelle des plants de tomate sensibles ont été arrosés, durant 35 jours au lieu d'une semaine dans l'expérience précédente, avec une eau faiblement chargée (entre  $10^2$  et  $10^3$  ufc/mL). Au terme de l'expérience, le taux maximum de flétrissement a été atteint, aucun plant n'a pu survivre. Cette expérience complémentaire nous permet également de montrer que des plants flétris peuvent être à l'origine d'une contamination du sol et que ce sol contaminé est susceptible de contaminer une eau, cette eau chargée en bactérie pouvant engendrer des symptômes de flétrissement.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats permet de confirmer que l'eau est un véhicule potentiel de la bactérie capable d'assurer efficacement la dissémination de la maladie. Ces résultats sont d'une grande importance au plan local, à la Réunion, en relation avec le projet de basculement des eaux du versant Est de l'île, où la bactérie est présente, vers le versant Ouest où les cultures maraîchères sont appelées à se développer.

Le rôle de l'eau dans la dissémination de *R. solanacearum* sur de très courtes distances a été évoqué par Moffet *et al.* (1981). Ils ont en effet démontré que le phénomène « d'éclaboussures » des gouttes de pluie pouvait entraîner la contamination de feuilles de plants non-contaminés *R. solanacearum* à partir de feuilles de plants contaminés. Le rôle de l'eau dans la dissémination de la bactérie sur de plus longues distances a été rapporté pour expliquer le développement du flétrissement bactérien en Suède (Olsson, 1976), en Egypte (Farang *et al.*, 1999) et dans l'Europe du Nord-Ouest, notamment au Royaume-Uni, en Belgique, aux Pays-Bas et en France (Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Hayward *et al.*, 1998).

Les eaux de ruissellement issues des pluies et/ou de l'irrigation peuvent également constituer un moyen de dissémination de la maladie à l'échelle d'une parcelle, voire même d'un secteur géographique plus important. Par exemple, les eaux de pluie sont mises en cause au Japon (Ono, 1983) et plus récemment au Népal (Pradhanang, 1999) : il est en effet montré que la bactérie peut être détectée, en période de pluie, dans le sol et dans les eaux de surface de cultures flétries, mais ne l'est pas dans les parcelles ne présentant pas de cas de flétrissement. Par conséquent, la présence de quelques plants flétris dans une parcelle peut être la source de contamination, par les eaux de surface, de l'ensemble de la parcelle voire d'autres parcelles. La non-utilisation des eaux de surface pour l'irrigation constitue donc un facteur clé de la réussite de la lutte contre le flétrissement bactérien (Janse, 1996; Hayward *et al.*, 1998; Janse *et al.*, 1998; Farang *et al.*, 1999).

Les eaux de rivière, sources d'approvisionnement pour l'irrigation des cultures, peuvent aussi assurer la dissémination de l'agent pathogène. Dans la plupart des cas, l'origine de la contamination des rivières semble liée à des rejets domestiques (stations d'épuration,...)

ou industriels (usines de transformation de pommes de terre importées) (Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Elphinstone *et al.*, 1998; Hayward *et al.*, 1998; Farag *et al.*, 1999; Expert *et al.*, 2000). En Europe du Nord-Ouest, certaines plantes adventices, comme la morelle douce-amère, présentes fréquemment au bord des cours d'eaux, sont considérées comme étant des réservoirs d'inoculum pouvant assurer la survie et la multiplication du pathogène pendant de longues périodes (Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Elphinstone *et al.*, 1998; Hayward *et al.*, 1998; Expert *et al.*, 2000).

Puisque l'eau d'irrigation est une source potentielle d'inoculum efficace, susceptible de limiter ou d'anéantir l'incidence des mesures de lutte pouvant être mise en oeuvre, une décontamination de l'eau présumée porteuse de *R. solanacearum* avant son utilisation s'impose. C'est dans cette optique que nous avons évalué l'efficacité de deux méthodes simples de décontamination des eaux.

Une décontamination efficace de l'eau est assurée par désinfection par une solution d'eau de javel à 20 ppm pendant 20 min. Cependant, l'interprétation des résultats concernant la décontamination par l'eau de javel en fonction du temps est à nuancer. En effet, l'effet temps peut avoir été biaisé, puisque l'eau de javel n'a pas été éliminée avant étalement de la suspension bactérienne. Il est envisageable que l'effet anti-bactérien se soit poursuivi au niveau du milieu gélosé. En toute rigueur, il aurait fallu éliminer totalement l'eau de javel, soit par agitation de façon à obtenir une volatilisation du chlore, soit par centrifugation de façon à séparer le culot bactérien du surnageant chloré. Cependant, la faible quantité de suspension rapportée à la surface du milieu de culture laisse supposer que la majeure partie du chlore s'est volatilisée durant l'étalement.

L'eau de javel est donc utilisable pour décontaminer efficacement une eau, mais les contraintes représentées par les normes de potabilité des eaux mettent un frein à son utilisation. Bien que les doses utilisées dans le cadre de notre étude soient inférieures ou égales au seuil toléré en terme de potabilité de l'eau, on peut se demander quel serait l'impact sur les cultures d'une eau d'irrigation décontaminée par de l'eau de javel. Une élimination totale du chlore et du sodium est indispensable pour éviter l'accumulation de résidus au niveau des cultures, mais est-elle possible ?

En revanche, la filtration des eaux ne semble que partiellement efficace puisqu'elle n'a pas permis, dans deux essais sur trois, d'éliminer totalement les populations bactériennes. Ce résultat assez surprenant pourrait être dû à une erreur technique (membrane mal positionnée ou déchirure microscopique de la membrane) ou à l'effet de la pression exercée qui a fini par entraîner les bactéries au travers des pores de la membrane. Il serait nécessaire de recommencer l'expérience, en modulant les conditions pour déterminer la réelle efficacité d'une filtration sur membrane.

Une combinaison des deux méthodes pourrait être utilisée : une filtration permettrait dans un premier temps d'abaisser le niveau de population, puis une décontamination avec de l'eau de javel à faible dose, plus faible que celles utilisées dans notre étude, assurerait alors une désinfection totale de l'eau.

D'autres méthodes peuvent être envisageables mais n'ont pas fait l'objet d'une attention particulière dans cette étude. Les bactéries étant aérobies strictes, le confinement de l'eau d'irrigation de façon à obtenir un milieu fortement anaérobie pourrait constituer une voie de décontamination. Des méthodes plus classiques, par utilisation de la chaleur, d'alcool ou d'autres antiseptiques, pourraient également être testées.

## V.2. La semence : une source potentielle d'inoculum ?

### Introduction

Parmi les vecteurs possibles assurant la transmission de *R. solanacearum*, les semences vraies, exceptés les semences tubercules, n'ont jamais fait l'objet d'études très approfondies. Très peu de travaux ont été publiés sur ce sujet. Pourtant, alors que les échanges internationaux s'intensifient de plus en plus, il est essentiel de savoir quel peut être le rôle des semences dans l'initiation et la pérennisation de la maladie afin de mettre en oeuvre, le cas échéant, des mesures de contrôle adaptées.

Il est couramment admis que les semences ne peuvent pas être contaminées par *R. solanacearum* et être considérées comme vecteur de la maladie car le flétrissement des plants entraînant leur mort intervient avant le processus de fructification. Or ce n'est pas toujours le cas, la mise à fruit peut se dérouler avant la manifestation du flétrissement. De plus, il a été montré que l'inoculation artificielle de graines de tomate et de poivron par *R. solanacearum* peut aboutir à la présence de la bactérie dans les cotylédons et les feuilles des plants issus de ces graines (Moffett *et al.*, 1981). Par ailleurs, *R. solanacearum* a été détecté sur des graines d'arachide naturellement infectées (Machmud & Middleton, 1991; Zhang *et al.*, 1993) ainsi que sur plantules de tomate provenant de graines naturellement contaminées (Devi & Menon, 1980; Shakya, 1993). Il est important d'ajouter que lors d'infections latentes, démontrées pour la tomate (Prior *et al.*, 1990) et probables pour de nombreux autres hôtes (Hayward, 1991), qui évolueront vers le flétrissement uniquement si les conditions y sont favorables, il est parfaitement envisageable que les fruits et les graines puissent être contaminés. En outre, des doutes subsistent concernant les cas de flétrissement déclarés en culture hors-sol de tomate à la Réunion, les graines étant suspectées d'en être à l'origine. Malgré tous ces faits, aucune étude approfondie n'a été effectuée pour apporter des éléments scientifiques confirmant ou infirmant la transmission de la bactérie par la semence, d'où l'importance du travail réalisé dans le cadre de cette thèse.

L'objectif de l'étude est de vérifier les possibilités de transmission de *R. solanacearum* par la graine. L'étude est abordée de manière analytique en considérant les différentes étapes du cycle naturel de la reproduction végétale par les graines. Pour que la graine, de tomate ou d'aubergine par exemple, soit considérée comme un véhicule de la bactérie pour sa dissémination, il est nécessaire :

- (i) qu'une plante contaminée par *R. solanacearum* puisse produire des fruits qui seront infectés et que les graines soient elles-mêmes contaminées,
- (ii) que des graines contaminées de manière interne ou superficielle puissent le rester après les traitements qui leur sont imposés au travers des procédés d'extraction à partir des fruits, des méthodes de préparation pour la commercialisation (traitements divers) et des procédés de stockage,
- (iii) que des graines contaminées conduisent
  - soit à un défaut de germination par mort de la plantule avant sa levée,
  - soit à une plantule viable mais contaminée au niveau des racines ou de la tige et qui exprimera plus ou moins tardivement les symptômes de flétrissement.

## V.2.1. Matériels et méthodes

### V.2.1.1. Matériels

#### V.2.1.1.1. Matériel microbien et milieux de culture

Toutes les expériences sont réalisées avec les souches de référence du laboratoire, A (biovar 3) et C (biovar 2), de *R. solanacearum*. D'autres souches d'espèces bactériennes pathogènes de la tomate, et connues pour être transmissibles par la semence, sont également utilisées : *X. vesicatoria* et *P. syringae* pv. *tomato* (N°JT546 et JT550 de la collection du laboratoire).

Les milieux de culture spécifiques des souches A et C et le milieu LPGA pour les autres espèces bactériennes sont utilisés.

#### V.2.1.1.2. Matériel végétal

Les expériences sont réalisées sur des graines de tomate de la variété Roma VF. Pour l'aubergine, la variété choisie est Black Beauty. Les graines d'origine commerciale sont recouvertes d'un pelliculage antifongique : thirame pour les graines de tomate, malathion et thirame pour les graines d'aubergine.

Les graines, inoculées ou non, sont déposées sur du papier filtre placé sur du milieu gélosé (Agar 6 g/L, Tilt 0,04 mL/L) en boîte de Petri et mises à germer à 28 °C dans les étuves du laboratoire. Les plantules sont ensuite repiquées dans un terreau/tourbe. Les graines peuvent également être mises à germer directement dans le mélange. L'élevage des jeunes plantules et plants est effectué en chambre climatique (16 h de jour, 8 h de nuit), à la température de 30 °C, et à une humidité relative de 85 à 90 %. Les pots sont alors placés de manière aléatoire dans la chambre. Les études sur plants adultes sont menées dans une serre 'insectes-proof', une disposition aléatoire des pots est également appliquée. Les fruits détachés et inoculés sont placés dans des boîtes de polystyrène transparents et incubés dans une étuve à 30 °C.

### V.2.1.2. Méthodes

#### V.2.1.2.1. Inoculation de fruits, analyse des fruits et graines

Afin de répondre aux questions posées sur l'implication des graines dans la dissémination du flétrissement bactérien, une première approche est d'étudier l'effet de *R. solanacearum* sur les fruits, condition indispensable pour envisager une contamination naturelle des graines.

Les expériences sont menées sur tomate, à la fois sur fruits détachés et sur fruits portés par des plants adultes. La préférence accordée à la tomate sur l'aubergine est basée sur les caractéristiques propres des espèces : facilité d'obtention des graines et taux de germination d'une part, et vitesse de croissance et de fructification des plants d'autre part.

- Inoculation de fruits détachés

Les fruits utilisés proviennent de plants de tomate cultivés dans la parcelle « le vallon ». Trois protocoles d'inoculation sont mis en oeuvre successivement.

Dans un premier temps, 200 fruits de tomate, répartis en trois catégories selon leur stade de croissance (stade 1 : petites tomates, poids compris entre 2 g et 12 g, et diamètre compris entre 1 cm et 2,5 cm; stade 2 : tomates moyennes, poids entre 15 g et 30 g, et diamètre entre 2,5 cm et 4 cm; stade 3 : grosses tomates, poids supérieur à 45 g et diamètre supérieur à 4 cm) sont trempées dans un bain d'eau de javel diluée au 1/1000 pendant 5 min puis rincées abondamment trois fois avec de l'eau stérile.

Pour chaque fruit au stade 2 ou 3, huit trous sont effectués sur une des faces externes du fruit, à l'aide d'un embout de Pipetman, et seulement quatre trous pour les fruits au stade 1. Cinquante microlitres de suspension bactérienne sont déposés dans chaque trou. Trois concentrations :  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/mL sont comparées. Des tomates témoins sont inocuées avec du tampon Tris stérile. Un premier prélèvement de tomates ayant un aspect suspect est effectué la première semaine, puis trois tomates par catégorie sont prélevées au bout de neuf jours et enfin toutes les tomates sont analysées au bout de deux semaines. Des isolements sont systématiquement réalisés à partir de fragments de ces tomates.

Dans une seconde étape, un protocole similaire est appliqué à un autre lot de fruits qui sont inocués par une petite quantité des suspensions dosées comme précédemment, injectée à la seringue au niveau de la zone d'insertion du pédoncule. Des prélèvements successifs de tomates sont réalisés 4, 5 et 10 jours après inoculation pour noter l'évolution des symptômes et vérifier la présence de *R. solanacearum*.

Un dernier essai est effectué sur un lot de 10 tomates, lavées comme décrit précédemment, puis coupées en deux. Chaque moitié est recouverte de 100  $\mu$ L de suspension bactérienne de la souche A ou C, dosée à  $10^8$  ufc/mL avant mise à incubation à 30 °C. Les notations et une vérification de la présence de *R. solanacearum* sont effectuées après deux semaines d'incubation.

- Inoculation de fruits en place

Vingt plants de tomate sont cultivés en serre 'insectes-proof' jusqu'au stade de fructification. Les plants sont répartis en quatre catégories selon le traitement subi : deux plants sont des témoins non inocués, six plants sont inocués au niveau du pédoncule des fruits de tomate, six plants sont inocués au niveau de la base des fruits de tomate et enfin six plants cumulent, mais sur des bouquets différents, inoculation du pédoncule du fruit et inoculation de la base du fruit. Dans chaque groupe de six plants, deux sont réservés pour des inoculations avec du tampon Tris stérile, deux pour des inoculations avec soit 10  $\mu$ L d'une suspension à  $10^9$  ufc/mL (pédoncule) soit 100  $\mu$ L d'une suspension à  $10^8$  ufc/mL (base du fruit) et deux avec soit 10  $\mu$ L d'une suspension à  $10^6$  ufc/mL (pédoncule) soit 100  $\mu$ L d'une suspension à  $10^5$  ufc/mL (base du fruit).

Trois prélèvements (un par semaine) sont réalisés pour noter l'état des fruits de tomate, décrire les symptômes éventuels et estimer les pourcentages des fruits atteints et de fruits desquels *R. solanacearum* est isolé. Lors des deux derniers prélèvements, les graines des fruits analysés sont récupérées, soit pour un test de germination en boîte de Petri ou en terreau, soit pour une analyse par étalement sur milieu de culture gélosé avec ou sans macération préalable. L'état des plantules est régulièrement suivi et la présence de *R. solanacearum* est recherchée au niveau des symptômes observés.

## V.2.1.2.2. Contamination artificielle des graines de tomate et d'aubergine

Pour étudier la capacité des graines de tomate et d'aubergine à servir de véhicule à *R. solanacearum*, nous les avons contaminé artificiellement et nous avons étudié la durée de survie de la bactérie.

Les estimations des populations bactériennes extraites des graines contaminées sont réalisées sur la suspension de macération de 45 graines (~ 0,15 g) dans 4.5 mL de tampon Tris stérile (ou tout autre tampon testé) pendant une nuit (16 h) à 4 °C et sous agitation. Toutefois, le broyage des graines à l'Ultra-Turrax, procédure choisie notamment par Taylor (Taylor, 1970), est également effectué pour estimer la population totale retenue par la graine.

- Préparation initiale des graines

Les premiers essais de contamination des graines étant un échec du fait de leur pelliculage qui se révèle une barrière à la fixation des bactéries, la recherche d'un pré-traitement conduit à comparer l'efficacité de mesures visant soit à dissoudre le pelliculage soit à éliminer le thirame par du charbon activé (McGuire & Jones, 1989). Le premier pré-traitement est un lavage des graines pendant 5 min par agitation dans du tampon Tris stérile préchauffé à 37 °C. Le second comprend cinq lavages successifs pendant 5 min dans du tampon Tris stérile et le dernier est la réplique du précédent complété par un trempage dans du charbon activé à 0,2 % et un rinçage final très soigneux.

- Définition du protocole d'inoculation

La mise au point d'un protocole assurant une contamination optimale et standardisée implique de définir la méthode d'inoculation, la concentration bactérienne, la durée de contact entre la suspension bactérienne et les graines, et enfin la température à laquelle seront maintenues les graines pendant l'inoculation.

Les inoculations sont réalisées par trempage de lots de 500 graines (~ 1 g) dans 20 mL de suspension bactérienne. Les graines sont ensuite séchées pendant une nuit sous hotte à flux laminaire et conservées à 4 °C avant utilisation.

- ◇ Comparaison des méthodes d'inoculation et de différents temps de contact

Deux méthodes sont comparées sur des graines prétraitées : trempage des graines dans une suspension bactérienne ( $5.10^7$  ufc/mL), technique choisie notamment par Moffett *et al.* (1981) ou infiltration sous vide et pendant 30 min à température ambiante, procédure retenue notamment par Kritzman (Kritzman, 1991), et qui est précédée ou non d'un trempage comme précédemment. Les durées de trempage comparées sont 1 h, 3 h et 20 h.

- ◇ Comparaison de différentes températures d'inoculation

Les graines prétraitées sont mises à tremper dans une suspension de la souche A concentrée à  $5.10^7$  ufc/mL, et incubées soit à 4 °C soit à 15 °C pendant 3 h.

## ◇ Comparaison de différentes concentrations d'inoculum

Des graines de tomate et d'aubergine prétraitées sont inoculées par trempage dans une suspension de la souche A ou de la souche C dosée soit à  $10^5$  soit à  $10^8$  ufc/mL et incubées pendant 3 h à 4 °C.

• Etude de la dynamique de survie de *R. solanacearum* sur graine

Afin d'étudier la survie de *R. solanacearum* sur la graine de tomate et/ou d'aubergine préalablement inoculée, deux expérimentations sont menées successivement.

Dans la première, des lots de graines d'aubergine et de tomate sont inoculés par trempage dans une suspension de la souche A de *R. solanacearum* à la concentration de  $10^7$  ufc/mL et, pour les graines de tomate uniquement, par trempage dans une suspension d'une souche de *X. vesicatoria* ou de *P. syringae* pv. *tomato* à la même concentration. Un échantillon de 45 graines correspondant à chaque traitement est prélevé le jour de l'inoculation puis 1, 5, 13 et 19 jours après inoculation et mis à macérer pour en estimer la population bactérienne.

Dans la seconde, des graines d'aubergine sont inoculées par trempage dans une suspension de la souche A ou C dosée à  $10^5$  ou à  $10^8$  ufc/mL. Des graines de tomate directement extraites de fruits, donc non pelliculées, et des graines pelliculées sont inoculées par trempage dans une suspension des souches A ou C de *R. solanacearum* ou d'une souche de *X. vesicatoria*, dosée à  $10^8$  ufc/mL. Des estimations des populations sont effectuées le jour de l'inoculation puis 3, 7, 13 jours après inoculation.

## V.2.1.2.3. Estimation du taux de germination et suivi de la croissance de plants issus de graines contaminées

Les graines contaminées artificiellement par trempage dans des suspensions des souches A ou C dosées à  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  ou  $10^8$  ufc/mL, sont mises à germer, soit en terreau (60 graines par souche et par dose d'inoculum), soit sur eau gélosé couvert d'un papier filtre stérile (100 graines par souche et par dose d'inoculum). Le taux de germination et l'état des plantules et des plants sont notés régulièrement.

Comme le temps nécessaire à la germination des graines d'aubergine est long, différents traitements sont comparés en vue de le raccourcir : (i) trempage dans du tampon à 37 °C pendant 1 h suivi d'un écrasement léger au pilon pour ramollir ou briser le tégument des graines, (ii) trempage dans une solution d'eau de javel diluée au 1/1000 pendant 5 ou 15 min ou (iii) trempage dans de l'eau oxygénée diluée au 1/10 pendant 5 ou 15 min afin d'agir directement sur la germination. Cinq lots de 20 graines sont déposés sur milieu gélosé pour estimer le taux de germination.

## V.2.1.2.4. Analyses statistiques

La comparaison des estimations de niveaux de populations est réalisée après une transformation logarithmique (log) et celle des taux de germination (g) après une transformation de type  $y = \arcsin \sqrt{(g/100)}$  qui permet de considérer comme normale la distribution des données. Les analyses de variance sont effectuées à partir des données ainsi transformées, et

**Tableau V-11. Influence de la souche de *R. solanacearum*, de la méthode d'inoculation et du stade de développement du fruit sur le pourcentage de tomates (fruits détachés) présentant des symptômes trois semaines après l'inoculation.**

Méthode d'inoculation †	Souche	Stade des tomates		
		Stade 1	Stade 2	Stade 3
Pointe de pipetman ‡	A	7 <b>d</b> *	55 <b>bc</b>	45 <b>c</b>
	C	7 <b>d</b>	72 <b>abc</b>	50 <b>bc</b>
Aiguille de seringue §	A	17 <b>d</b>	76 <b>ab</b>	90 <b>a</b>
	C	8 #	40 #	50 #

\* : les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

† : le nombre de fruits inoculés varie de 24 à 31 selon la combinaison.

‡ : 10/32 témoins ont présenté des symptômes.

§ : les fruits témoins ont disparu.

# : pourcentages obtenus au bout de deux semaines, le reste des fruits a disparu la troisième semaine; ces pourcentages ne sont donc pas pris en compte pour l'analyse statistique des données.

**Tableau V-12. Fréquence d'isolement de *R. solanacearum* de fruits détachés, deux semaines après l'inoculation, selon la souche et la méthode d'inoculation.**

Méthode d'inoculation	Souche	Tomates sans symptôme	Tomates avec symptômes
Pointe de pipetman	A	ND †	95 <b>a</b>
	C	75 <b>ab</b> *	62 <b>b</b>
Aiguille de seringue	A	100 <b>a</b>	21 <b>c</b>
	C	100 <b>a</b>	67 <b>ab</b>

\* : les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

† : ND : non déterminé.

suivies, le cas échéant, d'une comparaison de moyennes par la méthode de Duncan ou celle de Bonferroni. Les conditions préalables à la mise en oeuvre d'une analyse de variance sont vérifiées, en particulier l'homogénéité des variances. Le test de Student est appliqué pour mettre en évidence une différence entre deux traitements.

## V.2.2. Résultats

### V.2.2.1. Sensibilité des fruits de tomate à *R. solanacearum*

#### V.2.2.1.1. Inoculation de fruits détachés

Les tomates inoculées selon l'une ou l'autre des méthodes (cônes de Pipetman ou aiguilles de seringue) manifestent des symptômes (planche 5) absents de la plupart des tomates témoins, certaines ayant présenté quelques symptômes, uniquement dans le cas de l'inoculation à l'aide de cônes de Pipetman.

Sur les faces externes, les symptômes vont de la légère décoloration autour de la zone d'inoculation à un ramollissement de la chair parfois accompagné d'une décoloration plus générale sur des fruits qui présentent une pourriture interne. Des brunissements sont également observés.

A l'intérieur du fruit, le principal symptôme observé est une nécrose de taille variable qui peut s'étendre de la zone d'inoculation jusqu'à la pulpe et aux faisceaux latéraux très souvent brunâtres. Ces zones nécrosées ont l'aspect d'une pourriture brune parfois sèche. Dans certains cas extrêmes, la pourriture est très intense, la pulpe et la chair étant totalement liquéfiées. Cette pourriture importante est observée essentiellement chez les fruits mûrs, les fruits plus jeunes présentant seulement des nécroses sèches.

L'analyse des prélèvements effectués sur les tomates (tableaux V-11 et V-12) confirme la présence de *R. solanacearum* (souche A ou C), souvent en abondance dans des fruits inoculés apparemment sains ou présentant des symptômes, dans les zones nécrotiques et pourries comme dans les zones saines. Cependant, *R. solanacearum* n'a pu être isolé de toutes les tomates inoculées, en particulier de celles présentant une pourriture à un stade avancé. En revanche, de nombreuses autres bactéries sont isolées de ces symptômes avancés. *R. solanacearum* est parfois isolé des tomates témoins suspects.

La fréquence d'isolement de *R. solanacearum* est très élevée, supérieure à 75 % à partir de fruits sans symptômes, quelle que soit la souche et la méthode d'inoculation. Elle est nettement plus variable dans le cas des fruits avec symptômes avec des valeurs s'échelonnant de 21 à 95 % selon la combinaison souche-méthode d'inoculation.

Cette expérimentation a été perturbée par la présence de larves de la mouche de la tomate (*Neoceratitis cyanescens*) qui ont envahi la majorité des fruits. Après étalement, nous avons constaté que les larves étaient contaminées par d'importantes quantités de *R. solanacearum*. Ces larves sont probablement à l'origine de la dissémination de *R. solanacearum* dans les fruits, y compris les témoins.

L'inoculation de fruits par une aiguille de seringue permet d'obtenir un plus grand nombre de fruits présentant des symptômes. Dans cette deuxième expérience, les témoins, nettement séparés des tomates inoculées, ont présenté parfois quelques symptômes desquels *R. solanacearum* n'a pas été isolé. Les larves de la mouche de la tomate ont cependant également perturbé l'expérience en se développant dans les fruits.

**Tableau V-13. Influence de la dose d'inoculum (souche A de *R. solanacearum*) et du site d'inoculation sur la fréquence de tomates présentant des symptômes, trois semaines après l'inoculation (fruits en place).**

Site d'inoculation	Dose d'inoculum (ufc/fruit)	
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>7</sup>
Pédoncule du fruit	32 c *	69 b
Base du fruit	86 ab	89 a

\* : les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

**Tableau V-14. Influence de la dose d'inoculum et du site d'inoculation sur la fréquence d'isolement de *R. solanacearum* de fruits inoculés et présentant ou non des symptômes.**

Site d'inoculation	Dose d'inoculum (ufc/fruit)	Tomates sans symptôme	Tomates avec symptômes
Pédoncule des fruits	10 <sup>4</sup>	0 c *	90 ab
	10 <sup>7</sup>	62 c	86 ab
Base des fruits	10 <sup>4</sup>	50 c	94 ab
	10 <sup>7</sup>	100 ab	100 a

\* : les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

**Tableau V-15. Estimation des populations de *R. solanacearum* dans des graines issues de fruits en place et inoculés.**

Dose d'inoculation (ufc/fruit)	Mode d'inoculation	Nombre de fruit	Population bactérienne [log (ufc/graine)]
0 (témoin)	Non inoculé	2	0
	Pédoncule du fruit	2	0
	Base du fruit	2	0
10 <sup>4</sup>	Pédoncule du fruit	2	> 6
		1	< 2
		1	0
	Base du fruit	4	> 6
10 <sup>7</sup>	Pédoncule du fruit	1	> 6
		3	0
	Base du fruit	3	> 6
		1	4



Planche 5. Symptômes sur fruits de tomate dus à *Ralstonia solanacearum*.

La fréquence des symptômes varie en fonction du stade de développement du fruit, essentiellement entre le stade 1 (environ 10 %) et les deux stades suivants (respectivement 68 et 62 %). La méthode d'inoculation n'a qu'une influence limitée sur la fréquence des symptômes, essentiellement pour les fruits au stade 3 pour lesquels elle est plus élevée dans le cas de l'utilisation d'une seringue (90 % versus 48 %).

Lorsque des fruits coupés en deux sont recouverts de suspension bactérienne, de nombreux symptômes de pourriture sont observés. Les tomates les plus mûres, ainsi que celles dont la coupe a laissé apparentes les loges carpellaires, sont les plus touchées. Sur beaucoup de fruits, cependant, des champignons se sont développés. *R. solanacearum* est isolé de tous les fruits analysés à l'exception de ceux touchés par une pourriture à un stade avancé, desquels de nombreuses autres bactéries sont isolées.

#### V.2.2.1.1. Inoculation de fruits en place

A l'issue de la première semaine d'incubation, des fruits présentent des symptômes comparables à ceux décrits précédemment sur fruits détachés : ramollissement, brunissement et/ou pourriture de la pulpe puis de la chair, nécrose des faisceaux, retard de développement des graines et, dans certains cas, nécrose des graines. Les symptômes sont plus intenses dans les zones à proximité de l'inoculation, à la base du fruit ou à proximité de la zone d'insertion du pédoncule. Après deux semaines, des symptômes évolués sont visibles sur 59 des 85 fruits prélevés (69 %), mais de nombreux fruits totalement pourris tombés sur le sol ne sont pas analysés. Après trois semaines, le pourcentage de tomates avec symptômes est légèrement plus faible, 100 sur les 159 prélevées soit 62 % et les dégâts sont moins sévères (tableau V-13). Les fruits des plants témoins sont restés sains pour la grande majorité (87 %), mais les fruits suspects ne sont que ramollis et non nécrosés; *R. solanacearum* n'y est pas détecté.

Une population dense de *R. solanacearum* est isolée des fruits inoculés. Cependant, comme dans l'expérience sur fruits détachés, *R. solanacearum* n'est pas isolé de tous les fruits présentant des symptômes (tableau V-14). Par ailleurs, un gradient de densité bactérienne est observé depuis la zone d'inoculation, quel qu'en soit le mode, vers l'autre extrémité de la tomate ou vers la zone de la pulpe. Lors d'inoculations de la base du fruit, *R. solanacearum* est isolé des sépales, du pédoncule du fruit et même de l'axe de la grappe de fruits.

La fréquence de fruits avec symptômes est élevée pour des inoculations effectuées à la base du fruit (88 %), significativement supérieure à celle pour des inoculations au niveau du pédoncule (51 %). Dans ce cas seulement, des différences significatives existent entre les deux doses d'inoculum. La fréquence d'isolement de *R. solanacearum* de fruits inoculés manifestant des symptômes est voisine de 93 %, indépendamment de la méthode d'inoculation et de la dose d'inoculum. En revanche, dans le cas de fruits sans symptômes, elle varie significativement en fonction de ces paramètres : 100 % pour la forte concentration injectée à la base du fruit contre 62 % au niveau du pédoncule et respectivement 50 et 0 % pour la faible concentration.

#### V.2.2.2. Contamination des graines par *R. solanacearum*

##### V.2.2.2.1. A partir de fruits inoculés

Les graines des fruits concernés par une inoculation de la base ou du pédoncule et montrant des symptômes sont prélevées après deux semaines d'incubation et appliquées sur

**Tableau V-16. Estimation des populations de *R. solanacearum* dans les graines contaminées à  $5.10^7$  ufc/mL, selon la méthode de prétraitement des graines.**

Traitement †	1 lavage	5 lavages	Charbon activé
Population bactérienne [log (ufc/graine)]	5,22 a *	5,31 a	5,24 a

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

† : inoculation par 3 h de contact entre la suspension bactérienne et les graines.

**Tableau V-17. Estimation des populations de *R. solanacearum* dans les graines contaminées à  $5.10^7$  ufc/mL, selon le temps de contact entre suspension et graines.**

Temps de contact †	1 h	3 h	20 h
Population bactérienne [log (ufc/graine)]	1,68 b *	5,23 a	1,15 b

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

† : pré-traitement des graines adopté : un lavage.

**Tableau V-18. Influence de la température d'inoculation sur l'installation de *R. solanacearum* au niveau des graines d'aubergine ou de tomate.**

Température d'inoculation †	Population bactérienne [log (ufc/graine)]	
	graines d'aubergine	graines de tomate
4 °C	5,18 a *	4,78 b
15 °C	5,11 a	4,28 b

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

† : dose d'inoculum :  $5.10^7$  ufc/mL; inoculation par 3 h de contact entre la suspension bactérienne et les graines.

**Tableau V-19. Influence de la concentration de l'inoculum et de la souche sur l'installation de *R. solanacearum* au niveau des graines d'aubergine ou de tomate.**

Souche	Inoculum (ufc/mL)	Population bactérienne [log (ufc/graine)]	
		graines d'aubergine	graines de tomate
A	$10^5$	3,46 b *	3,34 b
	$10^8$	5,14 a	6,08 a
C	$10^5$	3,32 b	3,18 b
	$10^8$	6,41 a	5,98 a

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

milieu sélectif pour une incubation de trois jours à 28 °C. Une forte proportion des graines est porteuse de bactéries, identifiées à *R. solanacearum*; des bactéries d'autres espèces sont présentes au niveau des graines témoins. Une estimation des populations bactériennes dans les graines prélevées révèle des niveaux élevés, parfois supérieurs à  $10^6$  ufc/graine (tableau V-15).

#### V.2.2.2.2. Par contamination directe de graines de tomate ou d'aubergine

Les expériences sont principalement menées sur graines de tomate. Le protocole mis au point est ensuite validé sur graines d'aubergine.

Les trois pré-traitements destinés à éliminer le pelliculage des graines, qu'une expérience préliminaire a montré capable d'empêcher l'adhérence et la pénétration des bactéries mais également d'entraîner leur mort, ne sont pas significativement différents (tableau V-16). Un seul lavage permet d'éliminer l'effet négatif du pelliculage. Par ailleurs, la comparaison de trois durées de contact entre les graines et la suspension bactérienne montre qu'une durée de 3 h assure une contamination de la graine plus efficace qu'une durée plus courte, 1 h, ou beaucoup plus longue, 20 h (tableau V-17).

Les deux méthodes d'inoculation (trempage avec ou sans infiltration sous vide) ne sont pas différentes dans leur capacité à contaminer les graines. De même, la contamination des graines n'est pas influencée par la température à laquelle intervient le trempage, à la fois pour la tomate et l'aubergine (tableau V-18); la température de 4 °C est cependant retenue car elle limite les risques de prolifération des autres micro-organismes.

Les estimations des niveaux des populations extraites des graines de tomate par macération avec ou sans broyage complémentaire ne sont pas significativement différentes; la macération simple est donc retenue pour l'extraction des bactéries des graines.

En revanche, le niveau des populations extraites des graines est influencé par la concentration de la suspension de trempage (tableau V-19) : pour des concentrations de  $10^5$  et  $10^8$  ufc/mL de la suspension de trempage, les niveaux des populations extraites sont respectivement de l'ordre de  $10^3$  et  $10^6$  ufc/graine. Cette influence n'est pas modifiée par le type de graine, tomate ou aubergine, ou par la souche bactérienne utilisée, A ou C.

#### V.2.2.2.3. Evolution des populations de *R. solanacearum* sur les graines de tomate et d'aubergine

Dans le cas des graines d'aubergine, le niveau d'installation de la souche A est proportionnel à la concentration de l'inoculum initial : 3,46; 5,26 et 6,14 respectivement pour  $10^5$ ,  $10^7$  et  $10^8$  ufc/mL (tableaux V-20A et B). Il en est de même de la durée de survie qui se situe entre 3 et 7 jours, entre 5 et 13 jours et entre 7 et 13 jours selon la dose initiale. Pour ce qui concerne la souche C, les niveaux d'installation ne sont pas significativement différents de ceux de la souche A; en revanche, sa survie est, pour la dose d'inoculum la plus élevée ( $10^8$  ufc/mL), supérieure à 13 jours, le niveau de population étant alors estimé à 3,30 (tableau V-20B).

Dans le cas des graines de tomate, le niveau d'installation de *R. solanacearum* est, quelle que soit la souche A ou C, significativement supérieure sur des graines non pelliculées (extraites de fruits d'une parcelle) que sur des graines commerciales même traitées par lavage pour éliminer le pelliculage (tableau V-21C).

**Tableau V-20. Influence de la souche de *R. solanacearum* et de la concentration de la suspension de trempage sur l'installation et la survie de *R. solanacearum* sur les graines d'aubergine.**

**A) Première expérimentation**

Dose d'inoculum :  $10^7$  ufc/mL

Jour après l'inoculation	Souche A, population bactérienne [log(ufc/graine)]
0	5,26 a *
1	5,01 a
5	1,66 b
13	0,00 † c
19	0,00 c

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ).

† : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**B) Seconde expérimentation**

Jour après l'inoculation	Souche A		Souche C	
	Dose d'inoculum (ufc/mL) $10^5$	Dose d'inoculum (ufc/mL) $10^8$	Dose d'inoculum (ufc/mL) $10^5$	Dose d'inoculum (ufc/mL) $10^8$
0	3,46 * a †	6,14 a	3,32 a	6,42 a
3	1,68 b	5,40 b	2,42 b	5,85 b
7	0,00 ‡ c	1,73 c	0,00 c	4,17 c
13	0,00 c	0,00 d	0,00 c	3,30 d

\* : estimation des populations bactériennes exprimées en log (ufc/graine).

† : pour une même combinaison souche-dose, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**Tableau V-21. Influence de l'espèce bactérienne, de la concentration de la suspension de trempage et du pelliculage sur l'installation et la survie de *R. solanacearum* sur les graines de tomate.**

**A) Première expérimentation**

Dose d'inoculum :  $10^7$  ufc/mL.

Jour après l'inoculation	<i>R. solanacearum</i> souche A	<i>P. s. pv. tomato</i>	<i>X. vesicatoria</i>
0	4,89 * a †	4,99 a	4,53 a
1	1,98 b	2,74 c	3,84 b
5	0,00 ‡ c	2,90 b	3,04 c
13	0,00 c	2,89 b	3,05 c
19	0,00 c	1,73 d	1,79 d

\* : estimation des populations bactériennes exprimées en log (ufc/graine).

† : pour une même souche, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**B) Seconde expérimentation**

Jour après l'inoculation	Souche A		Souche C		<i>X. vesicatoria</i>	
	Dose d'inoculum (ufc/mL)		Dose d'inoculum (ufc/mL)		Dose d'inoculum (ufc/mL)	
	$10^5$	$10^8$	$10^5$	$10^8$	$10^5$	$10^8$
0	3,34 * a †	6,08 a	3,18 a	5,98 a	2,21 a	5,29 b
3	1,35 b	5,18 b	0,00 b	5,12 b	1,81 b	5,70 a
7	0,00 ‡ c	1,58 c	0,00 b	2,31 c	1,21 c	5,38 ab
13	0,00 c	0,00 d	0,00 b	2,01 c	0,00 d	4,30 c

\* : estimation des populations bactériennes exprimées en log (ufc/graine).

† : pour une même combinaison souche-dose, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**C) Troisième expérimentation**

Dose d'inoculum :  $10^8$  ufc/mL.

Jour après l'inoculation	Souche A		Souche C		<i>X. vesicatoria</i>	
	graines pelliculées	graines non pelliculées	graines pelliculées	graines non pelliculées	graines pelliculées	graines non pelliculées
0	6,08 * b †	6,89 a	5,98 b	6,88 a	5,29 c	6,66 a
3	5,18 c	6,62 a	5,12 c	6,56 a	5,70 b	5,90 b
7	1,58 f	3,28 d	2,31 e	3,72 c	5,38 b	5,90 a
13	0,00 ‡ d	2,28 c	2,01 e	3,38 b	4,30 a	4,55 a

\* : estimation des populations bactériennes exprimées en log (ufc/graine).

† : pour une même date, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes ( $P = 0,05$ ).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

**Tableau V-22. Influence du site d'inoculation et de la dose d'inoculum sur le pourcentage de germination des graines de tomate et de plantules viables (première expérience).**

Dose d'inoculum (ufc/mL)	Site d'inoculation	Sur milieu gélosé		En terreau	
		% de germination	% de plantules viables	% de germination	% de plantules viables
10 <sup>4</sup>	Base du fruit	77 <b>ab</b> *	48 <b>b</b>	63 <b>a</b>	100 <b>a</b>
	Pédoncule	74 <b>b</b>	74 <b>a</b>	57 <b>a</b>	75 <b>b</b>
10 <sup>7</sup>	Base du fruit	87 <b>a</b>	72 <b>a</b>	54 <b>a</b>	67 <b>b</b>
	Pédoncule	70 <b>b</b>	76 <b>a</b>	19 <b>b</b>	100 <b>a</b>

\* : pour une même colonne, les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

**Tableau V-23. Influence de la dose d'inoculum sur les pourcentages de germination et de plantules viables sur milieu gélosé à partir de graines de tomate issues de fruits inoculés (seconde expérience).**

Dose d'inoculum (ufc/mL)	% de germination	% de plantules viables
0	100 <b>a</b> *	100 <b>a</b>
10 <sup>4</sup>	88 <b>ab</b>	76 <b>b</b>
10 <sup>7</sup>	83 <b>b</b>	61 <b>b</b>

\* : pour une même colonne, les pourcentages suivis d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différents (P = 0,05).

**Tableau V-24. Variation du pourcentage de germination des graines issues de zones sans symptômes et de zones nécrosées de fruits contaminés par *R. solanacearum*.**

Numéro du plant	Sur milieu gélosé		En terreau	
	Zone saine	Zone nécrosée	Zone saine	Zone nécrosée
3	89 <b>a</b>	31 <b>b</b>	50 <b>a</b>	50 <b>a</b>
10	93 <b>a</b>	82 <b>b</b>	88 <b>a</b>	50 <b>b</b>
15	85 <b>a</b>	55 <b>b</b>	25 <b>a</b>	13 <b>b</b>

\* : pour un couple de pourcentages, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P = 0,05).

La comparaison des niveaux d'installation, sur graines pelliculées et lavées, des deux souches de *R. solanacearum* et de *X. vesicatoria* montre, au travers des résultats de trois expérimentations, qu'ils ne sont pas significativement différents (tableaux V-21A, B et C).

En revanche, la durée de survie est significativement différente entre les trois souches, pour les trois doses initiales d'inoculum appliquées. Pour la dose initiale de  $10^8$  ufc/mL, la durée de survie est inférieure à 13 jours pour la souche A mais est supérieure à 13 jours pour la souche C et pour *X. vesicatoria*, le niveau de population de *X. vesicatoria* étant alors significativement supérieur à celui de la souche C (4,30 versus 2,01) (tableau V-21B). Pour une dose initiale de  $10^7$  ufc/mL, la souche A se singularise toujours par une durée de survie inférieure à cinq jours alors qu'elle est supérieure à 19 jours pour les souches de *P. syringae* pv. *tomato* et de *X. vesicatoria*, les niveaux de populations pour ces deux souches étant alors faibles mais non significativement différents (1,73 et 1,79) (tableau V-21A). Dans le cas de la dose la plus faible ( $10^5$  ufc/mL), la durée de survie est inférieure à trois jours (souche C), à sept jours (souche A) et à 13 jours (*X. vesicatoria*) (tableau V-21B).

### V.2.2.3. Influence de la contamination des graines par *R. solanacearum* sur la germination et le développement des plants

#### V.2.2.3.1. Graines contaminées issues de fruits présentant des symptômes

Sur milieu gélosé, le taux de germination estimé lors de deux expérimentations séparées reste supérieur à 70 % quelle que soit la méthode d'inoculation du fruit ou la dose d'inoculum (tableaux V-22 et V-23). Une fraction des plantules issues de germination, variant de 48 à 76 %, s'est développée normalement, le reste ayant manifesté des symptômes nécrotiques, desquels *R. solanacearum* a pu être isolé, puis s'est finalement desséchée. Le dessèchement du milieu gélosé et le développement de contaminants fongiques ayant contraint de stopper l'expérience, les plantules viables n'ont pu être transférées dans du terreau.

En terreau, le taux de germination est plus faible (19 à 63 %), et toujours inférieur à celui observé sur milieu gélosé (tableau V-22). De plus, il apparaît qu'après germination sur milieu gélosé ou en terreau, les plantules ne sont pas toujours viables. Quelques plantules ont manifesté des symptômes de flétrissement desquels *R. solanacearum* n'a pu être isolé que parcimonieusement.

Les graines récoltées de fruits contaminés et provenant des zones fortement nécrosées montrent un taux de germination, sur milieu gélosé ou en terreau, significativement inférieur à celui des graines provenant de zones moins touchées, voire saines (tableau V-24).

#### V.2.2.3.2. Graines contaminées artificiellement

- Sur milieu gélosé

- ◊ Graines de tomate

Ces résultats intègrent ceux de trois expérimentations indépendantes.

La germination des graines de tomate est très rapide et ne semble pas être affectée par la contamination bactérienne. Des manifestations de symptômes sont observées au cours des 16 jours suivant l'inoculation (planche 6).

**Tableau V-25. Influence de la souche de *R. solanacearum* et de la dose d'inoculum sur la masse de cinq plantules de tomate (exprimée en g) issues de graines contaminées artificiellement.**

Dose d'inoculum (ufc/mL)	Souche A	Souche C
0	0,139 <b>ab</b> *	0,139 <b>ab</b>
10 <sup>2</sup>	0,074 <b>cd</b>	0,158 <b>a</b>
10 <sup>4</sup>	0,087 <b>cd</b>	0,108 <b>bc</b>
10 <sup>6</sup>	0,068 <b>cd</b>	0,111 <b>bc</b>
10 <sup>8</sup>	0,064 <b>d</b>	0,096 <b>bcd</b>

\* : les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P =0,05).

**Tableau V-26. Influence de la méthode de prétraitement des graines d'aubergine sur le pourcentage de germination.**

Prétraitement des graines	Temps (jours)		
	5	7	16
Témoin	16 <b>ab</b> *	24 <b>bc</b>	32 <b>c</b>
Ecrasement au pilon	14 <b>ab</b>	22 <b>c</b>	40 <b>ab</b>
Chaleur (37 °C)	8 <b>b</b>	22 <b>c</b>	43 <b>abc</b>
Eau de javel 5 min	24 <b>a</b>	37 <b>ab</b>	48 <b>ab</b>
Eau de javel 15 min	20 <b>a</b>	25 <b>abc</b>	48 <b>ab</b>
Eau oxygénée 5 min	14 <b>ab</b>	29 <b>abc</b>	36 <b>bc</b>
Eau oxygénée 15 min	20 <b>a</b>	38 <b>a</b>	51 <b>a</b>

\* : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P =0,05).



**Planche 6. Développement de jeunes plantules de tomate issus de graines contaminées par des concentrations croissantes de la souche A ou C de *Ralstonia solanacearum*.**

- haut de la planche : graines contaminées par la souche A.
- bas de la planche : graines contaminées par la souche C.
- de gauche à droite : témoin non inoculé, graines inoculées à  $10^2$ ,  $10^4$ ,  $10^6$  et  $10^8$  ufc/mL.

Après quatre jours, les plantules issues de graines inoculées avec la souche A (notées désormais plantules A) ont un comportement différent des plantules témoins : croissance retardée, racines peu développées et présentant quelques nécroses. Les cotylédons néoformés sont, cependant, indemnes de symptômes. Le retard de croissance des plantules A est fonction de la dose d'inoculum. Les plantules C, issues de graines inoculées avec la souche C, ne sont alors pas différentes des plantules témoins.

Après sept jours, les analyses bactériologiques des plantules A, C et témoins révèlent la présence de quantités importantes de *R. solanacearum* dans les tiges et les racines des plantules issues de graines contaminées et son absence des plantules témoins. Les estimations, non appuyées cependant sur des numérations précises, indiquent des différences selon la dose d'inoculation des graines et selon la souche (populations plus élevées pour A que pour C).

Au onzième jour, les tiges des plantules C commencent à se ramollir et à brunir; comme pour les plantules A, les vaisseaux, visibles par transparence, sont nécrosés. Les tissus racinaires des plantules C brunissent également.

Au douzième jour, les tissus des tiges des plantules C sont complètement ramollis et, pour les plus fortes concentrations d'inoculum, en état de liquéfaction. En revanche, les tissus racinaires restent encore fermes. Les plantules A ne se développent plus. A ce stade, trois échantillons de cinq plantules prélevés pour chaque combinaison souche-dose sont pesés. Les résultats (tableau V-25) montrent que les masses des plantules sont fonction à la fois de la souche et de la dose. La masse des cinq plantules C n'est pas significativement différente de celle des témoins alors que la différence est nette pour les plantules A.

A l'issue de 13 jours d'incubation, toutes les plantules A sont mortes, les tissus étant alors entièrement nécrosés et leur taille n'a jamais dépassé 3,5 cm. Le taux de mortalité des plantules C est fonction de la concentration de l'inoculum initial : la majorité des plantules issues de graines inoculées à  $10^2$  ufc/mL dépasse la taille de 10 cm alors que les plantules issues de graines inoculées à  $10^8$  ufc/mL sont mortes. La taille des plantules témoins est d'environ 15 cm.

Au terme de l'observation, toutes les plantules A et C sont mortes alors que les témoins continuent de se développer.

#### ◇ Graines d'aubergine

Sans traitement, les graines d'aubergine ont montré un taux de germination faible, y compris pour les graines non contaminées (32 %, 16 jours après inoculation). Les différents traitements appliqués n'ont eu qu'une incidence limitée sur la germination (tableau V-26). Cependant, un bain de 15 min dans de l'eau oxygénée ou de l'eau de javel fait passer le taux de germination de 32 à 51 %. Les graines d'aubergine sont directement transférées en terreau après germination sur milieu gélosé

- En terreau

#### ◇ Graines de tomate

Les 30 à 40 plantules A ou C transférées vers le terreau après 11 jours d'incubation sur milieu gélosé, ne se développent pas contrairement aux plantules témoins.

En revanche, des graines fraîchement contaminées par *R. solanacearum* montrent un taux de germination en terreau de 93 % (souche A) à 99 % (souche C et témoin), la différence étant significative.

Après 16 jours, les plantules ne présentent aucun symptôme de flétrissement mais des analyses révèlent la présence de *R. solanacearum* dans un échantillon de plantules C, essentiellement.

Plus de deux mois après l'inoculation, l'analyse des plants restants (40 par dose d'inoculum et par souche) montre que *R. solanacearum* n'est plus détecté dans les plants A, mais toujours présent et en abondance dans les plants C et en particulier dans les plants dont les graines ont été inoculées par les doses  $10^6$  et  $10^8$  ufc/mL. Par ailleurs, des flétrissements sont observés pour une majorité des plants C, cinq plants présentant des symptômes évolués de flétrissement et 25 un début de symptômes.

#### ◇ Graines d'aubergine

Dans le cas des graines d'aubergine transférées en terreau après germination sur milieu gélosé, les résultats sont biaisés par le pourcentage élevé de plantules témoins contaminés par *R. solanacearum* probablement lors du repiquage ou des arrosages. Cependant, les analyses effectuées sur une période de trois mois confirment la présence de *R. solanacearum* dans une forte proportion de plants. De plus, 23 sur 900 plants ont manifesté des symptômes de flétrissement, la majorité de ces plants (18) étant issus de graines contaminées par de fortes concentrations de la souche C.

### V.2.3. Discussion

L'étude de la transmission potentielle de *R. solanacearum* par les graines est divisée en plusieurs parties considérant les différentes étapes du cycle biologique de la plante. Les résultats permettent désormais d'apporter la réponse aux questions posées sur le rôle de la semence vraie dans la dissémination du flétrissement bactérien.

La première interrogation concerne la capacité d'un plant contaminé à produire des fruits et des graines contaminées. Un élément de réponse est basé sur l'observation, dans une parcelle naturellement contaminée par *R. solanacearum*, de deux fruits manifestant des symptômes sous forme d'une nécrose des vaisseaux à proximité de la zone d'insertion du pédoncule et desquels d'abondantes populations bactériennes ont été isolées. Ces deux fruits étaient situés à la base d'un plant en phase primaire de flétrissement et donc fortement infecté par la bactérie. Comme la propagation de *R. solanacearum* dans un plant s'effectue depuis les racines vers l'apex via les vaisseaux du xylème, l'observation réalisée permet donc d'envisager une contamination progressive des fruits selon le même axe. Toutefois, les fruits portés par les tiges les plus hautes du plant ont une probabilité plus faible d'être contaminés puisqu'il existe généralement un gradient décroissant des populations de *R. solanacearum* des racines vers l'apex (Nicole, 1995). Malgré une observation détaillée, aucun autre fruit de la parcelle n'a présenté de symptômes similaires voire conduit à l'isolement de *R. solanacearum* ce qui confirme la faible probabilité d'une contamination naturelle des fruits.

Les inoculations effectuées sur fruits détachés ou sur fruits présents sur plants (au niveau du pédoncule et à la base des fruits) montrent que, quel que soit le mode d'inoculation, *R. solanacearum* est capable d'induire le développement de symptômes sur fruits de tomate. Même si l'expérience sur fruits détachés a été perturbée par la présence de larves de la mouche de la tomate, les symptômes obtenus sont similaires à ceux constatés sur fruits inoculés directement sur plant. Les symptômes observés (ramollissement, brunissement, pourriture de la pulpe comme de la chair) sont à rapprocher des symptômes de la pourriture brune, « Brown

rot », causés par *R. solanacearum* sur tubercules de pomme de terre. Extérieurement, les fruits de tomate apparaissent sains mais des ramollissements sont cependant observés dans le cas de fortes pourritures internes. Par ailleurs, les vaisseaux des fruits de tomate sont assez fréquemment nécrosés. Ces vaisseaux peuvent véhiculer *R. solanacearum* puisqu'en inoculant la base du fruit, la bactérie est détectée au niveau du pédoncule et même au niveau de l'axe de la grappe de fruits. Ceci implique donc une circulation de la bactérie par les vaisseaux du phloème. L'inoculation des fruits au niveau du pédoncule est particulièrement intéressante car plus proche d'un mode de contamination naturelle. Selon ces conditions expérimentales, l'induction du développement de symptômes sur fruits, confirme bien un rôle des vaisseaux dans la propagation de *R. solanacearum*. Des expérimentations complémentaires montrent que l'inoculation de la tige de tomate en dessous de l'insertion du corymbe floral peut conduire à la contamination des fruits résultants, avec ou sans manifestation de symptômes externes et à celle concomitante des graines.

Dans nos expérimentations, *R. solanacearum* n'a pas été isolé de tous les fruits avec symptômes, en particulier de ceux présentant une pourriture très avancée. Il est probable que *R. solanacearum* soit, dans ces cas, à l'origine des premières dégradations du fruit mais que d'autres micro-organismes (bactéries ou champignons très souvent isolés), pathogènes ou commensaux, soient intervenus par la suite pour générer une pourriture secondaire plus intense entraînant alors l'élimination de *R. solanacearum*. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait suivre l'évolution des populations de *R. solanacearum* dans les fruits inoculés par des prélèvements réguliers. La vitesse d'évolution des symptômes a certainement été sous-estimée et des prélèvements quotidiens auraient sans aucun doute fourni plus d'informations. On peut d'ailleurs constater, lors du dernier prélèvement de fruits en serre, que les tomates restantes présentaient moins de symptômes, les tomates durablement infectées étant vraisemblablement déjà toutes pourries donc tombées ou prélevées.

L'analyse des graines des fruits inoculés montre que *R. solanacearum* peut y être détecté quelle qu'ait pu être la méthode d'inoculation. De plus, le niveau d'infection d'une graine peut être très élevé, supérieur à  $10^6$  ufc/graine, valeur d'ailleurs jamais atteinte lors des contaminations par trempage suivie ou non d'infiltration sous vide des graines. La contamination des fruits peut engendrer un retard de développement et même une nécrose des graines conduisant à une perte de capacité germinative. Et, dans le cas de fruits présentant des symptômes très évolués, les graines sont totalement dégradées. Seuls des fruits peu atteints mais hébergeant la bactérie, peuvent être à l'origine de la contamination de graines ayant toujours leur capacité germinative et dès lors susceptibles de disséminer *R. solanacearum*. On peut donc conclure que la graine de tomate peut être contaminée à partir d'un fruit infecté par *R. solanacearum*, que celui-ci présente ou non des symptômes externes. Une infection intense conduit à une pourriture totale du fruit et par là à une altération des graines et une perte partielle ou totale de capacité germinative. Des zones d'ombre subsistent cependant en ce qui concerne la localisation des bactéries au niveau de la graine, superficielle ou plus profonde ?

La seconde interrogation concerne la durée de survie des bactéries présentes au niveau de la graine, quelle qu'en soit la localisation, en fonction des traitements physiques (chocs, séchage, conservation au froid) ou chimiques (traitements antifongiques) qui peuvent leur être imposés.

Les semences commercialisées, recouvertes d'un pelliculage contenant parmi divers excipients, un fongicide le thirame, ne peuvent être contaminées par la bactérie. Les différents

pré-traitements appliqués à la semence n'ont pas d'efficacité absolue puisque le niveau d'installation des bactéries y est resté significativement inférieur à celui obtenu avec des graines extraites de fruits, donc non pelliculées. Un ou plusieurs lavages avec du tampon chauffé à 37 °C ou l'utilisation de charbon activé (McGuire & Jones, 1989) ne suffisent pas à éliminer totalement le thirame et les autres composants du pelliculage qui s'est révélé un excellent protecteur contre une contamination, *a posteriori*, des semences. On peut cependant imaginer que le pelliculage de semences contaminées de manière profonde, ne puisse pas modifier la probabilité d'une transmission de la bactérie et du développement d'une plantule porteuse de la bactérie.

Néanmoins, un trempage des semences dans une suspension bactérienne, pendant 3 h à 4 °C permet d'installer les bactéries à leur surface même si le niveau de population estimé après macération (une nuit à 4 °C) peut être considéré comme faible : au plus 1 % du niveau théorique calculé sur la base de la concentration de la suspension. L'étude de la durée de survie des bactéries à la surface de la semence a dû être effectuée essentiellement sur des semences pelliculées, ce qui explique, au moins en partie, les valeurs plutôt faibles de cette durée. En effet, sur semences non pelliculées la durée de survie est significativement augmentée. Sur semences pelliculées, après inoculation, les populations de la souche A diminuent plus ou moins rapidement pour disparaître entre cinq et treize jours. En revanche, les populations de la souche C se maintiennent mieux puisqu'elles peuvent survivre au delà de treize jours. La comparaison effectuée avec *P. syringae* pv. *tomato* et *X. vesicatoria*, bactéries connues pour être véhiculées par la semence de tomate (Bashan *et al.*, 1982; Kritzman, 1991), montre que *R. solanacearum* (souches A et C) possède une capacité de survie au niveau des semences de tomate plus faible que celle des deux autres pathogènes de la tomate.

Néanmoins, il est possible que la durée de survie de *R. solanacearum* sur des graines extraites de fruits contaminés soit supérieure à celle de graines artificiellement contaminées. En effet, le taux d'infection de ces graines est supérieur à celui de graines contaminées par trempage dans une suspension bactérienne. Il faudrait alors le confirmer. La faible durée de survie de *R. solanacearum* au niveau des graines suggère une contamination exclusivement externe, cette localisation n'offrant pas *a priori* des conditions favorables à la survie de la bactérie. Les résultats de PCR obtenus avec de l'ADN bactérien extrait par la méthode d'Audy *et al.* (1996) vont également dans le sens d'une contamination superficielle des graines. Il faudrait pour confirmer cette hypothèse désinfecter la surface des graines par un traitement chimique comme il peut être préconisé (Honervogt & Lehmann-Danzinger, 1992). Vraisemblablement, le séchage sous hotte à flux laminaire et la conservation au froid (4 °C) des graines contaminées, procédures employées dans nos expérimentations, constituent des conditions défavorables à la survie des bactéries à la surface des graines, expliquant alors un taux d'infection très faible et une mortalité importante en quelques jours. Le traitement par séchage de graines d'arachide à température ambiante a d'ailleurs permis d'éliminer les populations de *R. solanacearum* (70 % au bout de 7 jours, 100 % en moins de 28 jours) naturellement présentes ou inoculées (jusqu'à  $3.10^9$  ufc/mL) (Machmud & Middleton, 1991; Zhang *et al.*, 1993).

La troisième interrogation concerne le devenir des graines contaminées par *R. solanacearum*.

Le taux de germination des graines de tomate, estimé sur milieu gélosé, n'est pas significativement affecté par la présence de *R. solanacearum*. En revanche, toutes les plantules issues de graines contaminées manifestent ultérieurement des symptômes intégrant ramollissement, brunissement et nécrose des tissus et conduisant à une mort en 15 jours. En terreau, la baisse du taux de germination est plus nette, en particulier pour l'une des souches bactériennes. Un retard de croissance est aussi observé, mais les plantes ont pu se développer normalement malgré la présence confirmée de *R. solanacearum* dans une fraction d'entre elles. Des symptômes de flétrissement sont constatés sur des plants alors âgés de deux mois. Sur milieu gélosé la germination des graines de tomate étant extrêmement rapide (deux jours), les bactéries localisées à la surface des graines, en début de phase de déclin, peuvent attaquer les tissus très sensibles des jeunes plantules très rapidement dès leur sortie du tégument de la graine. Très vite, des symptômes apparaissent entraînant la mort des plantules. En terreau, la germination étant plus tardive (quatre à sept jours), les bactéries peuvent détruire les plantules en les attaquant à leur sortie du tégument, d'où une diminution du taux de germination. ou bien peuvent les coloniser mais sans engendrer de symptômes précoces, les populations bactériennes étant devenues trop faibles. Des conditions favorables (chambre climatique à 30 °C) à la multiplication des bactéries ont, par la suite, contribué à l'apparition de quelques flétrissements.

La démonstration est convaincante : une graine contaminée germe ou ne germe pas selon le niveau de contamination par *R. solanacearum*. Certaines plantules peuvent aussi ne pas survivre plus de quelques jours et les plantes ayant réussi à se développer normalement peuvent être porteuses de la bactérie et exprimer plus ou moins tardivement des symptômes de flétrissement.

Enfin, la souche de biovar 3 (souche A) semble beaucoup plus agressive que la souche de biovar 2 (souche C) dans nos conditions expérimentales. En effet, sur milieu gélosé, les plantules de tomate issues des graines inoculées par la souche A développent des symptômes et sont détruites beaucoup plus rapidement que les plantules issues des graines inoculées par la souche C. De plus, en terreau, la souche A entraîne une diminution significative du taux de germination des graines de tomate, ce qui n'est pas le cas pour la souche C. En revanche, la souche A révèle une capacité de survie plus faible que la souche C. Effectivement, en terreau, 15 jours après l'inoculation des graines, la souche A n'est quasiment plus détectée dans les plantules de tomate alors que deux mois après inoculation des graines, la souche C y est toujours détectée. Par ailleurs, seule la souche C est capable d'engendrer des symptômes de flétrissement sur tomate. Dans le cas des graines d'aubergine, la souche C a démontré la meilleure capacité de survie et a entraîné, des symptômes de flétrissement sur quelques plants. Ce résultat laisse penser que la gamme d'hôtes de la race 3 (biovar 2), dont la souche C est un représentant, est probablement plus large que celle habituellement avancée (pomme de terre et tomate), et qu'elle inclut au moins aussi l'aubergine. De plus, certaines plantes adventices, telles la morelle douce-amère et la morelle noire, ont été rapportées comme des hôtes des souches de biovar 2 (Elphinstone, 1996; Janse, 1996; Elphinstone *et al.*, 1998; Hayward *et al.*, 1998).

**Tableau V-27. Caractéristiques comparées des grandes classes de sols de l'île de la Réunion.**

Type de sol	Couleur	Consistance	Argile (%)	Densité apparente	Perméabilité	Matière organique (0-20 cm) (%)	pH (eau)	C.E.C. (meq%)
Andosol	brun-beige	très friable	40 - 60	0,3 - 0,6	très forte	15 - 30	4 - 5	30 - 80
Sol ferrallitique	rouge	friable	60 - 75	1	forte	6	5	8
Sol brun	brun - jaune à brun - rouge	ferme	40 - 50	1,2 - 1,5	moyenne	6	6.5	10 - 20
Vertisol	brun gris - foncé	compact	50 - 75	1,8 - 2,1	très faible	4	7	25 - 30

## V.3. Influence du type de sol sur la survie de *R. solanacearum* et sur le développement du flétrissement bactérien

### Introduction

Il existe peu d'informations sur la phase tellurique de *R. solanacearum* en raison de la difficulté à détecter la bactérie mais aussi à suivre son évolution dans le sol. En outre, le sol est connu comme un milieu très complexe où de multiples facteurs physiques, chimiques, biologiques ou encore climatiques interagissent. L'ensemble de ces difficultés fait que les études dans ce domaine ne sont, le plus souvent, que descriptives, sans explication scientifique sûre, et peuvent être entre elles très contradictoires (Buddenhagen & Kelman, 1964; Hayward, 1991).

Il semble pourtant évident que le sol joue un rôle dans la phase de conservation du pathogène et sur sa capacité à infecter les plantes. Certains sols sont rapportés comme très réceptifs à *R. solanacearum* et d'autres nettement moins, la réceptivité d'un sol étant définie comme sa capacité à permettre à un agent pathogène de s'installer, se conserver et exprimer ses propriétés infectieuses (Rouxel *et al.*, 1991). De même, l'aptitude de *R. solanacearum* à survivre dans un sol nu reste très controversée.

L'objectif de cette étude est donc de tenter de clarifier certains aspects de la phase tellurique de *R. solanacearum* en comparant la survie de la bactérie dans un sol nu et dans un sol cultivé d'une part et en évaluant l'influence du type de sol sur la survie de la bactérie et sur l'expression de son pouvoir pathogène d'autre part.

### V.3.1. Matériels et méthodes

#### V.3.1.1. Matériels

##### V.3.1.1.1. Souches bactériennes

Toutes les expériences sont effectuées avec les souches de référence du laboratoire, A (biovar 3) et C (biovar 2) de *R. solanacearum*.

##### V.3.1.1.2. Types de sol

Quatre sols naturels (sol brun, sol ferrallitique, andosol et vertisol), correspondant aux quatre principaux types de sol présents sur l'île de la Réunion, sont utilisés. Ces sols naturels, dont les principales caractéristiques sont présentées dans le tableau V-27, ont été prélevés dans des zones isolées sans culture ou sur des parcelles cultivées d'espèces non hôtes de la bactérie (manguier et canne à sucre).

##### V.3.1.1.3. Matériel végétal

La variété de tomate Roma VF sensible au flétrissement bactérien est utilisée.

### V.3.1.2. Méthodes

#### V.3.1.2.1. Qualité microbiologique des sols utilisés

La vérification de l'absence de populations naturelles de *R. solanacearum* dans les différents prélèvements de sol est impérative avant leur contamination artificielle par les souches A et C. Plusieurs échantillons de chaque type de sol sont mis en suspension dans du Tris et broyés à l'Ultra-Turrax. Des aliquotes (50 µL) sont prélevées, des dilutions au dixième sont réalisées puis sont étalées sur le milieu semi-sélectif de Granada et Sequeira (1983b) modifié. Après trois jours d'incubation à 28 °C, les colonies suspectes sont prélevées et remises en culture durant 24 h. La sub-culture est mise en suspension dans du tampon Tris puis placée au bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes pour permettre la lyse des bactéries et la libération de l'ADN. L'emploi des amorces RS30-RS31, spécifiques de l'espèce *R. solanacearum* (cf. chapitre III.1.1.), permet de vérifier l'appartenance des colonies isolées à l'espèce *R. solanacearum*.

La mise en culture permet également d'apprécier l'abondance de la flore microbienne présente dans chaque type de sol.

#### V.3.1.2.2. Influence du type de sol sur la durée de survie de *R. solanacearum* (sol nu)

Cinq kg de chaque type de sol tamisé sont répartis dans des barquettes puis sont inoculés par 1 L de suspension bactérienne, dosée à  $10^6$  ufc/mL, de chacune des deux souches. Les barquettes sont placées en chambre climatique à 28 °C, et une humidification régulière et modérée du sol est réalisée de manière à éviter la saturation du sol en eau mais aussi sa dessiccation. Afin de comparer les sols de façon plus homogène, il aurait fallu maintenir les sols à un potentiel hydrique identique quel que soit le type de sol mais nous ne disposons pas d'un tensiomètre pour mesurer ce potentiel.

Des prélèvements de sol sont effectués 1, 2, 5, 9, 16, 23, 30, 40 jours après inoculation afin de suivre la dynamique des populations bactériennes dans chaque type de sol. Etant donné l'importance de l'échantillon (5 kg) et afin d'obtenir une estimation correcte de la population bactérienne, trois zones de prélèvement sont définies : une zone centrale, une zone médiane et une zone latérale. Un échantillon de 20 g de sol est alors constitué. Cet échantillon est mis en suspension dans 100 mL de tampon Tris puis broyé pendant 30 s à l'Ultra-Turrax; le broyat est alors ensemencé sur le milieu sélectif approprié (A ou C). Après une incubation de quatre à cinq jours à 28 °C, les colonies sont dénombrées.

#### V.3.1.2.3. Influence du type de sol sur l'expression du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur une plante sensible et sur la durée de survie de la bactérie dans le sol

- Dispositif expérimental

- Les plants de tomate au stade deux feuilles issus de semis sont repiqués dans des barquettes contenant les sols étudiés à raison de 50 plants par barquette. Les sols sont

Tableau V-28. Comparaison de l'évolution du niveau des populations de *R. solanacearum* (souches A et C), inoculées à  $10^6$  ufc/mL, pour chaque combinaison sol-souche.

Jour après inoculation	Andosol		Sol brun		Sol ferrallitique		Vertisol	
	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C
1	6,02 *a †	6,02 a	5,71 a	5,32 a	5,67 a	5,56 a	5,65 a	5,48 a
2	5,60 ab	5,29 b	5,73 a	5,33 a	5,58 a	5,32 a	5,59 a	4,95 b
5	5,43 bc	ND	5,60 a	5,39 a	5,53 a	5,19 a	5,05 a	4,61 c
9	5,30 bc	ND	5,59 a	2,35 c	5,57 a	3,56 b	5,35 a	0,00 d
16	5,29 bc	4,91 c	0,00 b	ND	5,32 a	1,83 c	1,96 b	0,00 d
23	5,13 cd	0,00 ‡ d	0,00 b	3,01 b	4,42 b	2,12 c	0,00 c	0,00 d
30	4,83 de	0,00 d	0,00 b	2,75 b	0,00 c	2,25 c	0,00 c	0,00 d
40	4,70 e	0,00 d	0,00 b	2,69 b	0,00 c	2,08 c	0,00 c	0,00 d

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/mL).

† : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

ND : les populations bactériennes n'ont pu être estimées en raison de la contamination du milieu de culture.

Tableau V-29. Evolution dans le temps du niveau des populations de *R. solanacearum* (souches A et C), inoculées à  $10^6$  ufc/mL dans chaque type de sol et comparaison des combinaisons sol-souche à chaque date d'observation.

Jour après inoculation	Andosol		Sol brun		Sol ferrallitique		Vertisol	
	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C	Souche A	Souche C
1	6,02 *a †	6,02 a	5,71 ab	5,32 c	5,67 ab	5,56 bc	5,65 bc	5,48 bc
2	5,60 a	5,29 b	5,73 a	5,33 b	5,58 a	5,32 b	5,59 a	4,95 c
5	5,43 ab	ND	5,60 a	5,39 ab	5,53 a	5,19 bc	5,05 c	4,61 d
9	5,30 a	ND	5,59 a	2,35 c	5,57 a	3,56 b	5,35 a	0,00 d
16	5,29 a	4,91 a	0,00 d	ND	5,32 a	1,83 b	1,96 b	0,00 d
23	5,13 a	0,00 ‡ d	0,00 d	3,01 b	4,42 a	2,12 c	0,00 d	0,00 d
30	4,83 a	0,00 c	0,00 c	2,75 b	0,00 c	2,25 b	0,00 c	0,00 c
40	4,70 a	0,00 d	0,00 d	2,69 b	0,00 d	2,08 c	0,00 d	0,00 d

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/mL).

† : pour une même ligne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

‡ : correspond à une valeur en dessous de la limite inférieure de détection, 20 ufc/mL; elle est fixée arbitrairement à zéro.

ND : les populations bactériennes n'ont pu être estimées en raison de la contamination du milieu de culture.

inoculés par ajout de 500 mL de suspension des souches A ou C dosées à  $10^4$ ,  $10^6$  ou  $10^8$  ufc/mL; une barquette témoin est préparée pour chaque sol étudié. Les barquettes sont placées en chambre climatique à la température moyenne de 28 °C et à une humidité relative variant entre 90 et 95 %. Les plants sont régulièrement arrosés afin d'éviter tout stress hydrique de la plante et des traitements (insecticide, fongicide, engrais) sont appliqués si nécessaire.

- Suivi du taux de flétrissement

Une notation quotidienne, sur une période de 30 jours, des plants flétris permet d'estimer le taux de flétrissement. Des symptômes atypiques peuvent être observés; ils sont en général dus à l'action de champignons présents dans le sol. L'absence de *R. solanacearum* est alors confirmée par une analyse du plant atteint.

- Suivi des populations bactériennes dans le sol

Par manque de temps, cette expérimentation est réalisée uniquement pour le sol brun et le sol ferrallitique. Des prélèvements réguliers (tous les sept jours) de 20 g de sol sont effectués pour suivre l'évolution des populations bactériennes dans le sol. Les prélèvements de sol, le broyage ainsi que le dénombrement des populations bactériennes sont réalisés de la même manière que lors de l'étude de la conservation de la bactérie dans un sol nu.

#### V.3.1.2.4. Traitements statistiques des données

La comparaison des estimations de niveaux de populations est réalisée après une transformation logarithmique et celle des taux de flétrissement ( $x$ ) après une transformation de type  $y = \arcsin \sqrt{x/100}$  qui permet de considérer comme normale la distribution des données. Les analyses de variance sont effectuées à partir des données ainsi transformées, et suivies, le cas échéant, d'une comparaison de moyennes par la méthode des ranges de Duncan. Les conditions préalables à la mise en oeuvre d'une analyse de variance sont vérifiées, en particulier l'homogénéité des variances. En cas d'impossibilité d'effectuer une analyse de variance, les données sont comparées par application d'une méthode non paramétrique (test de Kramer). Un ajustement des données à une droite, après transformation appropriée si nécessaire, est tenté pour illustrer l'évolution dans le temps des populations bactériennes dans le sol et du taux de flétrissement.

### V.3.2. Résultats

#### V.3.2.1. Qualité microbiologique des sols utilisés

Les quatre sols utilisés ne contiennent pas de *R. solanacearum* à un niveau détectable comme le confirme le résultat négatif des étalements d'extraits de sol sur milieu de Granada et Sequeira modifié. Cependant, dans le cas de l'andosol, des colonies suspectes ont nécessité l'utilisation de la PCR pour confirmer l'absence de la bactérie.

Par ailleurs, il apparaît que la flore microbienne totale mise en évidence sur les milieux de culture est très variable selon le type de sol : très abondante dans l'andosol, moyennement abondante dans le sol ferrallitique, peu abondante dans le sol brun, et très peu abondante dans le vertisol. Toutefois aucune numération n'a été faite.

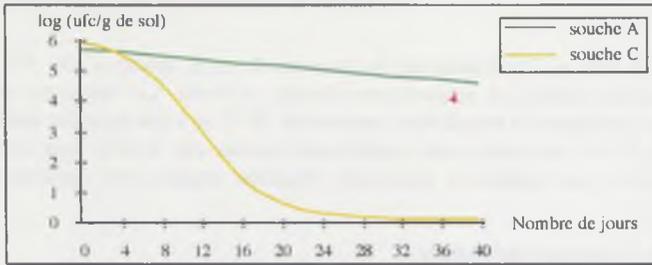


Figure V-8. Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées à l'andosol à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

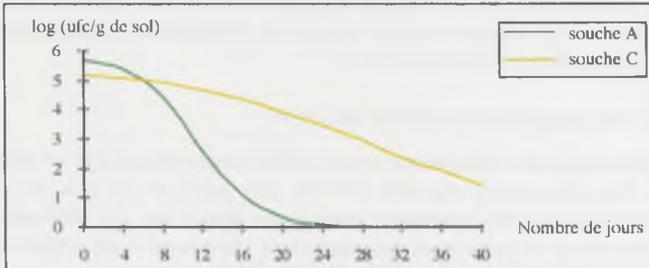


Figure V-9. Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au sol brun à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

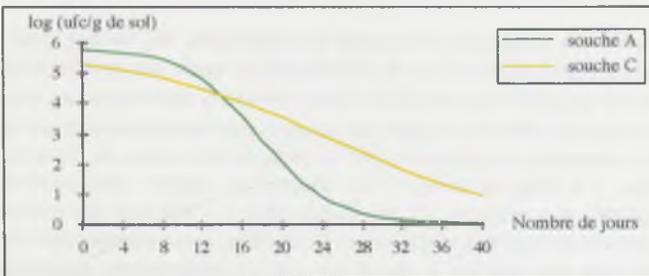


Figure V-10. Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au sol ferrallitique à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

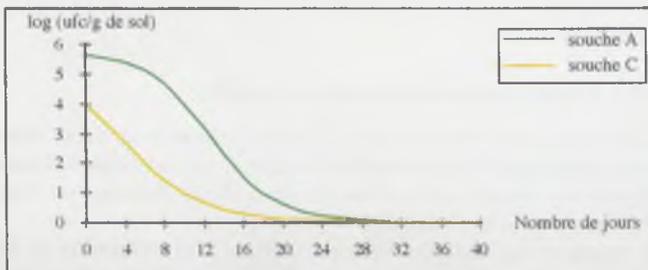


Figure V-11. Evolution des populations des souches A et C de *R. solanacearum* inoculées au vertisol à  $10^6$  ufc/mL (après modélisation).

### V.3.2.2. Influence du type de sol sur la durée de survie de *R. solanacearum* (sol nu)

L'analyse de variance montre que, pour toutes les combinaisons souche-sol, des différences significatives existent entre les estimations des populations dans le temps, ce qui indique une diminution (tableau V-28). La diminution lente dans le cas de la souche A dans l'andosol ou plus marquée pour la souche C dans les sols brun et ferrallitique, n'entraîne pas la disparition totale de la bactérie durant les 40 jours de l'expérimentation. En revanche, dans les autres cas, la diminution des populations aboutit à une disparition totale dès le neuvième jour (souche C dans le vertisol), le seizième jour (souche A dans le sol brun), le vingt-troisième jour (souche A dans le vertisol et souche C dans l'andosol) ou le trentième jour (souche A dans le sol ferrallitique). Ces différences d'évolution sont illustrées par les courbes obtenues après modélisation (figures V-8 à V-11). La modélisation permettant d'estimer un temps de demie-survie des populations, la comparaison de ces estimations confirme les différences d'évolution selon la souche ou le type de sol. Le temps de demie-survie est estimée à 209 jours pour la souche A dans l'andosol. Il passe à 29 et 24 jours pour la souche C dans les sols brun et ferrallitique et à 18 jours pour la souche A dans le sol ferrallitique. Il est voisin de 12 jours dans les autres cas sauf pour la souche C dans le vertisol où il est inférieur à 4 jours.

L'évolution des populations dans un même type de sol varie significativement en fonction de la souche (tableau V-29). La diminution des populations est plus marquée et/ou leur disparition est plus rapide pour la souche C dans l'andosol et le vertisol; la situation est inversée dans le cas des sols brun et ferrallitique dans lesquels la souche A disparaît plus rapidement que la souche C.

### V.3.2.3. Influence du type de sol sur l'expression du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur une plante sensible et sur la durée de survie de la bactérie dans le sol

#### V.3.2.3.1. Evolution du taux de flétrissement de plants de tomate

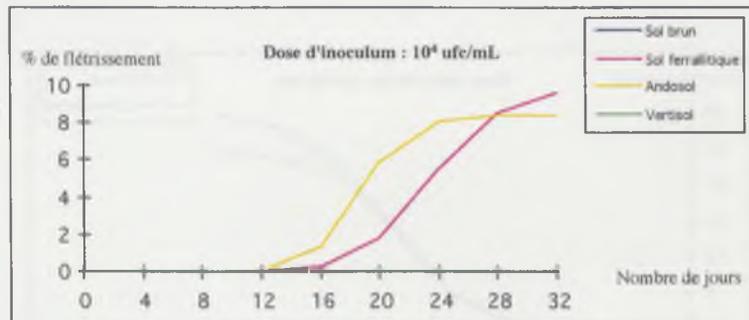
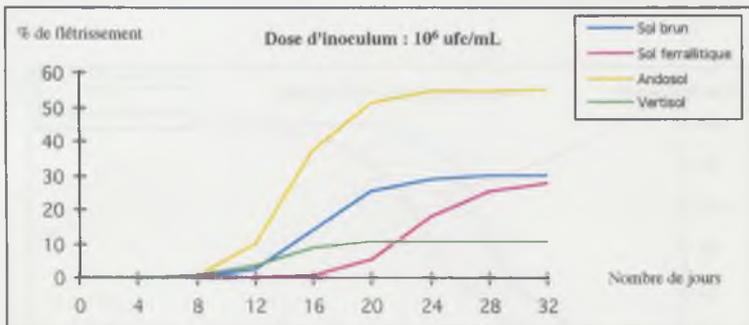
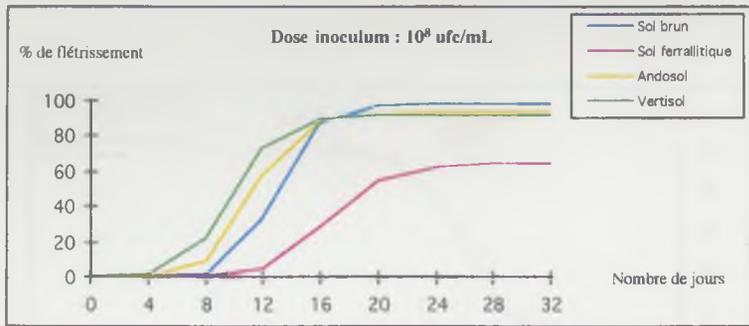
Dans les barquettes témoins, non contaminées, contenant soit du sol brun soit du sol ferrallitique, des plants de tomate flétris sont observés. L'analyse de ces plants ne confirme pas la présence de *R. solanacearum* car aucune colonie, manifestant les caractéristiques morphologiques de cette espèce, ne s'est développée sur le milieu de culture. Ces flétrissements sont vraisemblablement dus à l'action de champignons présents dans le sol.

Par manque de temps, l'inoculation de l'andosol et du vertisol par la souche C n'a pu être effectuée.

L'évolution des taux de flétrissement est modélisée selon une courbe de type sigmoïde, après ajustement linéaire des données. Les paramètres de la régression linéaire sont significatifs quels que soient le sol, la souche ou la dose d'inoculum. L'évolution du pourcentage de plants flétris peut se décomposer en trois phases : une phase de latence qui sépare l'inoculation de l'apparition du premier symptôme de flétrissement, une phase d'augmentation rapide et linéaire du taux de flétrissement, et enfin une phase pendant laquelle le nombre de plants flétris n'évolue plus beaucoup.

Tableau V-30. Comparaison par un test de Gstat des pourcentages finaux de flétrissement pour chaque combinaison souche-sol-concentration permettant la distinction de groupe.

Souche	Type de sol	Dose d'inoculum (ufc/mL)	Pourcentage de flétrissement	Groupe
C	Brun	10 <sup>6</sup>	100 %	I
C	Brun	10 <sup>8</sup>	100 %	I
C	Ferrallitique	10 <sup>8</sup>	100 %	I
A	Brun	10 <sup>8</sup>	98 %	I
C	Ferrallitique	10 <sup>6</sup>	96 %	I
A	Andosol	10 <sup>8</sup>	93 %	I
A	Vertisol	10 <sup>8</sup>	92 %	I
A	Ferrallitique	10 <sup>8</sup>	64 %	II
A	Andosol	10 <sup>6</sup>	55 %	II
C	Brun	10 <sup>4</sup>	30 %	III
A	Brun	10 <sup>6</sup>	30 %	III
A	Ferrallitique	10 <sup>6</sup>	28 %	III
C	Ferrallitique	10 <sup>4</sup>	24 %	III
A	Vertisol	10 <sup>6</sup>	10 %	IV
A	Ferrallitique	10 <sup>4</sup>	10 %	IV
A	Andosol	10 <sup>4</sup>	8 %	IV
A	Brun	10 <sup>4</sup>	0 %	V
A	Vertisol	10 <sup>4</sup>	0 %	V



**Figure V-12. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate en fonction du type de sol et de la dose d'inoculum (souche A) (après modélisation).**

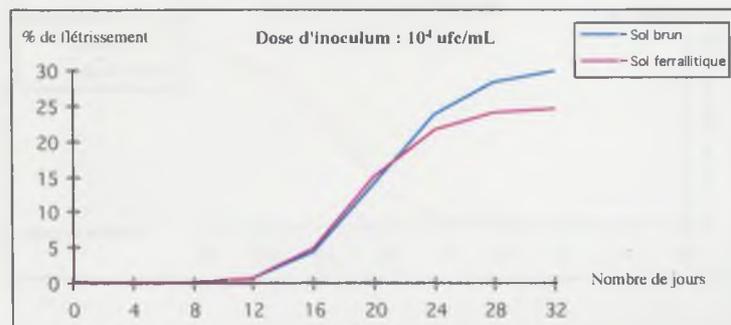
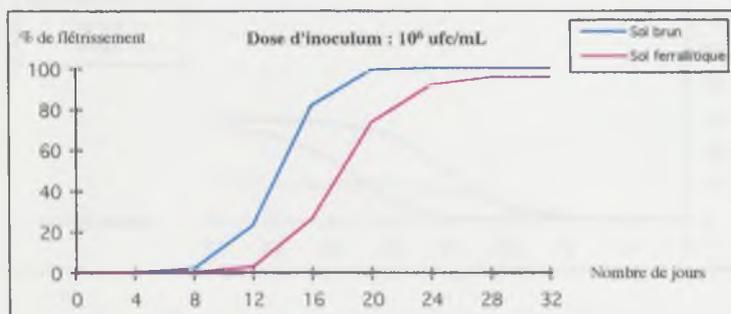
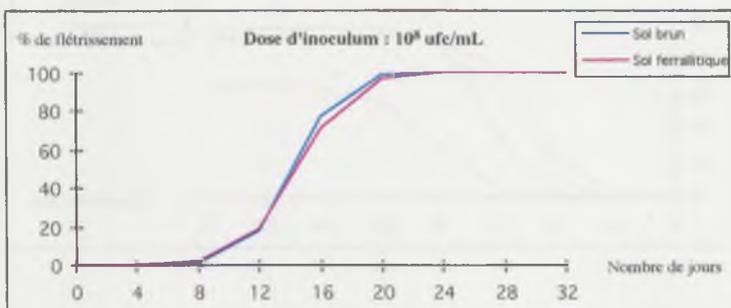


Figure V-13. Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate en fonction du type de sol et de la dose d'inoculum (souche C) (après modélisation).

Afin de comparer les pourcentages de flétrissement finaux, un test Gstat est appliqué aux différentes combinaisons sol-souche-concentration. Cette analyse permet de distinguer cinq groupes significativement différents (tableau V-30).

Pour la souche A inoculée à  $10^8$  ufc/mL (figure V-12) dans l'andosol, le sol brun et le vertisol, les premiers symptômes apparaissent après une courte phase de latence (cinq jours), et quasiment tous les plants sont flétris au bout de 20 jours. Ces pourcentages sont significativement différents de celui obtenu pour le sol ferrallitique, qui n'est que de 64 % au bout de 25 jours et les premiers symptômes n'apparaissent qu'au bout de 10 jours. La souche A inoculée à  $10^6$  ufc/mL entraîne 55 % de flétrissement dans l'andosol, ce pourcentage est significativement différent de celui obtenu dans les autres sols. En effet, environ 30 % de plants flétris sont observés dans le sol brun et le sol ferrallitique, avec dans le sol ferrallitique une phase de latence plus longue mais un nombre de plants flétris augmentant plus rapidement. Pour le vertisol, le pourcentage de flétrissement est significativement différent de celui des autres sols, avec seulement 10 % de plants flétris. Aucun symptôme de flétrissement n'est constaté dans le sol brun ou le vertisol inoculés avec une suspension dosée à  $10^4$  ufc/mL. Cependant, pour cette même concentration d'inoculum, 8 et 10 % de flétrissement sont observés dans l'andosol et le sol ferrallitique, avec une phase de latence plus longue dans le sol ferrallitique.

L'inoculation des sols brun et ferrallitique par la souche C dosée à  $10^8$  ufc/mL (figure V-13) provoque le flétrissement rapide de tous les plants et les premiers symptômes sont notés avant le cinquième jour d'incubation. La souche C inoculée à  $10^6$  ufc/mL induit 100 % de flétrissement dans les deux sols inoculés, avec un temps d'incubation plus long pour le sol ferrallitique. De plus, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les concentrations  $10^6$  et  $10^8$  ufc/mL inoculées aux deux sols. La souche C inoculée à  $10^4$  ufc/mL entraîne 24 et 30 % de flétrissement dans les sols ferrallitique et brun respectivement, les premiers symptômes apparaissant environ 10 jours après l'inoculation.

#### V.3.2.3.2. Evolution des populations de *R. solanacearum* dans le sol

Cette expérience a été réalisée uniquement dans les sols brun et ferrallitique.

Les variances de l'ensemble des données étant homogènes, une analyse de variance a pu être appliquée, suivie d'une comparaison des moyennes afin d'évaluer l'évolution des populations bactériennes dans le temps, pour chaque combinaison sol-souche-concentration.

Pour la souche A, quel que soit le type de sol et pour les concentrations d'inoculum de  $10^4$  et  $10^8$  ufc/mL, le niveau de population décroît d'abord significativement puis se stabilise (tableau V-31). En revanche, pour une concentration d'inoculum de  $10^6$  ufc/mL aucune variation significative du niveau de population n'est constatée au cours du temps.

Pour la souche C à  $10^8$  ufc/mL et dans les deux sols, le niveau de population est significativement inférieur au niveau initial sept jours après inoculation, il se stabilise ensuite à une valeur proche de  $10^5$  ufc/g de sol (tableau V-32). Dans le sol brun inoculé par la souche C à  $10^6$  ufc/mL, la population n'évolue pas significativement. En revanche, dans le sol ferrallitique, le niveau de population varie de manière aléatoire. C'est aussi le cas pour des inoculations à  $10^4$  ufc/mL dans les deux sols.

**Tableau V-31. Evolution du niveau des populations de la souche A de *R. solanacearum*, dans un sol portant une plante sensible, en fonction de la dose d'inoculum et du type de sol.**

Jour après inoculation	Sol brun			Sol ferrallitique		
	Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
0	2,78 * a †	4,84 a	7,28 a	3,31 a	4,82 a	7,60 a
7	2,10 b	4,73 a	5,99 b	1,95 b	4,79 a	4,80 b
14	1,95 b	5,29 a	5,98 b	2,15 b	4,71 a	4,71 b
22	1,95 b	4,85 a	5,82 b	1,95 b	4,67 a	4,75 b
27	1,95 b	4,66 a	6,00 b	1,95 b	4,93 a	4,91 b

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/mL).

† : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

**Tableau V-32. Evolution du niveau des populations de la souche C de *R. solanacearum*, dans un sol portant une plante sensible, en fonction de la dose d'inoculum et du type de sol.**

Jour après inoculation	Sol brun			Sol ferrallitique		
	Dose d'inoculum (ufc/mL)			Dose d'inoculum (ufc/mL)		
	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>
0	2,85 * a †	5,04 a	7,54 a	3,29 a	5,34 a	7,17 a
7	3,55 a	4,75 a	5,42 b	1,95 b	4,16 b	6,03 b
14	3,41 ab	5,15 a	5,18 b	2,69 b	4,60 ab	5,44 c
22	3,15 ab	4,62 a	5,38 b	3,19 ab	5,17 ab	5,36 c
27	3,71 a	4,20 a	5,06 b	3,17 ab	4,34 ab	5,07 c

\* : estimation des populations bactériennes exprimée en log (ufc/mL).

† : pour une même colonne, les valeurs suivies d'une même lettre (en gras) ne sont pas significativement différentes (P=0,05).

Une analyse de variance qui permettrait une mise en évidence de différences entre les variables (souche et sol) est impossible car les variances sont trop hétérogènes. Néanmoins, il est possible d'effectuer de telles comparaisons en utilisant une statistique d'ordre (le test de Kramer) (annexe 21). Quelle que soit la concentration d'inoculum, la comparaison des classements pour chaque combinaison souche-sol montre qu'il n'y a pas de différence significative, ce qui permet de conclure à une même évolution des populations bactériennes quel que soit le sol et quelle que soit la souche.

### V.3.3. Discussion

Les expériences ont été effectuées avec les souches A et C de *R. solanacearum*, représentatives des biovars 3 et 2 de l'espèce, et quatre sols (sol brun, sol ferrallitique, andosol et vertisol) représentatifs des types majeurs de sols à la Réunion. Cependant, par manque de temps, l'influence de l'andosol et du vertisol sur la survie des populations bactériennes en sol cultivé (souches A et C) et sur le développement de la maladie (souche C) n'a pu être estimée.

L'étude de la durée de survie de *R. solanacearum* dans un sol nu montre que, quelle que soit la nature du sol ou la souche, la population bactérienne décroît très rapidement pour ne plus être détectée dans un délai variable pour cinq des huit combinaisons type de sol-souche. Seule la souche A parvient à se maintenir, jusqu'au terme de l'expérience (40 jours après inoculation), dans l'andosol à un niveau élevé et la souche C dans les sols brun et ferrallitique mais à des niveaux plus faibles. Toutefois, il est probable que si la durée de l'essai avait été prolongée de quelques jours, la souche C n'aurait plus été détectée. Le vertisol est le seul sol dans lequel les deux souches ne se maintiennent pas, la souche C y disparaît même très rapidement, en moins de neuf jours. Le type de sol joue donc un rôle certain dans la survie de *R. solanacearum*. Les principales informations sont que l'andosol est très favorable à la survie de la souche A de *R. solanacearum* et que le vertisol apparaît clairement comme le type de sol dans lequel la survie de *R. solanacearum* est la plus limitée. Ces différences de capacité de survie de *R. solanacearum* selon le type de sol est due principalement à deux processus, le premier est lié aux caractéristiques intrinsèques du sol et le second à la microflore du sol, ces processus sont détaillés ultérieurement dans cette discussion.

En revanche, la dynamique des populations bactériennes dans les sols (brun et ferrallitique uniquement) portant des jeunes plants de tomate sensibles au flétrissement bactérien est significativement différente puisque les populations sont restées stables pendant la durée de l'essai (environ 30 jours) avec, dans certains cas, une baisse consécutive à l'installation de la bactérie dans le sol.

Cette différence de comportement des populations de *R. solanacearum* dans un sol nu et dans un sol cultivé montre l'importance de la présence d'hôtes sensibles dans la conservation de la bactérie dans le sol. Ces résultats confirment les observations d'autres auteurs (Graham *et al.*, 1979; Granada & Sequeira, 1983a; Sequeira, 1993) qui considèrent que *R. solanacearum* n'est pas apte à survivre dans un sol nu mais survit dans les racines ou dans la rhizosphère des plantes hôtes ou non-hôtes ou encore dans les débris végétaux. De plus, Sequeira (1993) considère que *R. solanacearum* ne survit pas dans un sol durant de longues périodes car ce n'est pas un bon compétiteur comparé à d'autres micro-organismes du sol. En revanche, *R. solanacearum* pourrait persister pendant des périodes plus longues dans les

couches plus profondes du sol où l'activité microbienne indigène est réduite (McCarter *et al.*, 1969; Okabe, 1971; Lloyd, 1978; Graham & Lloyd, 1979). La survie de la bactérie au niveau des racines ou de la rhizosphère des plantes explique en grande partie l'échec fréquent des rotations culturales qui sont mises en oeuvre, en particulier pour la race 1 de *R. solanacearum* (Graham *et al.*, 1979; Granada & Sequeira, 1983; Sequeira, 1993). Cette capacité de survie est variable selon le type de souches. En effet, il a été montré que les souches de race 1 persistent plus longtemps dans un sol que les souches de race 2 ou de race 3 (Granada & Sequeira, 1983a; Moffett *et al.*, 1983). La différence observée peut être reliée à la gamme d'hôtes différente des souches : très restreinte pour les souches de races 2 et 3 et très large pour les souches de race 1. Ces résultats peuvent expliquer pourquoi les rotations culturales sont plus efficaces vis-à-vis de la race 2 ou de la race 3 que vis-à-vis de la race 1 (Sequeira, 1962; Lloyd, 1978; Shamsuddin *et al.*, 1978; Jackson & Gonzalez, 1981).

L'étude de l'expression du pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sur plante sensible permet de dégager quelques faits marquants.

Tout d'abord, il apparaît clairement que la souche C de biovar 2 est plus agressive que la souche A de biovar 3, ce qui confirme les résultats antérieurs du laboratoire (Nicole, 1995). Le taux de flétrissement des jeunes plants de tomate est en effet significativement plus important, aux concentrations d'inoculum de  $10^4$  et  $10^6$  ufc/mL, dans un sol inoculé avec la souche C que dans un sol inoculé avec la souche A. L'effet concentration, qu'on pouvait intuitivement attendre, est confirmé : plus la concentration bactérienne inoculée est forte, plus le taux de flétrissement est important, exception faite pour la souche C où les doses d'inoculum de  $10^6$  et  $10^8$  ufc/mL conduisent à des taux de flétrissement non significativement différents.

Selon nos conditions expérimentales, la nature du sol (sols brun et ferrallitique uniquement) ne paraît pas avoir d'influence sur l'expression du pouvoir pathogène de la souche C sur plante sensible. Toutefois, un retard d'apparition des premiers symptômes est observé dans le cas du sol ferrallitique, soulignant l'existence possible d'un effet sol. En revanche, pour la souche A, le type de sol influence nettement le développement de la maladie. Un classement des types de sol, du plus favorable ou moins favorable à l'expression des symptômes de flétrissement bactérien, peut être effectué : andosol - sol ferrallitique - sol brun et enfin vertisol. Ces informations sont importantes car très peu de travaux similaires ont été réalisés. Les seules données comparables résultent des études menées en Guadeloupe qui ont clairement montré que le sol ferrallitique est très favorable au développement du flétrissement bactérien alors que le vertisol y est très défavorable (Béreau & Messiaen, 1975; Rat, 1978; Prior *et al.*, 1993). Les sols ferrallitiques et les vertisols sont considérés respectivement comme des sols sensibles (ou réceptifs) et résistants (ou suppressifs) vis-à-vis du flétrissement bactérien. La résistance du vertisol est attribuée aux caractéristiques intrinsèques du sol. Ce sol compact et à texture fine est riche en argile gonflante de type montmorillonite, et il a été montré expérimentalement que c'est par un processus purement mécanique de dégradation de l'architecture argileuse intervenant lors de la dessiccation du sol que s'expriment les caractéristiques suppressives des vertisols. Sous l'action de la dessiccation du sol, le réseau poreux des argiles se referme progressivement, les bactéries se trouvent alors emprisonnées, deviennent indisponibles à l'infection et peuvent même disparaître en cas d'une dessiccation plus intense (Schmit & Robert, 1984; Schmit *et al.*, 1990). Prior *et al.* (1993) ont également montré que l'incidence du flétrissement bactérien dans un vertisol est fonction du potentiel

d'inoculum; ils ont en particulier déterminé qu'au delà d'un seuil de  $10^7$  ufc/g de sol, la résistance naturelle du vertisol ne s'exprime plus. Nos résultats sont totalement en accord avec ceux obtenus en Guadeloupe puisque, d'une part, aux doses d'inoculum de  $10^4$  et  $10^6$  ufc/mL, le sol ferrallitique apparaît nettement plus favorable au développement de la maladie que le vertisol et d'autre part, pour une dose d'inoculum plus forte,  $10^8$  ufc/mL, le vertisol perd totalement ses propriétés suppressives et induit même 92 % de mortalité des plants de tomate. Il est probable que cette perte de la propriété suppressive du vertisol soit liée à la saturation par les bactéries de la porosité aménagée par le système argileux, lorsque celles-ci sont présentes en forte concentration.

Indépendamment des phénomènes de résistance liés à la nature physique des sols, la fraction microbiologique des sols est rapportée comme pouvant influencer leur réceptivité aux agents phytopathogènes (Rouxel *et al.*, 1991). Les différences de survie et de taux de flétrissement observés selon les sols dans notre étude pourraient alors s'expliquer en partie par des différences qualitatives et/ou quantitatives de la microflore auxiliaire (bactéries, actinomycètes, champignons). L'antagonisme entre les micro-organismes résulte d'une compétition nutritive ou d'une production de substances antibiotiques (Nesmith & Jenkins, 1985; Rouxel *et al.*, 1991). Des populations de *P. fluorescens*, *P. gladioli*, *P. glumae*, *B. cepacia*, *Bacillus sp.*, *Erwinia sp.* ou encore d'actinomycètes ont été décrites comme capables d'inhiber la multiplication de *R. solanacearum* et donc de réduire l'incidence du flétrissement bactérien (Nesmith & Jenkins, 1985; Aspiras & Cruz, 1986; Elphinstone & Aley, 1993; Hartman *et al.*, 1993; Shekhawat *et al.*, 1993; Sunaina *et al.*, 1997). Certains auteurs suggèrent que c'est peut-être plus la biomasse totale du sol qu'une population microbienne spécifique qui engendre les différences entre sols sensibles et sols résistants (Rouxel *et al.*, 1991). Dans le cas du vertisol, l'antagonisme microbien joue vraisemblablement un rôle mineur dans la résistance au flétrissement bactérien (Prior *et al.*, 1993), et nous avons pu d'ailleurs isoler, à partir de ce type de sol, une population microbienne très faible. En revanche dans les autres types de sol, l'antagonisme microbien pourrait jouer un rôle plus important. De plus, il apparaît que les souches de *R. solanacearum* présentent une sensibilité variables aux antagonismes. Ainsi dans l'andosol où une densité microbienne élevée a été mise en évidence certainement due à la richesse en matière organique de ce sol, la souche A persiste très bien et est responsable d'une mortalité très élevée des plants de tomate; en revanche, la souche C s'y maintient moins ce qui pourrait être dû à des antagonismes. Dans le sol ferrallitique où une densité microbienne élevée a également été détectée, c'est la souche A qui serait la plus sensible aux antagonismes puisqu'elle y survit moins bien que la souche C et provoque moins de symptômes quelle que soit la dose d'inoculum et, en outre, le délai d'apparition des premiers symptômes est plus long pour la souche A que pour la souche C. Dans le sol brun, la souche C persiste mieux et engendre plus de symptômes que la souche A; cependant, la densité microbienne y semble faible donc ce pourrait ne pas être lié aux antagonismes. Mais il est possible que le milieu de culture (milieu semi-sélectif) utilisé ne soit pas adapté à la mise en évidence de la microflore de ce type de sol. Il ne faut pas oublier que la mise en culture n'est qu'une simple indication de l'abondance de la flore microbienne puisque de nombreux micro-organismes du sol ne sont pas cultivables. Enfin, d'autres facteurs comme le pH ou l'humidité du sol ainsi que la nature de la plante peuvent intervenir dans les équilibres microbiens et donc avoir un rôle dans le développement de la maladie (Abdullah *et al.*, 1983; Möffett *et al.*, 1983; Nesmith & Jenkins, 1985; Rouxel *et al.*, 1991; Stotzky, 1997; Michel & Mew, 1998).

L'ensemble de nos résultats montre bien la complexité des phénomènes associés à la réceptivité des sols. Cette étude mérite, bien évidemment, d'être poursuivie et approfondie pour mieux comprendre les mécanismes impliqués. En effet, l'estimation de la réceptivité des sols est d'un grand intérêt car elle peut permettre de prévoir le risque de développement d'une maladie dans une parcelle de culture (Rouxel *et al.*, 1991). La cartographie de la réceptivité des sols à l'échelle d'une exploitation, d'une commune ou d'une région pourraient même être dressées. A terme, ce critère pourrait être pris en compte par l'agriculteur dans le choix d'implantation des cultures et, d'une manière plus générale, dans la gestion des sols. La gestion des sols doit être considérée comme une composante de la protection intégrée des cultures, et en particulier contre le flétrissement bactérien. Afin d'optimiser l'efficacité de la lutte contre cette bactériose, il convient par conséquent de préserver les propriétés suppressives naturelles des sols ou au contraire de diminuer leur réceptivité par des pratiques culturales adaptées. Par exemple, une gestion de l'eau pour le vertisol est préconisée car en conditions d'excès d'eau, ses propriétés suppressives naturelles sont altérées (Prior *et al.*, 1993). De même, des amendements azotés, particulièrement sous forme de matière organique comme les boues de station d'épuration, sont recommandés pour réduire la sévérité du flétrissement bactérien de tomate cultivées sur sol ferrallitique (Prior *et al.*, 1993). Des amendements à base d'urée et de chaux ont aussi été rapportés comme pouvant diminuer l'incidence de la maladie mais leur efficacité dépend du type de sol (Prior & Béramis, 1990; Elphinstone & Aley, 1993; Michel *et al.*, 1997; Michel & Mew, 1998); ces amendements agissent en modifiant la microflore tellurique et/ou en améliorant les moyens de défense naturels de la plante.

**VI. CONCLUSION GENERALE  
ET PERSPECTIVES**

## Conclusion générale et perspectives

Le flétrissement bactérien demeure, en dépit de nombreuses recherches effectuées dans le monde entier et depuis longtemps, une maladie très destructrice pour les cultures d'intérêt économique majeur telles que celle des Solanacées maraîchères, du bananier ou encore de l'arachide. L'île de la Réunion, où le flétrissement bactérien demeure un problème phytosanitaire majeur, constitue un site géographique restreint propice à l'étude de l'épidémiologie de cette maladie puisqu'elle a la particularité d'héberger trois populations différentes de *R. solanacearum* (biovar 1/race 1; biovar 2/race 3; biovar 3/race 1). Les méthodes de contrôle de la maladie sont souvent insuffisantes voire inefficaces. Seule une lutte intégrée, associant l'utilisation d'un matériel végétal résistant et une prophylaxie adaptée, est susceptible de réduire significativement l'incidence du flétrissement bactérien.

Le choix pertinent du matériel végétal implique une bonne connaissance de la diversité génétique de l'agent pathogène. L'application de mesures prophylactiques appropriées requiert un minimum de connaissance de bases épidémiologiques, en particulier sur les réservoirs d'inoculum et les voies de dissémination de la bactérie, et donc de disposer d'outils d'identification et de détection efficaces et fiables. Les recherches présentées dans ce mémoire ont pour objectif de contribuer à l'amélioration des connaissances dans ces différents domaines clés.

La première partie de ce travail a été consacrée à l'analyse de la diversité génétique existant au sein de l'espèce *R. solanacearum*. La diversité d'une collection mondiale de souches a été estimée à l'aide de différents outils moléculaires (PCR-RFLP, AFLP, séquençage) et en explorant différentes régions du génome impliquées ou non dans le pouvoir pathogène de la bactérie (région des gènes *hrp*, gène *hrpB*, gène codant pour l'endoglucanase, ADNr 16S, multiples loci sur l'ensemble du génome). Ces études confirment d'une part la très grande diversité existant chez *R. solanacearum* responsable en grande partie de l'échec ou du peu d'efficacité des mesures de lutte mises en oeuvre contre le flétrissement bactérien et, d'autre part, l'existence des groupes génétiques majeurs préalablement nommés division 1 ou « Asiaticum » et division 2 ou « Americanum » par Cook *et al.*, en 1989. De plus, ces recherches montrent que le système de classification des souches en biovars, traditionnellement utilisé, peut être affiné par un système de classification en groupes génétiques. L'intégration de souches d'origine africaine, conférant un caractère original à ces travaux puisque de telles souches n'ont, à quelques exceptions près, jamais été incluses dans les précédentes analyses de diversité de *R. solanacearum*, nous a permis de mettre en évidence une dualité au sein des populations africaines : un groupe de souches vraisemblablement issu du continent américain par le biais d'échanges commerciaux, et un autre groupe probablement endémique car génétiquement distinct des autres populations de l'espèce. L'identification de cette population africaine, que l'on pourrait désigner division 3 ou « Africanum » si les sondes RFLP employées par Cook *et al.* (1989) étaient encore disponibles pour la communauté scientifique, permet d'obtenir une image plus globale de la diversité de l'espèce *R. solanacearum* et se révèle d'une importance capitale dans le cadre de l'élaboration d'une stratégie de lutte basée sur l'utilisation de variétés résistantes. Il est dorénavant très important d'évaluer précisément la gamme d'hôtes et l'agressivité des souches appartenant à cette population africaine de manière à la caractériser plus finement au plan pathologique et à intégrer ces données dans les schémas de sélection variétale. Nos analyses phylogénétiques

permettent désormais de considérer que *R. solanacearum* est constituée de quatre groupes génétiques majeurs isolés géographiquement : en Asie, en Amérique, en Indonésie et en Afrique. Il apparaît maintenant indispensable de compléter le travail de Palleroni & Doudoroff (1971), dont les hybridations ADN/ADN ont montré que les souches de *R. solanacearum* ont souvent moins de 70 % d'homologie entre elles, qui suggèrerait déjà l'existence non pas d'une mais de plusieurs espèces. D'ailleurs, Taghavi *et al.* (1996) ont avancé le terme de « complexe d'espèce » pour décrire la grande diversité infra-spécifique de *R. solanacearum*. Nos études de phylogénie laisse par conséquent prévoir un futur remaniement taxonomique et l'éclatement de *R. solanacearum* en quatre espèces correspondant aux quatre groupes génétiques identifiés.

L'AFLP qui n'avait encore jamais été employée pour étudier la diversité de *R. solanacearum*, à l'exception des souches européennes de biovar 2/race 3 (Van der Wolf *et al.*, 1998), s'est avérée une technique très performante pour estimer les relations phylogénétiques à l'intérieur de l'espèce. En raison de sa reproductibilité, de sa capacité à évaluer simultanément de multiples loci sur l'ensemble du génome et à distinguer des génomes très proches, l'AFLP constitue un outil de choix pour l'étude de la structure d'une population à l'échelle parcellaire. L'étude de la structure des populations est essentielle pour développer des stratégies de lutte basée sur l'utilisation de variétés résistantes plus efficaces à long terme. Son application à l'étude d'une parcelle naturellement contaminée par *R. solanacearum* y a révélé, malgré une très grande homogénéité des isolats, la coexistence de deux lignées clonales. Une poursuite de l'étude devra s'attacher à analyser la diversité phénotypique au plan du pouvoir pathogène en relation avec la diversité génomique révélée et à aborder, par une approche expérimentale analytique, le rôle de la plante dans l'apparition de la diversité de l'agent pathogène. Cette étude en permettant une meilleure compréhension de la dynamique des populations bactériennes ouvre également la voie à l'identification de marqueurs génétiques liés au pouvoir pathogène et/ou l'épidémiologie de l'agent pathogène.

La seconde partie du travail a consisté au développement d'un outil moléculaire adapté à la détection efficace de *R. solanacearum*. Tout d'abord, nous avons cherché à valider les outils développés par Seal *et al.* (1992a, 1992b et 1993) sur les trois populations réunionnaises (biovar 1/race 1, biovar 2/race 3, biovar 3/race1) de *R. solanacearum*. Ces outils n'ayant pas permis d'aboutir aux résultats escomptés, nous avons choisi d'exploiter la variabilité mise en évidence au sein des gènes *hrp* pour l'obtention d'un outil de diagnostic de *R. solanacearum*. Cette démarche est originale puisque auparavant seuls Leite *et al.* (1994b et 1995) avaient suivi cette approche pour le développement d'outils de détection de *Xanthomonas* phytopathogènes. L'outil N-PCR-RFLP mis au point assure la distinction rapide et certaine des trois populations présentes à la Réunion et conserve tout son intérêt pour le diagnostic des autres populations de *R. solanacearum*. L'efficacité de cet outil moléculaire pour la détection spécifique, sensible, rapide et reproductible de *R. solanacearum* dans ses différents réservoirs potentiels d'inoculum (plante, eau, semence et sol) a été démontrée. Le phénomène d'inhibition, principale difficulté rencontrée lors de l'utilisation de la technique PCR pour la détection dans un échantillon biologique, peut être levé par une préparation appropriée de l'échantillon. De nombreuses méthodes ont été évaluées et plusieurs d'entre elles sont désormais disponibles. Cet outil moléculaire constitue donc une alternative, même si son coût reste encore un frein à son utilisation, aux méthodes les plus fréquemment utilisées, en particulier l'ELISA, pour le diagnostic du flétrissement bactérien. Enfin, cet outil devra prochainement être adapté à la quantification de l'inoculum.

La maîtrise d'un tel outil pour la détection de *R. solanacearum* dans ses différents réservoirs potentiels d'inoculum ouvre désormais la voie à de larges possibilités au niveau de la lutte contre le flétrissement bactérien :

(i) elle peut permettre de vérifier l'état sanitaire du sol de la parcelle destinée à être cultivée, des tubercules ou autres graines qui seront semés, du matériel végétal qui sera planté, ou encore de l'eau qui sera employée pour irriguer la parcelle.

(ii) elle peut permettre d'évaluer l'efficacité des mesures de lutte pouvant être mise en oeuvre contre le flétrissement bactérien, en évaluant par exemple l'influence de solarisations ou de fumigations de sol, d'amendements organiques ou de rotations culturales sur la survie des populations de *R. solanacearum* dans le sol, ou encore l'influence de méthodes de désinfection des substrats et solutions nutritives dans les cas des cultures hors-sol.

(iii) elle peut permettre une plus large connaissance de la gamme d'adventices pouvant être considérées comme des réservoirs d'inoculum et d'en tirer les conséquences pour la lutte. Il est fort probable que de nombreuses adventices soient non encore identifiées comme hôtes de la bactérie car elles peuvent être porteuses d'infections latentes sans exprimer les symptômes de la maladie.

La dernière partie du travail a été consacrée à une amélioration des connaissances des caractéristiques biologiques et épidémiologiques de la bactérie car les données dans ce domaine restent limitées ou font défaut. Cette amélioration des connaissances a des conséquences en terme d'opportunité et d'efficacité des mesures prophylactiques non négligeables.

La première approche était de considérer l'eau comme un réservoir et un véhicule potentiel d'inoculum. Nos résultats confirment que *R. solanacearum* peut se conserver dans l'eau et que sa durée de survie varie, selon la qualité de l'eau, de quelques jours dans une eau d'irrigation à quelques mois dans une eau purifiée ou partiellement purifiée. En outre, nos expérimentations confirment que l'eau est un véhicule potentiel de la bactérie capable d'assurer efficacement la dissémination de la maladie. Par conséquent, l'eau est susceptible de limiter ou d'anéantir l'impact des mesures de lutte pouvant être mises en oeuvre. Il convient donc de contrôler systématiquement et régulièrement l'état sanitaire de l'eau utilisée pour l'irrigation et de la décontaminer si nécessaire.

La seconde approche était de considérer la semence comme réservoir et véhicule d'inoculum. Même s'il est couramment admis que les semences, à l'exception des tubercules de pomme de terre, ne peuvent être contaminées par *R. solanacearum* et être considérées comme vecteur de la maladie, aucune preuve scientifique incontestable n'a encore été apportée à ce jour. L'approche originale développée, prenant comme modèle la tomate et l'aubergine, permet désormais d'envisager raisonnablement la possibilité d'une transmission de *R. solanacearum* par la graine, même s'il s'agit probablement d'un phénomène naturel assez rare. En effet, les fruits de tomate peuvent être infectés par *R. solanacearum*, avec ou sans expression de symptômes et même détruits totalement. Bien que la démonstration soit essentiellement expérimentale, elle est corroborée par l'observation au champ de quelques fruits montrant des symptômes nécrotiques internes associés à la présence abondante de la bactérie. Les graines issues des fruits infectés peuvent être incapables de germer ou de donner des plantules viables. De plus, si les plants ont réussi à se développer normalement, ils peuvent être porteurs de la bactérie et manifester plus ou moins tardivement les symptômes de la maladie. Quant à la localisation superficielle ou plus profonde des bactéries au niveau des graines, elle reste à être précisée. L'inoculation artificielle de graines pelliculées semble montrer

que les bactéries ont une durée de survie limitée mais peuvent cependant avoir une action destructrice sur les jeunes plantules issues de ces graines. On peut supposer que naturellement les bactéries puissent être localisées plus en profondeur dans la graine et avoir une pérennité plus grande parce que mieux protégées et assurer ainsi la plus grande part des effets négatifs qui leur sont associés. En supposant que des graines soient contaminées dans les fruits d'une parcelle destinée à leur production, il est nécessaire de connaître l'effet sur la présence bactérienne, des traitements successifs destinés à extraire les graines des fruits, à éliminer les éléments végétaux qui leur sont associés, à conserver ces graines et à les préparer à la commercialisation. Ces traitements, peu ou pas divulgués, pourraient entraîner, soit une élimination des graines fortement infectées, soit une désinfection plus ou moins totale de la graine. En revanche, pour ce qui concerne les nombreuses adventices hôtes de la bactérie dont les graines ne subissent aucun traitement et/ou transformation, la semence pourrait être, il reste à le démontrer, une voie de pérennisation de l'inoculum.

La dernière approche concerne le sol. Les études entreprises montrent clairement que même si *R. solanacearum* est considéré comme un germe tellurique, sa capacité de survie dans un sol nu reste très limitée dans le temps et ce quel que soit le type de sol. En revanche, en présence d'une culture de plante sensible, la tomate de variété Roma dans notre cas, la bactérie peut persister pendant des périodes plus longues. Il est vrai que nos expériences ont été conduites sur une durée restreinte, un mois, mais il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus sont tout à fait en accord avec les observations d'autres auteurs (Graham *et al.*, 1979; Granada & Sequeira, 1983; Sequeira, 1993) qui considèrent que *R. solanacearum* survit dans un sol au niveau des racines ou de la rhizosphère des plantes hôtes ou non hôtes ou encore au niveau des débris végétaux. Cette capacité de survie de *R. solanacearum* explique en grande partie l'échec fréquent des rotations culturales mises en oeuvre pour lutter contre le flétrissement bactérien. Nos études montrent également que le type de sol intervient dans la capacité de survie de la bactérie mais aussi sur l'expression de son pouvoir pathogène. Les quatre types de sol étudiés, correspondant aux quatre principaux types de sol à la Réunion, apparaissent plus ou moins réceptifs à l'agent pathogène. Cette réceptivité variable est liée principalement aux caractéristiques intrinsèques du sol et à la fraction microbiologique du sol. Le vertisol est de loin le moins favorable à la survie de la bactérie et au développement des symptômes de la maladie. La résistance développée par ce type de sol, observée également en Guadeloupe, est attribuée à sa richesse en argile de type montmorillonite (Béreau & Messiaen, 1975; Prior *et al.*, 1993). Les autres types de sol (andosol, sol ferrallitique et sol brun) favorisent plus ou moins la survie de la bactérie et le développement de la maladie, les différences constatées pouvant s'expliquer par des différences qualitatives et/ou quantitatives de la microflore des sols. De plus, il apparaît que les souches A et C de *R. solanacearum*, et donc *a fortiori* les biovars de *R. solanacearum*, présentent une sensibilité variable à l'antagonisme microbien. Dans un contexte de lutte raisonnée contre le flétrissement bactérien, il convient par conséquent de préserver les propriétés suppressives naturelles des sols ou à l'inverse de diminuer leur réceptivité par des pratiques culturales adaptées.

L'ensemble des résultats obtenus par le développement de démarches souvent originales durant ces travaux de thèse, permet d'améliorer significativement à différents niveaux les connaissances sur *R. solanacearum* et sur le flétrissement bactérien et ouvre de nombreuses perspectives. Ces résultats présentent bien évidemment un intérêt local pour la Réunion mais aussi pour toute région où le flétrissement bactérien constitue un problème phytosanitaire majeur, ou est potentiellement un risque.

**VII. REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Aarts, H. J. M., Van Lith, L. A. J. T. & Keijfer, J. (1998). High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Lett Appl Microbiol* **26**, 131-135.
- Abdullah, H., Maene, L. M. J. & Naib, H. (1983). The effects of soil types and moisture levels on bacterial wilt disease of groundnut (*Arachis hypogaea*). *Pertanika* **6**, 26-31.
- Adhikari, T. B., Vera Cruz, C. M., Zhang, Q., Nelson, R. J., Skinner, D. Z., Mew, T. W. & Leach, J. E. (1995). Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. *Appl Environ Microbiol* **61**, 966-971.
- Akiew, E., Trevorrow, P. R. & Tonello, P. E. (1993). Management of bacterial wilt of tobacco. In *Bacterial wilt*, pp. 270-275. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Alfano, J. R. & Collmer, A. (1997). The type III (hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins and death. *J Bacteriol* **179**, 5655-5662.
- Allen, C., Huang, Y. & Sequeira, L. (1991). Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**, 147-154.
- Allen, C., Gay, J. & Simon-Bueta, L. (1997). A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**, 1054-1064.
- Allen, C., Gay, J., Guan, Y., Huang, Q. & Tans-Kersten, J. (1998). Function and regulation of pectin-degrading enzymes in bacterial wilt. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 171-177. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Allison, D. G. & Sutherland, I. W. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J Gen Microbiol* **133**, 1319-1327.
- Araud-Razou, I., Vasse, J., Montrozier, H., Etchebar, C. & Trigalet, A. (1998). Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *Eur J Plant Pathol* **104**, 795-809.
- Ardales, E. Y., Leung, H., Vera Cruz, C. M., Mew, T. W., Leach, J. E. & Nelson, R. J. (1996). Hierarchical analysis of spatial variation of the rice bacterial blight pathogen across diverse agroecosystems in the Philippines. *Phytopathology* **86**, 241-252.
- Arias, C. R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E. & Aznar, R. (1997). Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2600-2606.
- Arlat, M. & Boucher, C. (1991). Identification of a *dsp* DNA region controlling aggressiveness of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**, 211-213.
- Arlat, M., Gough, C. L., Zischek, C., Barberis, P. A., Trigalet, A. & Boucher, C. A. (1992). Transcriptional organization and expression of the large *hrp* gene cluster of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**, 187-193.
- Arlat, M., Van Gijsegem, F., Huet, J. C., Pernollet, J. C. & Boucher, C. A. (1994). PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO J* **13**, 543-553.
- Aspiras, R. B. & Cruz, A. R. (1986). Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. In *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proc. Int. Workshop, PCARRD, Los Banos, The Philippines, 8-10 Oct. 1985*, pp. 89-92. Edited by G. J. P. (ed.). Canberra, Australia: ACIAR Proc. No.13.
- Atlas, R. M. & Bej, A. S. (1994). Polymerase chain reaction. In *Methods for general and molecular bacteriology*, pp. 418-435. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood & N. R. Krieg. Washington, USA: American society for microbiology.
- Audy, P., Braat, C. E., Saindon, G., Huang, H. C. & Laroche, A. (1996). A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seed. *Phytopathology* **86**, 361-366.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1991). *Current protocols in molecular biology*. New York, USA: Greene Publishing Associates-Wiley Interscience.
- Bakken, L. R. (1985). Separation and purification of bacteria from soil. *Appl Environ Microbiol* **49**, 1482-1487.
- Bakken, L. R. & Lindahl, V. (1995). Recovery of bacterial cells from soil. In *Nucleic acids in the Environment, methods and applications*, pp. 9-27. Edited by J. T. Trevors & J. D. V. Elsas. Berlin, Germany: Springer, Lab Manual.
- Barry, T., Powell, R. & Gannon, F. (1990). A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Biotechnology* **8**, 233-236.
- Barry, T., Collieran, C., Glennon, M., Dunićan, L. K. & Gannon, F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* **1**, 51-56.

- Bashan, Y., Okon, Y. & Henis, Y. (1982). Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology* **72**, 1143-1144.
- Bauer, D. W., Bogdanove, A. J., Beer, S. V. & Collmer, A. (1994). *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and their involvement in soft rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 573-581.
- Beer, S., Bauer, D. W., Jiang, X. H., Laby, R. J., Sneath, B. J., Wei, Z. M., Wilcox, D. A. & Zumoff, C. H. (1991). The *hrp* cluster of *Erwinia amylovora*. In *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, pp. 53-60. Edited by H. Henneke & D. P. S. Verma. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Bej, A. K., Steffan, R. J., DiCesare, J. L., Haff, L. & Atlas, R. M. (1990). Detection of coliform in water by the polymerase chain reaction and gene probes. *Appl Environ Microbiol* **56**, 307-314.
- Bej, A. K., DiCesare, J. L., Haff, L. & Atlas, R. M. (1991a). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for *uid*. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1013-1017.
- Bej, A. K., Mahbubani, M. H., DiCesare, J. L. & Atlas, R. M. (1991b). Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Appl Environ Microbiol* **57**, 3529-3534.
- Béreau, M. & Messiaen, C. M. (1975). Réceptivité comparée des sols à l'infestation par *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Phytopathol* **7**, 191-193.
- Bertheau, Y. & Tempé, J. (1990). Détection des agents phytopathogènes par hybridation moléculaire. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **423**, 25-32.
- Berthier, Y., Thierry, D., Lemattre, M. & Guesdon, J. L. (1994). Isolation of an insertion sequence (IS1051) from *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* with potential use for strain identification and characterization. *Appl Environ Microbiol* **60**, 377-384.
- Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X. & Simonet, P. (1997). Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4965-4968.
- Bertolla, F., Frostegard, A., Brito, B., Nesme, X. & Simonnet, P. (1999). During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**, 467-472.
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L. & Li, Z. S. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* **20**, 291-303.
- Beyries, A. & Bérarnis, M. (1986). L'utilisation du greffage pour combattre le dépérissement de l'aubergine aux Antilles. *Bulletin Technique d'information, INRA* **409**, 439-447.
- Black, R. & Sweetmore, A. (1993). Identification and characterisation of *Pseudomonas solanacearum* using metabolic profiles. In *Bacterial wilt*, pp. 32-44. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Blears, M. J., De Grandis, S. A., Lee, H. & Trevors, J. T. (1998). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **21**, 99-114.
- Bogdanove, A. J., Beer, S. V., Bonas, U., Boucher, C. A., Collmer, A., Coplin, D. L., Cornelis, G. R., Huang, H. C., Hutcheson, S. W., Panopoulos, N. J. & Van Gijsegem, F. (1996). Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**, 681-683.
- Bonas, U., Schulte, R., Fenselau, S., Minsavage, G. V., Staskawicz, J. & Stall, R. E. (1991). Isolation of a gene cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determine pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**, 81-88.
- Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalet, A. P. & Demery, D. A. (1985). Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J Gen Microbiol* **131**, 2449-2457.
- Boucher, C., Martinel, A., Barberis, P. A., Alloing, G. & C., Z. (1986). Virulence genes are carried by a megaplasmid of the plant pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular of General Genetic* **217**, 1-6.
- Boucher, C. A., Van Gijsegem, F., Barberis, P. A., Arlat, M. & Zischek, C. (1987). *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *J Bacteriol* **169**, 5626-5632.
- Boucher, C. A., Gough, C. L. & Arlat, M. (1992). Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. *Annu Rev Phytopathol* **30**, 443-461.
- Boudazin, G., Le Roux, A. C., Josi, K., Labarre, P. & Jouan, B. (1999). Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *Eur J Plant Pathol* **105**, 373-380.
- Bragard, C., Verdier, V. & Maraite, H. (1995). Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* pathogenic for small grains. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1020-1026.
- Brito, B., Marena, M., Barberis, P., Boucher, C. & Genin, S. (1999). *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **31**, 237-251.
- Bruckert, S. (1979). Analyse des complexes argilo-minéraux des sols. In *Pédologie, constituants et propriétés du sol*, pp. 187-207. Edited by M. Bonneau & B. Souchier. Paris, France: Masson.

- Brumbley, S. M. & Denny, T. P. (1990). Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. *J Bacteriol* **172**, 5677-5685.
- Brumbley, S. M., Carney, B. F. & Denny, T. P. (1993). Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *phcA*, a putative LysR transcriptional regulator. *J Bacteriol* **175**, 5477-5487.
- Buddenhagen, I. W. & Elsasser, T. A. (1962). Insect-dissemination - a newly discredited mode of spread of bacterial wilt of Banana. *Phytopathology* **52**, 726.
- Buddenhagen, I., Sequeira, L. & Kelman, A. (1962). Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **52**, 726.
- Buddenhagen, I. W. & Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Plant Pathol* **2**, 203-230.
- Buddenhagen, I. W. (1986). Bacterial wilt revisited. In *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proc. Int. Workshop, PCARRD, Los Banos, The Philippines, 8-10 Oct. 1985*, pp. 126-143. Edited by G. J. Persley. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No.13.
- Bukhari, Z., McQuin, R. M., Fricker, C. R. & Clancy, J. L. (1998). Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4495-4499.
- Cadet, T. (1980). *La végétation de l'île de la Réunion, étude phytocécologique et phytosociologique*. Réunion: Cazal.
- Cadet, P., Prior, P. & Steva, H. (1989). Influence de *Meloidogyne arenaria* sur la sensibilité de deux cultivars de tomate à *Pseudomonas solanacearum* (E.F. Smith) dans les Antilles françaises. *Agronomie Tropicale* **44**, 263-267.
- Caruso, P., Llop, P., Palomo, J. L., Garcia, P., Morente, C. & Lopez, M. M. (1998). Evaluation of methods for detection of potato seed contamination by *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 128-132. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Chandler, M. S. (1998). Insertion sequences and transposons. In *Bacterial genomes: physical structure and analysis*, pp. 30-37. Edited by F. J. de Bruijn, J.R. Lupski & G. M. Weinstock. New York, USA: Chapman & Hall.
- Chapman, M. R. & Kao, C. C. (1998). EpsR modulates production of extracellular polysaccharides in the bacterial wilt pathogen *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. *J Bacteriol* **180**, 27-34.
- Chellemi, D. O., Olson, S. M., Scott, J. W., Mitchell, D. J. & McSorley, R. (1993). Reduction of phytoparasitic nematodes on tomato by soil solarization and genotype. *J Nematol* **25**, 800-805.
- Chenu, C. (1993). Clay-or sand-polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma* **56**, 143-156.
- Ciampi, L., Sequeira, L. & French, E. R. (1980). Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J* **57**, 377-386.
- Civerolo, E. L. (1990). Bacteriophages. In *Methods in phytobacteriology*, pp. 205-213. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Clairon, M. (1984). Possibilités de réduction de l'incidence du flétrissement bactérien (*Pseudomonas solanacearum*) chez l'aubergine (*Solanum melongena*) par modification de la fertilisation azotée. *Bull Agron Ann Guy* **3**, 4-5.
- Clerc, A., Manceau, C. & Nesme, X. (1998). Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within Genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1180-1187.
- Clough, S. J. & Denny, T. P. (1990). Regulation of virulence in *Pseudomonas solanacearum* by an endogenous volatile compound. *Phytopathology* **80**, 1038.
- Cobb, D. & Clarkson, J. M. (1994). A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. *Nucleic Acids Res* **22**, 3801-3805.
- Collmer, A. (1998). Determinants of pathogenicity and avirulence in plant pathogenic bacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 329-335.
- Cook, D., Barlow, E. & Sequeira, L. (1989). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* **2**, 113-121.
- Cook, D. & Sequeira, L. (1991a). Genetic and biochemical characterization of a *Pseudomonas solanacearum* gene cluster required for extracellular polysaccharide production and for virulence. *J Bacteriol* **173**, 1654-1662.
- Cook, D. & Sequeira, L. (1991b). The use of subtractive hybridization to obtain a DNA probe specific for *Pseudomonas solanacearum* race 3. *Molecular General Genetic* **227**, 401-410.
- Cook, D., Barlow, E. & Sequeira, L. (1991). DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: the example of *Pseudomonas solanacearum*. In *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*, pp. 103-108. Edited by H. Henneke & D. P. S. Verma. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Cook, D. & Sequeira, L. (1994). Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetics methods. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 77-93. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Cook, R. J. (1985). Biological control of plant pathogens: theory to application. *Phytopathology* **75**, 25-29.
- Crozat, Y. & Cleyet-Marel, J. C. (1984). Problèmes méthodologiques posés par l'extraction et la récupération des bactéries telluriques pour leur quantification par immunofluorescence. *Agronomie* **4**, 603-610.
- Cuppels, D. A., Moore, R. A. & Morris, V. L. (1990). Construction and use of a nonradioactive DNA hybridization probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1743-1749.
- Dalmastri, C., Chiarini, L., Cantale, C., Bevivino, A. & Tabacchioni, S. (1999). Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. *Microb Ecol* **38**, 273-284.
- Danesh, D., Aarons, S., McGill, G. E. & Young, N. D. (1994). Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 464-471.
- Darrasse, A., Kotoujansky, A. & Bertheau, Y. (1994). Isolation by genomic subtraction of DNA probes specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 298-306.
- Darrasse, A., Trigalet, A. & Prior, P. (1998). Correlation of aggressiveness with genomic variation in *Ralstonia solanacearum* race 1. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 89-98. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Davis, M. J., Rott, P., Warmuth, C. J., Chatenet, M. & Baudin, P. (1997). Intraspecific genomic variation within *Xanthomonas albilineans*, the sugarcane leaf scald pathogen. *Phytopathology* **87**, 316-324.
- Deberdt, P. (1999). Analyse de la résistance au flétrissement bactérien (*Ralstonia solanacearum* - race 1) gouvernée par le chromosome 6 chez la tomate. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier II, France.
- De Boer, S. H. & Schaad, N. W. (1990). Preparation of antigens, bacteria. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens, a laboratory manual*, pp. 27-31. Edited by R. O. Hampton, E. M. Ball & S. H. D. Boer. St. Paul, USA: The American Phytopathological Society Press.
- Denny, T. P., Carney, B. F. & Shell, M. A. (1990). Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**, 293-300.
- Denny, T. P. & Baek, S. R. (1991). Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**, 198-206.
- Denny, T. P., Brumbley, S. M., Carney, B. F., Clough, S. J. & Schell, M. A. (1994). Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 137-143. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., Holub, E., Beynon, J., Arlat, M. & Marco, Y. (1998). Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**, 659-667.
- Devi, L. R. & Menon, M. R. (1980). Transmission of *Pseudomonas solanacearum* through tomato seeds. *Agricultural Research Journal of Kerala* **18**, 102-122.
- Dj Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S. & Dalmastri, C. (1997). Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4485-4493.
- Dianese, J. C. & Dristig, M. C. G. (1994). Strain characterization of *Pseudomonas solanacearum* based on membrane protein patterns. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 113-121. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Digat, B. & Caffier, D. (1996). "Pourriture brune" de la pomme de terre, flétrissement bactérien sur la tomate... Alerte face à une redoutable maladie des solanacées. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **482**, 33-37.
- Dristig, M. C. G. & Dianese, J. C. (1990). Characterization of *Pseudomonas solanacearum* biovars based on membrane protein pattern. *Phytopathology* **80**, 641-646.
- Duvick, J. P. & Sequeira, L. (1984). Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Appl Environ Microbiol* **48**, 192-198.
- Eden-Green, S. J. & Sastraatmadja, H. (1990). Blood disease present in Java. *FAO Plant Prot Bull* **38**, 49-50.
- Eden-Green, S. J. (1994). Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: new direction for Moko disease. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 25-34. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Egel, D. S., Graham, J. H. & Stall, R. E. (1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2724-2730.
- Elphinstone, J. G. (1996). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in cool climates. *Potato Res* **39**, 403-410.

- Elphinstone, J. G. & Aley, P. (1993). Integrated control of bacterial wilt of potato in the warm tropics of Peru. In *Bacterial wilt*, pp. 276-283. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K. & Stead, D. E. (1996). Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bull OEPP/EPPO Bull* 26, 663-678.
- Elphinstone, J. G., Stanford, H. M. & Stead, D. E. (1998). Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara* and associated irrigation water. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 133-139. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Enfinger, J. M., McCarter, S. M. & Jaworski, C. A. (1979). Evaluation of chemicals and application methods for control of bacterial wilt of tomato transplants. *Phytopathology* 69, 637-640.
- Engelbrecht, M. C. (1994). Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter* 10, 3-5.
- Etchebar, C., Trigalet-Demery, D., van Gijsegem, F., Vasse, J. & Trigalet, A. (1998). Xylem colonization by an HrcV- mutant of *Ralstonia solanacearum* is a key factor for the efficient biological control of tomato bacterial wilt. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 869-877.
- Expert, J. M., Noublanche, F., Keters, A. & Caffier, D. (2000). Comparaison de la centrifugation et de la filtration sous pression pour la concentration d'échantillons de rivière en vue de la détection de *Ralstonia solanacearum*. In *Quatrièmes rencontres de phytobactériologie*, Aussois, France. pp. 60: INRA.
- Farag, N., Stead, D. E. & Janse, J. D. (1999). *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3, biovar 2, detected in surface (irrigation) water in Egypt. *J Phytopathology* 147, 485-487.
- Fegan, M. (1998). Chair's perspective: diversity of *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 17-18. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Fegan, M., Taghavi, M., Sly, L. I. & Hayward, A. C. (1998a). Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 19-33. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Fegan, M., Croft, B. J., Teakle, D. S., Hayward, A. C. & Smith, G. R. (1998b). Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathol* 47, 495-504.
- Fegan, M., Holoway, G., Hayward, A. C. & Timmis, J. (1998c). Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 34-43 Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Fock, I. (2000). Introduction de résistance au flétrissement bactérien chez la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à partir d'hybridation somatique avec deux espèces apparentées, *Solanum phureja* et *Solanum stenotomum* Thèse de doctorat, Université de Paris XI Orsay, France.
- Fortnum, B. A. & Martin, S. B. (1998). Disease management strategies for control of bacterial wilt of tobacco in the Southeastern USA. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 394-402. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Fox, R. T. V. (1993). *Principles of diagnosis techniques in plant pathology*. Wallingford, UK: C.A.B. International.
- Fox, R. T. V. (1998). Plant disease diagnosis. In *The epidemiology of plant diseases*, pp. 14-41. Edited by D. G. Jones. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Fratamico, P. M. & Strobaugh, T. P. (1998). Simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* 0157:H7 by multiplex PCR. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 21, 92-98.
- French, E. R. (1994). Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 199-207. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- French, E. R., Anguiz, R. & Aley, P. (1998). The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum*, for the integrated control of bacterial wilt. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 381-385. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Frey, P., Prior, P., Marie, C., Kotoujansky, A., Trigalet-Demery, D. & Trigalet, A. (1994). Hrp- mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Appl Environ Microbiol* 60, 3175-3181.
- Frey, P., Schmit, J. J., Albar, L., Prior, P., Saddler, G. S., Trigalet-Demery, D. & Trigalet, A. (1996). Bacteriocin typing of *Burkholderia (Pseudomonas) solanacearum* race 1 of the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen. *Appl Environ Microbiol* 62, 473-479.
- Fromin, N., Hamelin, J., Teyssier-Cuvelle, S. & Aragno, M. (2000). Utilisation de la technique TTGE pour l'étude des communautés bactériennes rhizosphériques. In *Quatrièmes rencontres de phytobactériologie*, pp. 31, Aussois, France: INRA.
- Gagnevin, L., Leach, J. E. & Pruvost, O. (1997). Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of Mango bacterial black spot. *Appl Environ Microbiol* 63, 246-253.

- Gagnevin, L. (1998). Analyse de la diversité génétique de *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* et sa signification dans le pouvoir pathogène et la biologie de la bactérie. Implications dans l'épidémiologie de la maladie des taches noires du mangoier à l'île de la Réunion. Thèse de doctorat, Institut National Agronomique de Paris-Grignon, France.
- Gardan, L. & Luisetti, J. (1982). *Méthodes d'isolement et d'identification des bactéries phytopathogènes*. Angers, France: INRA.
- Gelsthorpe, A. R., Gelsthorpe, K. & Sokol, R. J. (1996). Extraction of DNA using monoclonal anti-DNA and magnetic beads. *BioTechniques* 22, 1081-1082.
- Genin, S., Gough, C. L., Zischek, C. & Boucher, C. A. (1992). Evidence that the *hrpB* encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* 6, 3065-3076.
- George, M. L. C., Bustamam, M., Cruz, W. T., Leach, J. E. & Nelson, R. J. (1997). Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Southeast Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. *Phytopathology* 87, 302-309.
- Gillings, M. R. & Fahy, P. (1993a). Genomic fingerprinting and PCR analysis: rapid, sensitive and inexpensive means of differentiating strains of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt*, pp. 85-92. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Gillings, M. R. & Fahy, P. C. (1993b). Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* biovar 2 and N2 assessed using restriction endonuclease analysis of total genomic DNA. *Plant Pathol* 42, 744-753.
- Gillings, M. R., Fahy, P. & Davies, C. (1993). Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Letts Appl Microbiol* 17, 44-48.
- Gillings, M. R. & Fahy, P. (1994). Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 95-112. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Girard, J. C., Marchand, J. L. & Michellon, R. (1989). Search for bacterial wilt resistant tomato varieties in Réunion. In *Tomato and pepper production in the tropics - Proceedings of the international symposium on integrated management practices*, Shanhu, Tainan, Taiwan, pp. 229-234: AVRDC.
- Girard, J. C., Nicole, J. F., Chéron, J. J., Gaubiac, A. M., Huvier, O., Oudard, B. & Suzor, H. (1993). Bacterial wilt due to *Pseudomonas solanacearum* in Réunion: general situation and current research. In *Bacterial wilt*, pp. 343-347. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Gitaitis, R., McCarter, S. & Jones, J. (1992). Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. *Plant Dis* 76, 651-656.
- Gonzalez, A. I., Ruiz, M. L. & Polanco, C. (1998). A race-specific insertion of transposable element IS801 in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11, 423-428.
- Gough, C. L., Genin, S., Zischek, C. & Boucher, C. A. (1992). *hrp* genes of *Pseudomonas solanacearum* are homologous to pathogenicity determinants of animal pathogenic bacteria and are conserved among plant pathogenic bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact* 5, 384-389.
- Graham, J. & Lloyd, A. B. (1979). Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research* 30, 489-496.
- Graham, J., Jones, D. A. & Lloyd, A. B. (1979). Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in plant debris and in latently infected potato tubers. *Phytopathology* 69, 1100-1103.
- Granada, G. A. & Sequeira, L. (1983a). Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plants roots. *Can J Microbiol* 29, 433-440.
- Granada, G. A. & Sequeira, L. (1983b). A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 67, 1084-1088.
- Griep, R. A., Van Twisk, C., Van Beckhoven, J. R. C. M., Van der Wolf, J. M. & Schots, A. (1998a). Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3. *Phytopathology* 88, 795-803.
- Griep, R. A., Van Twisk, C., Van der Wolf, J. M., Van Beckhoven, J. R. C. M. & Schots, A. (1998b). Selection of *Ralstonia solanacearum* race 3 specific monoclonal antibodies from combinatorial libraries. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 140-145. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Grimault, V. & Prior, P. (1993). Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol* 42, 589-594.
- Grimault, G., Gélie, B., Lemattre, M., Prior, P. & Schmit, J. (1994). Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 44, 105-123.
- Grondeau, C. (1992). La graisse bactérienne du pois protéagineux due à *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) : identification, épidémiologie et méthodes de lutte. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Grondeau, C., Olivier, V. & Samson, R. (1993). Détection des *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* dans les semences de pois : méthodes, limites et controverses. *Phytoma-La Défense des Végétaux* 455, 45-47.

- Guéron, M., Boucher, C. & Ariat, M. (2000). PopB et PopC, deux nouvelles protéines sécrétées par le système Hrp de *Ralstonia solanacearum*. In *Quatrièmes rencontres de phyto bactériologie*, pp. 19. Aussois, France: INRA.
- Hanekamp, T., Kobayashi, D., Hayes, S. & Stayton, M. (1997). Avirulence gene D of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* may have undergone horizontal gene transfer. *FEBS Lett* **45**, 40-44.
- Hanson, P. M., Wang, J.-F., Licardo, O., Hanudin, Mah, S. Y., Hartman, G. L., Lin, Y.-C. & Chen, J.-T. (1996). Variable reaction of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. *HortScience* **31**, 143-146.
- Hara, H. & Ono, K. (1985). Ecological studies on the bacterial wilt of tobacco caused by *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. II. Dissemination in infected field and survival on tobacco leaf of the pathogen exuded from the upper part of the infected tobacco plants. *Bulletin of Okayama Tobacco Experimental Station* **42**, 139-147.
- Hartman, G. L., Hong, W. F., Hanudin & Hayward, A. C. (1993). Potential of biological and chemical control of bacterial wilt. In *Bacterial wilt*, pp. 322-326. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Villemot, I. & Alvarez, A. (1996). Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **86**, 95-101.
- Hasebe, A., Tsushima, S. & Iida, S. (1998). Isolation and characterization of IS1416 from *Pseudomonas glumae*, a new member of the IS3 family. *Plasmid* **39**, 196-204.
- Haubold, B. & Rainey, P. B. (1996). Genetic and ecotypic structure of a fluorescent *Pseudomonas* population. *Mol Ecol* **5**, 747-761.
- Haubold, B. & Rainey, P. B. (1997). Towards an understanding of the population genetics of plant-colonizing bacteria. *Adv Bot Res* **24**, 335-351.
- Hayward, A. C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* **27**, 265-277.
- Hayward, A. C. (1990). Proposal for a quick practical identification. In *Methods in phyto bacteriology*, pp. 269-274. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Hayward, A. C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.
- Hayward, A. C. (1994a). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 9-25. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Hayward, A. C. (1994b). Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 123-135. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Hayward, A. C., El-Nashaar, H. M., Nydegger, U. & De Lindo, L. (1990). Variation in nitrate metabolism in biovars of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* **69**, 269-280.
- Hayward, A. C., Sequeira, L., French, E. R., El-Nashaar, H. M. & Nydegger, U. (1992). Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **82**, 608.
- Hayward, A. C., Elphinstone, J. G., Caffier, D., Janse, J., Stefani, E., French, E. R. & Wright, A. J. (1998). Round table on bacterial wilt (brown rot) of potato. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 420-430. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- He, L. Y., Sequeira, L. & Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* **67**, 1357-1361.
- He, S. Y., Huang, H. C. & Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Harpin<sub>psis</sub>: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266.
- Hébert, Y. (1985). Résistance comparée de 9 espèces du genre *Solanum* au flétrissement bactérien (*Pseudomonas solanacearum*) et au nématode *Meloidogyne incognita*. Intérêt pour l'amélioration de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) en zone tropicale humide. *Agronomie* **5**, 27-32.
- Hendson, M., Hildebrand, D. C. & Schroth, M. N. (1992). Relatedness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *antirrhini*. *J Appl Bacteriol* **73**, 455-464.
- Henry, A.-L., Guillaumès, J., Brin, C. & Manceau, C. (2000). Analyse de la diversité génétique de *Xylophilus ampelinus*, agent de la nécrose bactérienne de la vigne, par PCR-RFLP de l'opéron *rrn* et par AFLP. In *Quatrièmes rencontres de phyto bactériologie*, Aussois, France, pp. 45: INRA.
- Hermans, P. W. M., Sluiter, M., Hoogenboezem, T., Heersma, H., Vanbelkum, A. & De Groot, R. (1995). Comparative study of five different DNA fingerprint techniques for molecular typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Clin Microbiol* **33**, 1606-1612.
- Herron, P. R. & Wellington, E. M. H. (1990). New method for extraction of Streptomyces spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and non sterile soil. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1406-1412.

- Heuer, H. & Smalla, K. (1997). Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In *Modern soil microbiology*, pp. 353-373. Edited by J. D. Van. Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. & Wellington, E. (1997). Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes 16SrRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3233-3241.
- Heuer, H. & Smalla, K. (1999). Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. *FEMS Microbiol Ecol* **28**, 357-371.
- Holben, W. E., Jansson, J. K., Chelm, B. K. & Tiedje, J. M. (1988). DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol* **54**, 703-711.
- Honervogt, B. & Lehmann-Danzinger, H. (1992). Comparison of thermal and chemical treatment of cotton seed to control bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*). *J Phytopathology* **134**, 103-109.
- Horita, M. & Tsuchiya, K. (1998). Diversity of *Ralstonia solanacearum* in tomato rhizosphere soil. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 74-81. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Hsu, S. T. (1991). Ecology and control of *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Prot Bull* **33**, 72-79.
- Hu, X., Lai, F.-M., Reddy, S. N. & Ishimaru, C. A. (1995). Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* **85**, 1468-1473.
- Huang, J., Denny, T. P. & Schell, M. A. (1993). VrsB, a regulator of virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*, is homologous to sensors of the two-component regulator family. *J Bacteriol* **175**, 6169-6178.
- Huang, Y., Xu, P. & Sequeira, L. (1990). A second cluster of genes that specify pathogenicity and host response in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**, 48-53.
- Husain, A. & Kelman, A. (1958). Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **48**, 155-165.
- Hyde, K. D., McCulloch, B., Akiew, E., Peterson, R. A. & Diatloff, A. (1992). Strategies used to eradicate bacterial wilt of *Heliconia* (race 2) in Cairns, Australia, following introduction of the disease from Hawaii. *Australasian Plant Pathology* **21**, 29-31.
- Ito, S., Fujii, T., Ushijima, Y., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yoshiwara, S. & Kishi, F. (1996). Genomic diversity of field isolates of *Burkholderia solanacearum* in Japan. *J Phytopathology* **144**, 501-504.
- Ito, S., Ushijima, Y., Fujii, T., Tanaka, S., Kameya-Iwaki, M., Yoshiwara, S. & Kishi, F. (1998). Detection of viable cells of *Ralstonia solanacearum* in soil using a semiselective medium and a PCR technique. *J Phytopathology* **146**, 379-384.
- Jackson, M. T. & Gonzalez, L. C. (1981). Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (race 1) in a naturally infested soil in Costa Rica. *Phytopathology* **71**, 690-693.
- Jacobsen, C. S. (1995). Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3347-3352.
- Jacobsen, C. S. & Rasmussen, O. F. (1992). Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2458-2462.
- Janse, J. D. (1988). A detection method for *Pseudomonas solanacearum* in symptomless potato tubers and some data on its sensitivity and specificity. *Bull OEPP/EPPPO Bull* **18**, 343-351.
- Janse, J. D. (1991). Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. *Syst Appl Microbiol* **14**, 335-345.
- Janse, J. D. (1996). Potato brown rot in Western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bull OEPP/EPPPO Bull* **26**, 679-695.
- Janse, J. D., Araluppan, F. A. X., Schans, J., Wenneker, M. & Westerhuis, W. (1998). Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 146-152. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M. & Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* **142**, 1881-1893.
- Jatala, P., French, E. R. & Gutana, L. (1975). Interrelationships of *Meloidogyne incognita*, *acrita* and *Pseudomonas solanacearum* on potatoes. *J Nematol* **7**, 325.
- Jaunet, T. & Wang, J.-F. (1998). Population structure of *Ralstonia solanacearum* from a disease nursery and tomato production fields in Taiwan. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 82-88 Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Jaunet, T. X. & Wang, J.-F. (1999). Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Johanson, D. W., Pieniasek, N. J., Griffin, D. W., Misener, L. & Rose, J. B. (1995). Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3849-3855.

- Johnson, H. A. & Powell, N. T. (1969). Influence of root-knot nematodes on bacterial wilt development in flue-cured tobacco. *Phytopathology* **59**, 486-491.
- Johnson, L. F. & Curl, E. A. (1972). *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Minneapolis, USA: Burgess Publishing Company.
- Kalmbach, S., Manz, W. & Szezyk, U. (1997). Dynamics of biofilm formation in drinking water: phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan reduction and in situ hybridization. *FEMS Microbiol Ecol* **22**, 265-279.
- Kang, Y. W., Huang, J. Z., Mao, G. Z., He, L. Y. & Schell, M. A. (1994). Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 370-377.
- Kao, C. C. & Sequeira, L. (1991). A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* **173**, 7841-7847.
- Kao, C. C., Gosti, F., Huang, Y. & Sequeira, L. (1994). Characterization of a negative regulator of exopolysaccharide production by the plant-pathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**, 121-130.
- Kaucner, C. & Stinear, T. (1998). Sensitive and rapid detection of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts in large-volume water samples with wound fiberglass cartridge filters and reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1743-1749.
- Kelman, A. (1953). The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin* **99**, 1-194.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetratzolium medium. *Phytopathology* **44**, 693-695.
- Kelman, A. (1998). One hundred and one years of research on bacterial wilt. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. pp. 1-5. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Kelman, A. & Sequeira, L. (1965). Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* **55**, 304-309.
- Kelman, A., Hartman, G. L. & Hayward, A. C. (1994). Introduction. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 1-7. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Kerstens, K. (1990). Polyacrylamide gel electrophoresis of bacterial proteins. In *Methods in phytobacteriology*, pp. 191-198. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301-307.
- Kiraly, Z., Klement, Z., Solymosy, F. & Voros, J. (1970). *Methods in plant pathology with special reference to breeding for disease resistance*. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Klement, Z., Mavridis, A., Vivader, A., Pérombelon, M. C. M., Moore, L. W. & Rudolph, K. (1990). Inoculation of plant tissues. In *Methods in phytobacteriology*, pp. 95-124. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Kreder, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1102-1106.
- Kritzman, G. (1991). A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seeds. *Phytoparasitica* **19**, 133-141.
- Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K. & Jackson, P. J. (1998). Small-scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2463-2472.
- Laferriere, L. T., Helgeson, J. P. & Allen, C. (1998). *Solanum tuberosum* - *S. commersonii* somatic hybrids are resistant to brown rot caused by *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 316-320. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris: INRA Editions.
- Latour, X., Corberand, T., Laguerre, G., Allard, F. & Lemanceau, P. (1996). The composition of fluorescent pseudomonad population associated with roots is influenced by plant and soil. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2449-2456.
- Layne, R. E. C. & McKeen, C. D. (1967). Southern bacterial wilt of field tomatoes in south western Ontario. *Canadian Plant Disease Survey* **47**, 94-98.
- Leach, J. E., White, F. F., Rhoads, M. L. & Leung, H. (1990). A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**, 238-246.
- Leach, J. E., Leung, H., Nelson, R. J. & Mew, T. W. (1995). Population biology of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and approaches to its control. *Curr Opin Biotech* **6**, 298-304.
- Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V. & Shimkets, L. J. (1995). Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. *Appl Environ Microbiol* **61**, 1141-1143.

- Legard, D. E., Aquadro, C. F. & Hunter, J. E. (1993). DNA sequence variation and phylogenetic relationships among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* inferred from restriction site maps and restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4180-4188.
- Leite, R. P. J., Egel, D. S. & Stall, R. E. (1994a). Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1078-1086.
- Leite, R. P. J., Minsavage, G. V., Bonas, U. & Stall, R. E. (1994b). Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1068-1077.
- Leite, R. P., Jr., Jones, J. B., Somodi, G. C., Minsavage, G. V. & Stall, R. E. (1995). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis* **79**, 917-922.
- Lemattre, M., Albouy, J., Balesdent, M. H. & Spire, D. (1991). Les méthodes sérologiques appliquées au diagnostic de routine des agents phytopathogènes. *Phytoma-La Défense des Végétaux* **430**, 3-5.
- Leung, H., Nelson, R. J. & Leach, J. E. (1993). Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv Plant Pathol* **10**, 157-205.
- Li, X., Dorsch, M., Del Dot, T., Sly, L. I., Stackebrandt, E. & Hayward, A. C. (1993). Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Bacteriol* **74**, 324-329.
- Li, X. & Hayward, A. C. (1993). The use of the Biolog identification system for the rapid identification of plant pathogenic *Pseudomonads*. In *Bacterial wilt*, pp. 45-48. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Li, X. & Hayward, A. C. (1994). Bacterial whole cell protein profiles of the rRNA group II pseudomonads. *J Appl Bacteriol* **77**, 308-318.
- Li, X. & De Boer, S. H. (1995). Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology* **85**, 837-842.
- Lindahl, V. (1996). Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival. *J Microbiol Meth* **25**, 279-286.
- Lindahl, V. & Bakken, L. R. (1995). Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol Ecol* **16**, 135-142.
- Lindgren, P. B., Peet, R. C. & Panopoulos, N. J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. *J Bacteriol* **168**, 512-522.
- Lindgren, P. B., Panopoulos, N. J., Staskawicz, B. J. & Dahlbeck, D. (1988). Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Gen Genet* **211**, 499-506.
- Lloyd, A. B. (1978). Survival of the potato strain of *Pseudomonas solanacearum* in soil. In *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 875-878. Edited by INRA. Angers, France : INRA.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & De Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2286-2295.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & Debruijn, F. J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **85**, 528-536.
- Louws, F. J., Bell, J., Medina-Mora, C. M., Smart, C. D., Opgenorth, D., Ishimaru, C. A., Hausbeck, M. K., De Bruijn, F. J. & Fulbright, D. W. (1998). rep-PCR mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* **88**, 862-868.
- Lucas, G. B., Sasser, J. N. & Kelman, A. (1955). The relationship of root-knot nematodes to Granville wilt resistance in tobacco. *Phytopathology* **45**, 537-540.
- Luisetti, J. & Paulin, J. P. (1972). Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers : I. Recherche de *Pseudomonas syringae* à la surface des organes aériens du poirier et étude de ses variations quantitatives. *Ann Phytopathol* **4**, 215-227.
- Luisetti, J., Gaignard, J. L. & Devaux, M. (1991). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* as one of the factors affecting the ice nucleation of grapevine buds in controlled conditions. *J Phytopathology* **133**, 334-344.
- Lum, K. Y. (1973). Cross inoculation studies of *Pseudomonas solanacearum*. *MARDI Research Bulletin* **1**, 15-21.
- MacDonald, R. M. (1986). Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. *Soil Biol Biochem* **18**, 399-406.
- Machmud, M. (1993). Control of peanut bacterial wilt through crop rotation. In *Bacterial wilt*, pp. 221-224. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Machmud, M. & Middleton, K. J. (1990). Seed infection and transmission of *Pseudomonas solanacearum* on groundnut. In *Bacterial wilt of groundnut*, pp. 57. Edited by K. J. Middleton & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 31.
- Machmud, M. & Middleton, K. J. (1991). Transmission of *Pseudomonas solanacearum* through groundnut seeds. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* **7**, 4-5.

- Maes, M., Garbeva, P. & Crepel, C. (1996). Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. *Plant Pathol* 45, 1139-1149.
- Manceau, C. & Horvais, A. (1997). Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism, analysis of rRNA operons with special emphasis on *P. syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol* 63, 498-505.
- Manceau, C., Coutaud, M.-G. & Guyon, R. (2000a). Assessment of subtractive hybridization to select species and subspecies specific DNA fragments for the identification of *Xylophilus ampelinus* by polymerase chain reaction (PCR). *Eur J Plant Pathol* 106, 243-253.
- Manceau, C., Labarre, P. & Blancho, A. (2000b). L'hybridation soustractive: une technique de biologie moléculaire pour le clonage de fragments génomiques spécifiques des bactéries phytopathogènes. In *Quatrièmes rencontres de phytobactériologie*, pp. 53. Aussois, France: INRA.
- Mangiapan, G., Vokurka, M., Schouls, L., Cadranel, J., Lecossier, D., van Embden, J. & Hance, A. J. (1996). Sequence capture-PCR improves detection of Mycobacterial DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 34, 1209-1215.
- Manulis, S., Valinsky, L., Lichter, A. & Gabriel, D. W. (1994). Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 60, 4094-4099.
- Marenda, M., Van Gijsegem, F., Arlat, M., Zischek, C., Barberis, P., Camus, J. C., Castello, P. & Boucher, C. A. (1996). Genetic and molecular dissection of the *hrp* regulon of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*. In *Biology of Plant-Microbe Interactions*, pp. 165-172. Edited by G. Stacey, B. Mullin & P. M. Gresshoff. St. Paul, USA: International Society for Plant-Microbe Interactions.
- Marenda, M., Brito, B., Callard, D., Genin, S., Barberis, P., Boucher, C. & Arlat, M. (1998). PrhA controls a novel regulatory pathway required for the specific induction of *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes in the presence of plant cells. *Mol Microbiol* 27, 437-453.
- Mariano, R. L. R., Silveira, N. S. S. & Michereff, S. J. (1998). Bacterial wilt in Brazil: current status and control methods. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 386-393. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Marshall, K. C. (1975). Clay mineralogy in relation to survival of soil bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 13, 357-373.
- Martens, D. A. & Frankenberger, W. T. (1992). Decomposition of bacterial polymers in soil and their influence on soil structure. *Biol Fert Soils* 13, 65-73.
- Martin, C. & Nydegger, U. (1982). Susceptibility of *Cyphomandra betacea* to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 66, 1025-1027.
- Mayer, C. L. & Palmer, C. J. (1996). Evaluation of PCR, Nested PCR, and fluorescent antibodies for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* species in wastewater. *Appl Environ Microbiol* 62, 2081-2085.
- Maynard Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 4384-4388.
- McArthur, J. V., Kovacic, D. A. & Smith, M. H. (1988). Genetic diversity in natural populations of soil bacterium across a landscape gradient. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9621-9624.
- McCarter, S. M. & Jaworski, C. A. (1969). Field studies on spread of *Pseudomonas solanacearum* and tobacco mosaic virus in tomato plants by clipping. *Plant Dis Rep* 53, 942-945.
- McCarter, S. M., Dukes, P. D. & Jaworski, C. A. (1969). Vertical distribution of *Pseudomonas solanacearum* in several soils. *Phytopathology* 59, 1675-1677.
- McGarvey, J. A., Denny, T. P. & Schell, M. A. (1999). Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars. *Phytopathology* 89, 1233-1239.
- McGregor, D. P., Forster, S., Steven, J., Adair, J., Leary, S. E. C., Leslie, D. L., Harris, W. J. & Titball, R. W. (1996). Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA. *BioTechniques* 21, 463-471.
- McGuire, R. G. & Jones, J. B. (1989). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato. In *Detection of bacteria in seed and other planting Material*, pp. 59-62. Edited by A. W. Saettler, N. W. Schaad & D. A. Roth. St Paul, USA: APS Press.
- McLaughlin, R. J. & Sequeira, L. (1988). Evaluation of an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* for biological control of bacterial wilt of potato. *Am Potato J* 65, 255-268.
- McLaughlin, R. J., Sequeira, L. & Weingartner, D. P. (1990). Biocontrol of bacterial wilt of potato with an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* interactions with root-knot nematodes. *Am Potato J* 67, 93-107.
- McWilliams, R., Chapman, M., Kowalczyk, K. M., Hersberger, D., Sun, J. H. & Kao, C. C. (1995). Complementation analyses of *Pseudomonas solanacearum* extracellular polysaccharide mutants and identification of genes responsive to EpsR. *Mol Plant-Microbe Interact* 8, 837-844.
- Melton, T. A. & Powell, N. T. (1991). Effects of two-year crop rotations and cultivar resistance on bacterial wilt in flue-cured tobacco. *Plant Dis* 75, 695-698.

- Meunier, J. R. & Grimont, P. A. D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol* **144**, 373-379.
- Michel, V. V., Wang, J.-F., Midmore, D. J. & Hartman, G. L. (1997). Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathol* **46**, 600-610.
- Michel, V. V. & Mew, T. W. (1998). Effect of a soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. *Phytopathology* **88**, 300-305.
- Milgroom, M. G. & Fry, W. E. (1997). Contribution of population genetics to plant disease epidemiology and management. *Adv Bot Res* **24**, 1-25.
- Miller, S. A. & Martin, R. R. (1988). Molecular diagnosis of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* **26**, 409-432.
- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C. & Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**, 456-461.
- Möeller, A. & Jansson, J. K. (1997). Quantification of genetically tagged Cyanobacteria in Baltic sea sediment by competitive PCR. *BioTechniques* **22**, 512-518.
- Moffett, M. L., Wood, B. A. & Hayward, A. C. (1981). Seed and soil: sources of inoculum for the colonisation of the foliage of solanaceous hosts by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann Appl Biol* **98**, 403-411.
- Moffett, M. L. & Croft, B. J. (1983). *Xanthomonas*. In *Plant bacterial diseases, a diagnostic guide*, pp. 189-228. Edited by P. C. Fahy & G. J. Persley. New York, USA: Academic Press.
- Moffett, M. L., Giles, J. E. & Wood, B. A. (1983). Survival of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and 3 in soil: effect of moisture and soil type. *Soil Biol Biochem* **15**, 587-591.
- Monstein, H.-J., Kihlström, E. & Tiveljung, A. (1996). Detection and identification of bacteria using in-house broad range 16S rDNA PCR amplification and genus-specific DNA hybridization probes, located within variable regions of 16S rRNA genes. *APMIS* **104**, 451-458.
- Moreau, R. (1993). Mécanismes de rétention et de déplacement des micro-organismes dans les sols. *C. R. Acad. Agric. Fr.* **79**, 39-46.
- Muzyer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Napière, C. M. (1980). Varying inoculum levels of bacteria-nematodes and the severity of tomato bacterial wilt. *Ann. Trop. Res.* **2**, 129-134.
- Nassar, A., Bertheau, Y., Dervin, C., Narcy, J. P. & Lemattre, M. (1994). Ribotyping of *Erwinia chrysanthemi* strains in relation to their pathogenic and geographical distribution. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3781-3789.
- National Biosciences, I. (1996). *Oligo, primer analysis software, version 5.0*. Plymouth, USA.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Nei, M. & Tajima, F. (1981). DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**, 145-163.
- Nelson, R. J., Baraoidan, M. R., Vera Cruz, C. M., Yap, I. V., Leach, J. E., Mew, T. W. & Leung, H. (1994). Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3275-3283.
- Nesme, X., Vanechoutte, M., Orso, S., Hoste, B. & Swings, J. (1995a). Diversity and genetic relatedness within genera *Xanthomonas* and *Streptophomonas* using restriction endonuclease site differences of PCR-amplified 16S rRNA gene. *Syst Appl Microbiol* **18**, 127-135.
- Nesme, X., Picard, C. & Simonet, P. (1995b). Specific DNA sequences for detection of soil bacteria. In *Nucleic Acids in the Environment, methods and applications*, pp. 111-139. Edited by J. T. Trevors & J. D. v. Elsas. Berlin, Germany: Springer, Lab Manual.
- Nesmith, W. C. & Jenkins, S. F. (1985). Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology* **75**, 1182-1187.
- Neu, T. R. & Lawrence, J. R. (1997). Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* **24**, 11-25.
- Nicole, J. F. (1995). Influence de facteurs biotique ou abiotique sur la dynamique des populations de *Pseudomonas solanacearum* au cours de l'infection et sur le développement de la maladie. Thèse de doctorat, Université de Nantes, France.
- Nicole, J. F., Chéron, J. J., Girard, J. C. & Luisetti, J. (1998). A tentative explanation of the distribution, on Reunion Island, of bacterial wilt caused by either biovar 2 or biovar 3 of *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 343-350. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Nizan, R., Barash, I., Litcher, A. & Manulis, S. (1997). The presence of *hrp* genes on the pathogenicity-associated plasmid of the tumorigenic bacterium *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**, 677-682.
- Nyangeri, J. B., Gathuru, E. M. & Mukuya, D. M. (1984). Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. *Tropical pest management* **30**, 163-165.

- OEPP/EPPO (1990). Méthode de quarantaine no. 26: *Pseudomonas solanacearum*, méthodes d'inspection et de test. *Bull OEPP/EPPO Bull* 20, 255-262.
- Ogram, A., Saylor, G. S. & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J Microbiol Meth* 7, 57-66.
- Okabe, N. (1971). Population changes of *Pseudomonas solanacearum* and soil microorganisms in artificially infested soil. *Rev Plant Protection Res* 4, 105-108.
- Olsso, K. (1976). Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in Sweden. *EPPO Bull* 6, 199-207.
- Ono, K. (1983). Ecological studies on the bacterial wilt of tobacco caused by *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. III. Distribution and spread of the pathogen in infested tobacco field under rain fall. *Bulletin of Okayama Tobacco Experimental Station* 42, 149-153.
- Orgambide, G., Montrozier, H., Servin, P., Roussel, J., Trigalet-Demery, D. & Trigalet, A. (1991). High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GM11000 and the complete structure of the major polysaccharide. *J Biol Chem* 266, 8312-8321.
- Palleroni, N. J. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 141-199. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. (1971). Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *J Bacteriol* 107, 690-696.
- Pan, Y. B., Grisham, M. P. & Burner, D. M. (1997). A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Xanthomonas albilineans*, the causal agent of sugarcane leaf scald disease. *Plant Dis* 81, 189-194.
- Parent, J. G., Lacroix, M., Page, D., Vezina, L. & Vegiard, S. (1996). Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Dis* 80, 494-499.
- Pegg, K. & Moffett, M. (1971). Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husb* 11, 696-698.
- Peregrine, W. T. H. & Ahmad, K. B. (1982). Grafting-a simple technique for overcoming bacterial wilt in tomato. *Tropical pest management* 28, 71-76.
- Permaul, K., Pillay, D. & Pillay, B. (1996). Random-amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis shows intraspecies differences among *Xanthomonas albilineans* strains. *Leti Appl Microbiol* 23, 307-311.
- Petit, F., Craquelin, S., Guespin-Michel, J. & Buffet-Janvresse, C. (1999). Nucleic acid extraction from polluted estuarine water for detection of viruses and bacteria by PCR and RT-PCR analysis. *Res Microbiol* 150, 143-151.
- Picard, C., Ponsonnet, C., Paget, E., Nesme, X. & Simonet, P. (1992). Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58, 2717-2722.
- Pilet, F., Clerc, F., Royer, M., Chatenet, M., Trigalet-Demery, D. & Rott, P. (2000). Différenciation des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre par RFLP et AFLP. In *Quatrièmes rencontres de phytobactériologie*, Aussois, France, pp. 48: INRA.
- Pitcher, R. S. (1963). Role of plant parasitic nematodes in bacterial diseases. *Phytopathology* 53, 35-39.
- Pooler, M. R., Ritchie, D. F. & Hartung, J. S. (1996). Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl Environ Microbiol* 62, 3121-3127.
- Porteous, L. A., Seidler, R. J. & Watrud, L. S. (1997). An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications. *Mol Ecol* 6, 787-791.
- Pradhanang, P. M. (1999). Transmission of *Ralstonia solanacearum* through drainage water. *Bacterial Wilt Newsletter* 16, 5-7.
- Prior, P. & Bérarnis, M. (1990). Induction de la résistance au flétrissement bactérien dû à *Pseudomonas solanacearum* E F Smith chez un cultivar de tomate réputé sensible. *Agronomie* 10, 391-401.
- Prior, P. & Steva, H. (1990). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies. *Plant Dis* 74, 13-17.
- Prior, P., Bérarnis, M., Chillet, M. & Schmit, J. (1990). Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Sm.) resistance mechanisms. *Symbiosis* 9, 393-400.
- Prior, P., Bérarnis, M., Clairon, M., Quiquampoix, H., Robert, M. & Schmit, J. (1993). Contribution to integrated control against bacterial wilt in different pedoclimatic situations: Guadeloupe experience. In *Bacterial wilt*, pp. 294-304. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Prior, P., Grimault, V. & Schmit, J. (1994). Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: Present status and prospects. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent*, *Pseudomonas solanacearum*, pp. 209-223. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, N. W. & Panopoulos, N. J. (1993). Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83, 965-970.
- Prunier, J. P., Gardan, L. & Luisetti, J. (1970). Rôle d'une flore bactérienne dans certaines formes de dépérissement de l'abricotier. *Ann Phytopathol* 4, 295-296.

- Rainey, P. B., Bailey, M. J. & Thompson, I. P. (1994). Phenotypic and genotypic diversity of fluorescent pseudomonads isolated from field-grown sugar beet. *Microbiology* **140**, 2315-2331.
- Ramesh, C. R. & Bandyopadhyay, A. K. (1993). Bacterial wilt potential of soils of Andaman and Nicobar Islands. In *Bacterial wilt*, pp. 355-357. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Ramsay, A. J. (1984). Extraction of bacteria from soil: efficiency of shaking or ultrasonication as indicated by direct counts and autoradiography. *Soil Biol Biochem* **16**, 475-481.
- Rat, B. (1978). Some aspects of resistant soils to *Pseudomonas solanacearum*. In *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 884-885. Edited by INRA. Angers, France: INRA. abstract
- Raunet, M. (1991). *Le milieu physique et les sols de l'île de la Réunion, conséquences pour la mise en valeur agricole*. Réunion: CIRAD.
- Reid, T. M. & Schafer, M. P. (1999). Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. *Mol Cell Probes* **13**, 269-273.
- Restrepo, S. & Verdier, V. (1997). Geographical differentiation of the population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Colombia. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4427-4434.
- Restrepo, S., Duque, M., Tohme, J. & Verdier, V. (1999). AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* **145**, 107-114.
- Restrepo, S., Velez, M., Duque, M. C. & Verdier, V. (2000). Evolution de la structure des populations de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* en Colombie. In *Quatrièmes rencontres de phyto bactériologie*, Aussois, France, pp. 47: INRA.
- Rillo, A. R. (1979). Bacterial wilt of banana in the Philippines. *FAO Plant Prot Bull* **27**, 105-108.
- Roberts, D. P., Denny, T. P. & Schell, M. A. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J Bacteriol* **170**, 1445-1451.
- Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P. & Ambler, D. J. (1990). *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Syst Appl Microbiol* **13**, 34-43.
- Roberts, P. D., Jones, J. B., Chandler, C. K., Stall, R. E. & Berger, R. D. (1996). Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested polymerase chain reaction. *Plant Dis* **80**, 1283-1288.
- Robinson, A. (1993). Serological detection of *Pseudomonas solanacearum* by ELISA. In *Bacterial wilt*, pp. 54-61. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Robinson-Smith, A., Jones, P., Elphinstone, J. G. & Forde, S. M. D. (1995). Production of antibodies to *Pseudomonas solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. *Food and agricultural immunology* **7**, 67-79.
- Rohlf, F. J. (1998). *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter software, version 2.0*. New York, USA.
- Römling, U., Schmidt, K. & Tümmler, B. (1998). One dimensional pulsed-field gel electrophoresis. In *Bacterial genomes: physical structure and analysis*, pp. 312-325. Edited by F. J. de Bruijn, J.R. Lupski & G. M. Weinstock. New York, USA: Chapman & Hall.
- Rosado, A. S., Seldin, L., Wolters, A. C. & Van Elsland, J. D. (1996). Quantitative 16S rRNA-targeted polymerase chain reaction and oligonucleotide hybridization for the detection of *Paenibacillus azotofixans* in soil and the wheat rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **19**, 153-164.
- Rossen, L., Norshov, P., Holmstrom, K. & Rasmussen, O. F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* **17**, 37-45.
- Roth, D. A. (1989). Review of extraction and isolation methods. In *Detection of bacteria in seed and other planting material*, pp. Edited by A.W. Saettler, N.W. Schaad & D. A. Roth. St. Paul, USA: APS Press.
- Roux, K. H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. In *PCR methods and applications*, pp. 185-194. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Rouxel, F., Tivoli, B., Sarniguet, A. & Lucas, P. (1991). La réceptivité des sols aux agents phytopathogènes. *Biofutur* 35-43.
- Rowe, P. R., Sequeira, L. & Gonzalez, L. C. (1972). Additional genes for resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. *Phytopathology* **62**, 1093-1094.
- Rudolph, K., Roy, M. A., Sasser, M., Stead, D. E., Davis, M., Swings, J. & Gossele, F. (1990). Isolation of bacteria. In *Methods in phyto bacteriology*, pp. 43-94. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Saiki, R. K. (1989). The design and optimization of the PCR. In *PCR technology, principles and applications for DNA amplification*, pp. 7-16. Edited by H. A. Erlich. New York, USA: Stockton press.
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A. & Denny, T. P. (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**, 1264-1271.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Samsón, R. & Saunier, M. (1987). Désignation de références sérologiques pour six sérogroupes de pathovars de *Pseudomonas syringae* sur la base de leur lipopolyside. *Bull OEPP/EPPO Bull* **17**, 165-171.

- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria through fatty acid analysis. In *Methods in phytobacteriology*, pp. 199-204. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Schaad, N. W. (1988). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St Paul, USA: The American Phytopathological Society.
- Schaad, N. W., Azad, H. & Panopoulos, N. J. (1989). Identification of *Pseudomonas syringae* pathovar *phaseolicola* by DNA hybridization probe. *Phytopathology* **79**, 903-907.
- Schaad, N. W., Süle, S., van Vuurde, J. W. L., Vrugink, H., Alvarez, A. M., Benedict, A. A., de Wael, L. & van Laere, O. (1990). Serology. In *Methods in phytobacteriology*, pp. 153-190. Edited by Z. Klement, K. Rudolph & D. C. Sands. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. & Panopoulos, N. J. (1995). A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* **85**, 243-248.
- Schell, M. A. (1996). To be or not to be: how *Pseudomonas solanacearum* decides whether or not to express virulence genes. *Eur J Plant Pathol* **102**, 459-469.
- Schell, M. A., Denny, T. P. & Huang, J. (1993). VrsA, a second two-component sensor regulating virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Microbiol* **11**, 489-500.
- Schell, M. A., Denny, T. P., Clough, S. J. & Huang, J. (1993). Further characterization of genes encoding extracellular polysaccharide of *Pseudomonas solanacearum*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 231-239. Edited by E. W. Nester & D. P. S. Verma. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Schell, M. A., Denny, T. P. & Huang, J. (1994). Extracellular virulence factors of *Pseudomonas solanacearum*: role in disease and regulation of expression. In *Molecular mechanisms of bacterial virulence*, pp. 311-324. Edited by C. I. Kado & J. H. Crosa. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Schell, M. A., Roberts, D. P. & Denny, T. P. (1988). Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *J Bacteriol* **170**, 4501-4508.
- Schmidt, T. M. (1998). Multiplicity of ribosomal RNA operons in prokaryotic genomes. In *Bacterial genomes: physical structure and analysis*, pp. 221-229. Edited by F. J. de Bruijn, J.R. Lupski & G. M. Weinstock. New York, USA: Chapman & Hall.
- Schmiediche, P. (1986). Breeding potatoes for resistance to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific, Proc. Int. Workshop. PCARRD, Los Banos, The Philippines, 8-10 Oct. 1985*, pp. 105-111. Edited by G. J. Persley. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 13.
- Schmiediche, P. (1988). Breeding for resistance to bacterial wilt. In *Bacterial diseases of potato, report of the planning conference on bacterial diseases of the potato*, pp. 19-27. Edited by International Potato Center. Lima, Peru: International Potato Center.
- Schmit, J. & Robert, M. (1984). Action des argiles sur la survie d'une bactérie phytopathogène *Pseudomonas solanacearum*. *E.F.S. C R Acad Sc Paris II*, 733-738.
- Schmit, J., Prior, P., Quiquampoix, H. & Robert, M. (1990). Studies on survival and localization of *Pseudomonas solanacearum* in clays extracted from vertisols. In *Plant Pathogenic Bacteria*, pp. 1001-1009. Edited by Z. Klement. Budapest, Hungary: Akadémiai Kiado.
- Scholz, B. K., Jakobek, J. L. & Lindgren, P. B. (1994). Restriction fragment length polymorphism for genetic homology within a pathovar of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1093-1100.
- Schwartz, T., Kalmbach, S., Hoffmann, S., Szewzyk, U. & Obst, U. (1998). PCR-based detection of mycobacteria in biofilms from a drinking water distribution system. *J Microbiol Meth* **34**, 113-123.
- Seal, S. (1995). PCR-based detection and characterization of *Pseudomonas solanacearum* for use in less developed countries. *Bull OEPP/EPPPO Bull* **25**, 227-231.
- Seal, S. (1998a). Molecular methods for detection and discrimination of *Ralstonia solanacearum*. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 103-108. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Seal, S. (1998b). Chair's perspective: diagnosis. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 101-102. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Seal, S. E., Jackson, L. A. & Daniels, M. J. (1992a). Isolation of *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3751-3758.
- Seal, S. E., Jackson, L. A. & Daniels, M. J. (1992b). Use of tRNA consensus primers to indicate subgroups of *Pseudomonas solanacearum* by polymerase chain reaction amplification. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3759-3761.
- Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P. W. & Daniels, M. J. (1993). Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotides primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J Gen Microbiol* **139**, 1587-1594.

- Seal, S. E. & Elphinstone, J. G. (1994). Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, pp. 35-57. Edited by A. C. Hayward & G. L. Hartman. Wallingford, UK: CAB International.
- Seal, S. E., Taghavi, M., Fegan, N., Hayward, A. C. & Fegan, M. (1999). Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathol* 48, 115-120.
- Seneviratne, S. N. (1988). Soil survival of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial diseases of the potato. Report of the planning conference on bacterial diseases of the potato*, pp. 85-91. Edited by International Potato Center. Lima, Peru: International Potato Center.
- Sequeira, L. (1958). Bacterial wilt of bananas: dissemination of the pathogen and control of the disease. *Phytopathology* 48, 64-69.
- Sequeira, L. (1962). Control of bacterial wilt of bananas by crop rotation and fallowing. *Trop Agriculture, Trin* 39, 211-217.
- Sequeira, L. (1993). Bacterial wilt: past, present and future. In *Bacterial wilt*, pp. 12-21. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Sequeira, L. (1998). Bacterial wilt: the missing element in international banana improvement programs. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 6-14. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Sequeira, L. & Rowe, P. R. (1969). Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J* 46, 451-462.
- Shakya, D. D. (1993). Occurrence of *Pseudomonas solanacearum* in tomato seeds imported into Nepal. In *Bacterial wilt*, pp. 371-372. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Shamsuddin, N., Lloyd, A. B. & Graham, J. (1978). Survival of the potato strain *Pseudomonas solanacearum* in soil. *J Aust Inst Agric Sci* 4, 212-215.
- Shekhawat, G. S., Chakrabarti, S. K., Kishore, V., Sunaina, V. & Gadewar, A. V. (1993). Possibilities of biological management of potato bacterial wilt with strains of *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and Actinomycetes. In *Bacterial wilt*, pp. 327-330. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Sicard, D. (1996). Structure génétique des populations de *Colletotrichum lindemuthianum* dans les centres de diversité de son hôte, *Phaseolus vulgaris* L. Thèse de doctorat, Université de Paris XI Orsay, France.
- Simon, R., Hôte, B., Klauke, B. & Kosier, B. (1991). Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. *J Bacteriol* 173, 1502-1508.
- Smith, J. J., Kibata, G. N., Murimi, Z. K., Lum, K. Y., Fernandez-Northcote, E., Offord, L. C. & Saddler, G. S. (1998). Biogeographic studies on *Ralstonia solanacearum* race 1 and 3 by genomic fingerprinting. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 50-55. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Smith, J. J., Offord, L. C., Holderness, M. & Saddler, G. S. (1995). Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) race 3 in Kenya. *Appl Environ Microbiol* 61, 4263-4268.
- Stead, D. E. (1988). Identification of bacteria by fatty acids profiling. *Acta Hort* 225, 32-41.
- Stead, D. E. (1989). Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. *Bull OEPP/EPP/EPPO Bull* 19, 57-68.
- Stead, D. E., Hennessy, J. & Wilson, J. (1997). Modern methods for identifying bacteria. In *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*, pp. 61-73. Edited by A. C. Cassells. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Steffan, R. J., Goksoyr, J., Bej, A. K. & Atlas, R. M. (1988). Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl Environ Microbiol* 54, 2908-2915.
- Stotzky, G. (1997). Soil as an environment for microbial life. In *Modern Soil Microbiology*, pp. 1-20. Edited by J. D. V. Elsas, J. T. Trevors & E. M. H. Wellington. New York, USA: Marcel Dekker Inc.
- Sunaina, V., Kishore, V., Shekhawat, G. S. & Kumar, M. (1997). Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soils by bacterial antagonists. *J Plant Dis Prot* 104, 362-369.
- Sunaina, V., Gupta, P. K., Shekhawat, G. S. & Kishore, V. (1998). Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. *Indian Phytopath* 51, 95-96.
- Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I. & 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. *Int J Syst Bacteriol* 46, 10-15.
- Tagu, D. (1999). RFLP : polymorphisme des longueurs de fragments de restriction. In *Principes des techniques de biologie moléculaire*, pp. 111-112. Edited by D. Tagu. Paris, France: INRA éditions.
- Taylor, J. D. (1970). The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. *Annals of Applied Biology* 66, 29-36.
- Tebbe, C. C. & Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Appl Environ Microbiol* 59, 2657-2665.

- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Laterrot, H. & Grimsley, N. (1996a). Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**, 826-836.
- Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anaïs, G., Mangin, B., Bazin, B., Nazer, R. & Grimsley, N. (1996b). Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol Plant-Microbe Interact* **9**, 837-842.
- Thoquet, P. & Trigalet, A. (2000). Changement de phase chez *Ralstonia solanacearum*. In *Quatrième rencontres de phytobactériologie*, pp. 21. Aussois, France: INRA.
- Thurston, H. D. (1963). Bacterial wilt of potatoes in Colombia. *Am Potato J* **40**, 381-390.
- Thurston, H. D. (1976). Resistance to bacterial wilt. In *Proc. Int. Plann. Conf. Workshop Ecol. Control Bacterial Wilt*, pp. 58-62. Edited by L. Sequeira & A. Kelman. North Carolina University, USA: Raleigh.
- Thwaites, R., Mansfield, J., Eden-Green, S. & Seal, S. (1999). RAPD and rep PCR-based fingerprinting of vascular bacterial pathogens of *Musa* spp. *Plant Pathol* **48**, 121-128.
- Toranzos, G. A., Alvarez, A. J. & Dvorsky, E. A. (1993). Application of the polymerase chain reaction technique to the detection of pathogens in water. *Wat Sci Tech* **27**, 207-210.
- Toth, I. K., Hyman, L. J., Taylor, R. & Birch, P. R. J. (1998). PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. c.* pv. *phaseoli*. *J Appl Microbiol* **85**, 327-336.
- Tourte, C. (1993). Épidémiologie de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* et mise au point de la PCR pour sa détection. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard, Lyon I, France.
- Trevors, J. T. (1992). DNA extraction from soil. *Microb Releases* **1**, 3-9.
- Trigalet, A. & Demery, D. (1986). Invasiveness in tomato plants of Tn5-induced avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol Mol Plant Pathol* **28**, 423-430.
- Trigalet, A. & Trigalet-Demery, D. (1990). Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiol Mol Plant Pathol* **36**, 27-38.
- Trigalet-Demery, D., Montrozier, H., Orgambide, G., Patry, V., Adam, O., Navarro, L., Coteille, V. & Trigalet, A. (1993). Exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum*: relation to virulence. In *Bacterial wilt*, pp. 312-315. Edited by G. L. Hartman & A. C. Hayward. Canberra, Australia: ACIAR Proc. No. 45.
- Trigalet, A., Trigalet-Demery, D. & Prior, P. (1998). Elements of biocontrol of tomato bacterial wilt. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 332-336. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Tsai, Y.-L. & Olson, B. H. (1991). Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**, 1070-1074.
- Tsuchiya, K. & Horita, M. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 61-73. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Tuslime, G., Adipala, E., Opio, F. & Bhagsari, A. S. (1998). Weeds as latent hosts of *Ralstonia solanacearum* in highland Uganda: implications to development of an integrated control package for bacterial wilt. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 413-419. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Van der Wolf, J. M., Bonants, P. J. M., Smith, J. J., Hagenaar, M., Nijhuis, E., Van Beckhoven, J. R. C. M., Saddler, G. S., Trigalet, A. & Feuillade, R. (1998). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* race 3 in Western Europe determined by AFLP, RC-PFGE and Rep-PCR. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 44-49. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Van Gijsegem, F., Gough, C., Zischek, C., Niqueux, E., Arlat, M., Genin, S., Barberis, P., German, S., Castello, P. & Boucher, C. (1995). The *hrp* gene of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Mol Microbiol* **15**, 1095-1114.
- Van Gijsegem, F., Marendra, M., Brito, B., Vasse, J., Zischek, C., Genin, S., Guénéron, M., Barberis, P., Arlat, M. & Boucher, C. (1998). The *Ralstonia solanacearum* *hrp* gene region: rôle of the encoded proteins in interactions with plants and regulation of gene expression. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 178-183. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Van Vuurde, J. W. L., Van Den Bovenkamp, G. W. & Birnbaum, Y. E. (1983). Immunofluorescence microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay as potential routine tests for the detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean seed. *Seed Sci Technol* **11**, 547-559.
- Vasse, J., Frey, P. & Trigalet, A. (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**, 241-251.
- Vaughan, E. K. (1944). Bacterial wilt of tomato caused by *Phytophthora solanacearum*. *Phytopathology* **34**, 443-458.
- Vauterin, L., Swings, J. & Kersters, K. (1991). Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J Gen Microbiol* **137**, 1677-1687.

- Vera Cruz, C. M., Ardales, E. Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F. J., Leung, H., Mew, T. W. & Leach, J. E. (1996). Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses. *Phytopathology* **86**, 1352-1359.
- Verdier, V., Dongo, P. & Boher, B. (1993). Assessment of genetic diversity among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. *J Gen Microbiol* **139**, 2591-2601.
- Verdier, V., Boher, B., Maraïte, H. & Geiger, J. P. (1994). Pathological and molecular characterization of *Xanthomonas campestris* causing diseases of cassava (*Manihot esculenta*). *Appl Environ Microbiol* **60**, 4478-4486.
- Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol. Cell. Biol.* **5**, 25-40.
- Versalovic, J. & Lupski, J. (1998). Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In *Bacterial genomes: physical structure and analysis*, pp. 38-48. Edited by F. J. de Bruijn, J.R. Lupski & G. M. Weinstock. New York, USA: Chapman & Hall.
- Volossiuk, T., Robb, E. J. & Nazar, R. N. (1995). Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3972-3976.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**, 4407-4414.
- Wakimoto, S., Utsu, I., Matsuo, M. & Hayashi, N. (1982). Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in pure water. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **48**, 620-627.
- Wallis, F. M. & Truter, S. J. (1978). Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum* with emphasis on ultrastructure. *Physiol Plant Pathol* **13**, 307-317.
- Wang, J.-F., Hanson, P. & Barnes, J. A. (1998a). Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 269-275. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Wang, J.-F., Thoquet, P., Olivier, J. & Grimsley, N. (1998b). Genetic analysis of quantitative resistance loci (QRL) of tomato variety Hawaii 7996 in Taiwan. In *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*, pp. 245-249. Edited by P. Prior, C. Allen & J. Elphinstone. Paris, France: INRA Editions.
- Wang, J. S., Hou, X. Y. & Hu, B. J. (1983). Studies on the control of the bacterial wilt of peanut. *Acta Phytophylactica Sinica* **10**, 79-84.
- Watanabe, T., Tomita, S., Kudo, M., Kurokawa, M., Orino, A., Todo, A. & Chiba., T. (1998). Detection of *Helicobacter pylori* gene by means of immunomagnetic separation-based polymerase chain reaction in feces. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**, 1140-1143.
- Wei, Z.-M., Laby, R. J., Zumoff, C. H., Bauer, D. W., He, S. Y., Collmer, A. & Beer, S. V. (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**, 85-88.
- Weingartner, D. P., McSorley, R. & Goth, R. W. (1993). Management strategies in potato for nematodes and soil-borne diseases in subtropical Florida. *Nematropica* **23**, 233-245.
- Widjojoatmodjo, M. N., Fluit, A. C., Torensma, R., Verdonk, G. P. H. T. & Verhoef, J. (1992). The magnetic immuno polymerase chain reaction assay for direct detection of salmonellae in fecal samples. *J Clin Microbiol* **30**, 3195-3199.
- Wiedenmann, A., Krüger, P. & Botzenhart, K. (1998). PCR detection of *Cryptosporidium parvum* in environmental samples-a review of published protocols and current developments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **21**, 150-166.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**, 6531-6535.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3741-3751.
- Wise, M. G., McArthur, J. V., Wheat, C. & Shimkets, L. J. (1996). Temporal variation in genetic diversity and structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1558-1562.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Wullings, B. A., Van Beuningen, A. R., Janse, J. D. & Akkermans, A. D. L. (1998). Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol* **64**, 4546-4554.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Arakawa, M. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* **36**, 1251-1275.

- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H. & Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* Gen. Nov.: proposal for *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia eutropha*. *Microbiol Immunol* **39**, 897-904.
- Yessad, S., Manceau, C. & Luisetti, J. (1992). A detached leaf assay to evaluate virulence of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on pear. *Plant Disease* **76**, 370-373.
- Young, C. C., Burghoff, R. L., Keim, L. G., Minak-Bernero, V., Lute, J. R. & Hinton, S. M. (1993). Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1972-1974.
- Young, D. H., Stemmer, W. P. C. & Sequeira, L. (1985). Reassembly of fimbrial hemagglutinin from *Pseudomonas solanacearum* after purification of the subunit by preparative sodium dodecyl sulfate-polycrylamide gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **50**, 605-610.
- Young, D. H. & Sequeira, L. (1986). Binding of *Pseudomonas solanacearum* fimbriae to tobacco leaf cell walls and its inhibition by bacterial extracellular polysaccharides. *Physiol Mol Plant Pathol* **28**, 393-402.
- Zhang, Y., Hua, J. & He, L. (1993). Effect of infected groundnut seeds on transmission of *Pseudomonas solanacearum*. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter* **9**, 9-10.

# ANNEXES

## Liste des annexes

- Annexe 1.** Composition des milieux de culture et du tampon Tris.
- Annexe 2.** Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 1) et d'espèces proches phylogénétiquement.
- Annexe 3.** Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 2 et biovar N2).
- Annexe 4.** Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 3).
- Annexe 5.** Protocole d'extraction de l'ADN total au CTAB (Ausubel *et al.*, 1991).
- Annexe 6.** Mesure de la concentration de l'ADN à l'aide du fluorimètre Hoefer et estimation de sa pureté à l'aide du Bio-Rad Protein Assay.
- Annexe 7.** Exemple d'application de la méthode de Cobb et Clarkson (1994) pour l'amplification d'une zone *hrp*.
- Annexe 8.** Protocole RFLP.
- Annexe 9.** Extraction de l'ADN, par utilisation de microbilles magnétiques Dynal, adaptée de Mangiapan *et al.* (1996).
- Annexe 10.** Extraction de l'ADN, par utilisation de microbilles magnétiques Dynal, adaptée de Jacobsen (1995).
- Annexe 11.** Extraction de l'ADN par utilisation du kit QIAamp (Qiagen).
- Annexe 12.** Composition des tampons de macération des semences évalués pour leur efficacité à lever l'inhibition de la PCR.
- Annexe 13.** Protocole d'extraction de l'ADN selon Audy *et al.* (1996).
- Annexe 14.** Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Volossiuk *et al.* (1995).
- Annexe 15.** Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Porteous *et al.* (1997).
- Annexe 16.** Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Kuske *et al.* (1998).
- Annexe 17.** Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Ito *et al.* (1998).
- Annexe 18.** Les étapes qui conduisent à la modélisation.
- Annexe 19.** Principaux paramètres des modélisations des courbes de temps de survie de *R. solanacearum* (souches A et C) dans différents types d'eau.
- Annexe 20.** Principaux paramètres des droites de régression modélisant l'évolution dans le temps du taux de germination ou du flétrissement observé après irrigation, aux stades semis et jeune plantule de tomate, par de l'eau contaminée par *R. solanacearum* (souches A et C).
- Annexe 21.** Exemple d'application du test de Kramer.

**Annexe 1. Composition des milieux de culture et du tampon Tris.****Milieu de Granada et Sequeira (1983b) modifié par le laboratoire**

Agar	18 g
Tryptone	1 g
Pastone	10 g
Glycérine	6.3 g
NaOH 1N	1.5 mL
Eau osmosée	1 L

*Après autoclavage, ajouter :*

Cristal violet	2 mg
Polymyxine B Sulfate	10 mg
Tyrothricine	20 mg
Chloramphénicol	5 mg
Chlorure de triphényl-tétrazolium	25 mg
Tilt (propiconazole)	0,04 mL
Pénicilline	20 U
pH 7,2	

**Milieu sélectif de la souche A**

*Ajouter au milieu précédent les antibiotiques suivants :*

Rifamycine	120 mg
Streptomycine	65 mg
Novobiocine	10 mg

**Milieu sélectif de la souche C**

Acide nalidixique	50 mg
Streptomycine	65 mg
Novobiocine	10 mg

**Milieu LPGA**

Extrait de Levure	7 g
Pastone	7 g
Glucose	7 g
Agar	18 g
NaOH	2 mL
Eau osmosée	1 L
pH 7,2	

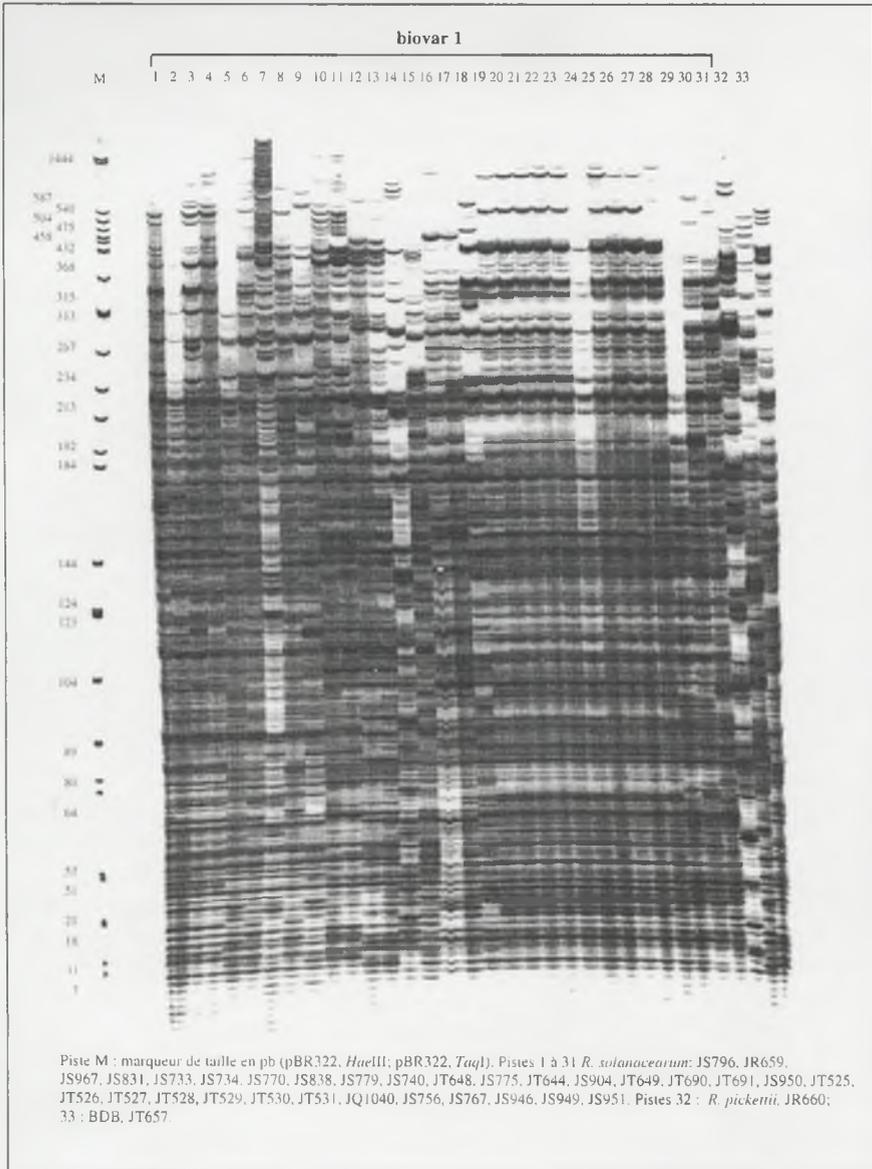
**Milieu LP**

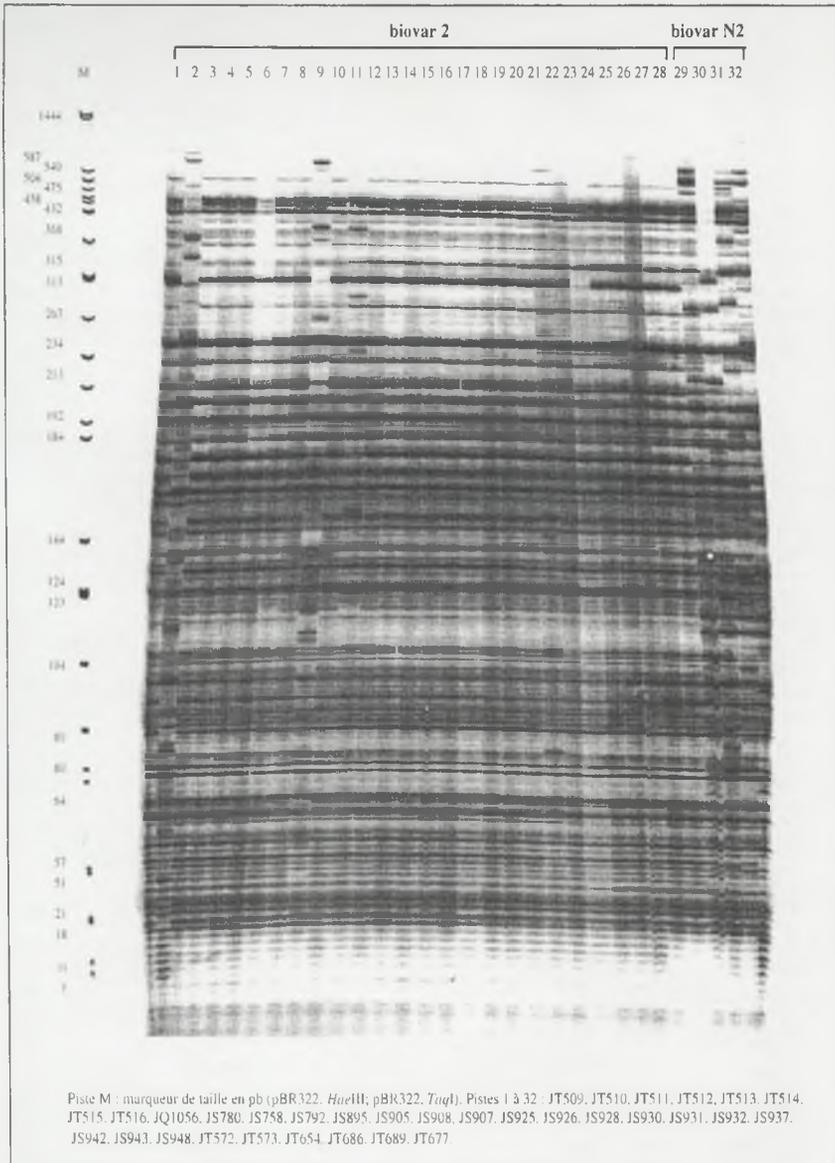
Extrait de Levure	7 g
Pastone	7 g
Eau osmosée	1 L
pH 7,2	

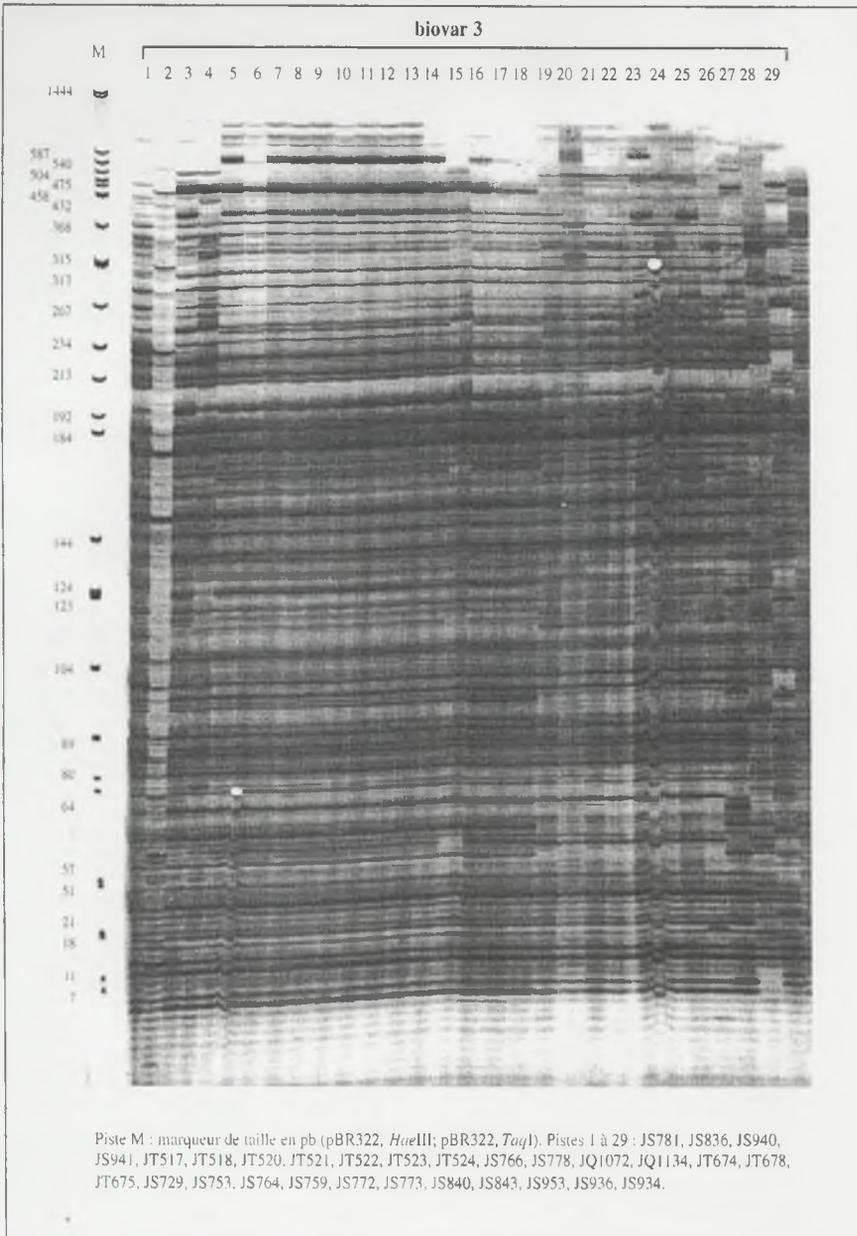
**Tampon Tris**

Tris (hydroxyméthyl) amino-méthane (minimum 99 %) (Sigma 7.9) 1,211 g/L; pH 7,2

Annexe 2. Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 1) et d'espèces proches phylogénétiquement.



Annexe 3. Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 2 et biovar N2).

Annexe 4. Profils AFLP issus de l'ADN de souches de *R. solanacearum* (biovar 3).

**Annexe 5. Protocole d'extraction de l'ADN total au CTAB (Ausubel *et al.*, 1991).**

- Centrifuger 2 mL d'une culture bactérienne âgée de 16 h (milieu LP) pendant 10 min à 13000 tr/min à 20 °C. Eliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot dans 500 µL de TE puis ajouter 30 µL de SDS 10 % et 10 µL de protéase E.
- Incuber pendant une nuit à 37 °C.
- Allumer le bain-marie à 65 °C et faire chauffer le CTAB/NaCl.
- Ajouter 100 µL de NaCl 5 M et vortexer.
- Ajouter 80 µL de CTAB/NaCl, vortexer puis incuber pendant 10 min au bain-marie à 65 °C.
- Ajouter un volume égal, 800 µL, d'isoamylalcool/chloroforme (1 vol/24 vol), mélanger et laisser pendant 20 min à température ambiante. Centrifuger pendant 30 min à 13000 tr/min.
- Récupérer délicatement le surnageant dans de nouveaux tubes.
- Ajouter 2 volumes, soit 1,2 mL d'éthanol absolu glacial. Mettre au congélateur pendant 30 min au moins.
- Centrifuger pendant 10 min à 13000 tr/min à 0 °C. Eliminer le surnageant.
- Rincer le culot avec 500 µL d'éthanol à 70 %.
- Bien faire sécher le culot pendant, soit une nuit à l'air libre, soit 45 min sous vide.
- Resuspendre le culot dans 30 µL de TE.
- Conserver à 4 °C.

**Solutions :**

TE (Tris-EDTA) :

10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA; pH 8.

Protéase E :

10 mg/mL à resuspendre dans 10 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl. Incuber 1 h à 37 °C.

CTAB/NaCl :

10 % hexadécyltriméthylammonium bromide (CTAB).  
0,7 M NaCl.

## Annexe 6. Mesure de la concentration de l'ADN à l'aide du fluorimètre Hoefer et estimation de sa pureté à l'aide du Bio-Rad Protein Assay.

### Mesure de la concentration de l'ADN à l'aide du fluorimètre Hoefer

#### Principe

Le fluorimètre TKO 100 à longueur d'onde fixe est utilisé pour quantifier de faibles concentrations d'ADN allant de 0,1 à 100 ng/μl. Le principe de la méthode est basé sur la fixation sur l'ADN du bis-benzimidazole, également désigné sous le terme de colorant de Hoechst.

En absence d'ADN, le pic d'excitation du colorant se situe à 356 nm et le pic d'émission à 492 nm. Lorsque le colorant se fixe à l'ADN, les pics d'excitation et d'émission se situent respectivement à 365 nm et 458 nm.

#### Mesure de la concentration de l'ADN

Placer 3 μL de solution à mesurer sur du parafilm, y ajouter 3 μL de solution de coloration. Faire monter dans un capillaire, le placer dans l'appareil et mesurer.

La solution de coloration se compose de :

- 100 μl de TNE 100/2000/10 mM (Tris-NaCl-EDTA) 10X, pH 7,4;
- 6 μl de colorant de Hoechst stocké à l'abri de la lumière à 4 °C;
- 894 μl d'eau ultrapure.

Le « blanc » est effectué avec du TE 10/1 mM (Tris-EDTA). Une courbe étalon est obtenue à l'aide d'une série de concentrations connues d'ADN de saumon.

Le colorant se fixant uniquement sur les bases A et T, sa fluorescence dépend directement du contenu en bases A et T de l'ADN à doser. Or, l'ADN de saumon contient 58 % de bases A-T et celui de *Ralstonia solanacearum* n'en contient que 35 %. Il convient donc de rectifier la valeur obtenue par fluorescence en la multipliant par 1,5 qui équivaut au rapport 65/42.

### Estimation de la pureté de l'ADN extrait (Bio-Rad Protein Assay)

- Préparer une gamme étalon de protéine standard (gamma globuline de bovin) comprise entre 1 et 25 μg/mL (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5; 20; 22,5; 25).

- Placer 800 μL de protéine standard ou d'échantillon d'ADN extrait dans un tube.

- Additionner 200 μL de réactif Dye.

- Homogénéiser par passage au vortex ou par inversion des tubes.

- Laisser reposer à température ambiante durant 5 min à 1 h.

- Mesurer la densité optique à 595 nm.

(le « blanc » est effectué avec du TE : 10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8)

### Annexe 7. Exemple d'application de la méthode de Cobb et Clarkson (1994) pour l'amplification d'une zone *hsp*.

Les méthodes de Taguchi ont été établies pour l'optimisation de procédés industriels. Cobb et Clarkson ont adapté ces méthodes pour optimiser les conditions d'amplification obtenues lors d'une réaction PCR. La procédure combine différents facteurs (k) entrant dans le mélange réactionnel en faisant varier leurs concentrations, le test étant réalisé en un nombre limité d'expériences égal à  $2k+1$ . Si ce nombre n'est pas un multiple de trois, il faut alors prendre le multiple supérieur.

Constituants	Conditions		
	A	B	C
Amorces	0,25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	1 $\mu$ M
ADN	40 ng	80 ng	120 ng
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	2 mM	4 mM
dNTP	0,1 mM	0,2 mM	0,4 mM

Dans cet exemple, le nombre théorique d'expériences à réaliser serait de  $3^4$ . 4 est le nombre k de composés dont on choisit de faire varier la concentration et 3 le nombre de concentrations différentes pour chaque composé. Le test de Cobb et Clarkson permet de réduire à 9 le nombre d'expériences nécessaires.

Les combinaisons à préparer sont les suivantes :

Combinaisons	Constituants			
	Amorces	ADN	MgCl <sub>2</sub>	dNTP
1	A	A	A	A
2	A	B	B	B
3	A	C	C	C
4	B	A	B	C
5	B	B	C	A
6	B	C	A	B
7	C	A	C	B
8	C	B	A	C
9	C	C	B	A

**Annexe 8. Protocole RFLP.****A) Electrophorèse de l'ADN**

1. Digérer 1 µg d'ADN avec un enzyme de restriction (*Bam*HI ou *Eco*RI- Life Technologies, Cergy Pontoise, France), ajouter le buffer correspondant (1/10 de volume final), compléter avec de l'eau afin d'avoir le même volume final pour toutes les digestions. Digérer à 37 °C durant toute une nuit.
2. Préparer un grand gel à 1 % (300 mL de TAE; agarose LE). Remplir chaque puit avec l'ADN digéré + tracking dye. Faire migrer pendant 20 h à 50 V. Révéler la migration par le Bet (20 min). Prendre une photo du gel.

**B) Transfert**

Toutes les manipulations doivent s'effectuer avec des gants et des pinces afin de ne pas souiller la membrane.

1. Dépurer le gel avec de l'HCl 0,25 N durant 10 min sous agitation douce.
2. Rincer le gel avec de l'eau.
3. Dénaturer le gel avec NaOH 0,5 N pendant 20 min sous agitation douce.
4. Pendant ce temps, préparer la membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France) : 20 x 20 cm<sup>2</sup>, l'hydrater dans de l'eau ultra pure.
5. Remplacer l'eau par une solution de SSCX10, 10 min.
6. Placer un filtre de papier sur la surface poreuse de l'appareil à transfert. L'hydrater avec le SSCX10. Placer la membrane au centre du filtre. Enlever les bulles en faisant rouler délicatement une pipette Pasteur sur la surface de la membrane.
7. Placer le plastique sur la membrane, s'assurer que la fenêtre couvre entièrement la membrane, et qu'elle est bien sur les joints qui entourent la surface poreuse. Bloquer le tout avec la partie supérieure de l'appareil à transfert.
8. Poser le gel sur le plastique en le cadrant par rapport à la fenêtre. S'assurer qu'il n'y a pas de bulle entre le gel et la membrane.
9. Brancher la pompe à vide sur 5 inches Hg. Le transfert de l'ADN commence aussitôt que le gel est posé sur la membrane. Transférer pendant 90 min, en ajoutant 1 L de SSCX10.
10. Débrancher la pompe à vide, récupérer la membrane. Fixer l'ADN en utilisant le cross-linker, programme C3.

La membrane est prête à être hybridée. On peut également la conserver au frigo, bien emballée dans du plastique étirable.

## C) Hybridation

### 1. Pré-hybridation

- a). Mettre le four à chauffer à 42 °C.
- b). Ajouter du NaCl au tampon "ECL Gold" (Amersham). Une concentration finale en NaCl de 0,5 M et un volume de 50 mL pour une grande membrane sont conseillés.
- c). Ajouter 5 % d'agent bloquant (Roche, Meylan, France) : mettre le tampon sous agitation et verser doucement l'agent bloquant.
- d). Mettre le bécher 15 min au four afin de solubiliser l'agent bloquant. Remuer de temps en temps.
- e). Pendant ce temps, préparer la membrane :  
sur une surface propre, poser la membrane sur le support en tissu préalablement hydraté de SSCX2, verser quelques mL de SSCX2.  
Rouler le tout vers soi, de façon régulière. L'introduire dans un tube à hybridation. Poser le tube sur une surface plane et le faire rouler doucement de façon à ce que la membrane adhère aux parois.
- f). Ajouter 30 mL de SSCX2. Mettre au four, sur rotation, pendant 10 min.
- g). Remplacer le SSCX2 par le "Gold buffer" (Amersham) + NaCl. Préhybrider durant 60 min à 42 °C, sous agitation.

### 2. Marquage de la sonde

La concentration saline doit être inférieure à 10 mM. La quantité de sonde varie en fonction de la sonde utilisée. En moyenne on utilise 200 à 500 ng de sonde pour deux membranes.

- a). Diluer l'ADN à une concentration de 10 ng/μl dans de l'eau ultra pure.
- b). Dénaturer l'ADN pendant 5 min dans un bain-marie bouillant. Le refroidir immédiatement dans de la glace pendant 5 min.
- c). Ajouter un volume équivalent de réactif de marquage (Amersham), homogénéiser.
- d). Ajouter le même volume de glutaraldéhyde (Amersham), homogénéiser et centrifuger brièvement.
- e). Incuber durant 10 min à 37 °C. La sonde est prête. Elle peut être conservée dans de la glace pendant 10 à 15 min ou dans du glycérol 50 % à -20 °C pendant six mois au moins.

### 3. Hybridation

- a). Verser le contenu des tubes d'hybridation dans un erlen. Ajouter la sonde marquée. Mélanger. Remettre dans les tubes. (La concentration de la sonde lors de l'hybridation doit être de 10 ng/ml).
- b). Hybrider pendant toute une nuit à 42 °C, sous agitation.

### 4. Lavages stringents

- a). Laver les membranes dans 30 mL de tampon : SSCX0,1; SDS 0,04 %; urée 6 M, deux fois 20 min à 42 °C, sous agitation.

b). Laver les membranes dans du SSCX2 (environ 50 mL), deux fois 5 min, sous agitation à température ambiante.

### 5. Détection

- a). Mélanger des volumes équivalents des solutions de "détection 1 et 2" (Amersham) (10 mL).
- b). Eliminer le tampon de lavage, couvrir la membrane du mélange de détection. Laisser agir durant 1 min tout en remuant.
- c). Eliminer le mélange de détection et recouvrir la membrane de scello-frais.
- d). Exposer au contact d'un film autoradiographique pendant 10 à 20 min.
- e). Révéler.
- f). Sécher.

### Solutions :

TAE (Tris-acétate) : solution mère 50X.

- 242 g Tris-base
- 57,1mL acide acétique glacial
- 100 mL EDTA 0.5M pH 8
- qsp 1000 mL.

Tracking dye, pour 5 mL.

- 12,5 mg bleu de bromophénol
- 12,5 mg xylène cyanol
- 750 mg ficoll (type 400)
- 5 mL d'eau
- Filtrer sur membrane de porosité 0,2 µm.

HCl solution mère 10 N.

- 862 mL HCl fumant/L.

NaOH solution mère 10 N.

- 400 g/L

SSC solution mère 20X pour 1 L.                    pour 2 L.

- 175 g NaCl                                            350 g
- 88,23 g acide citrique.                    176,5 g
- Ajuster le pH à 7 avec de l'HCl.

Révélateur :

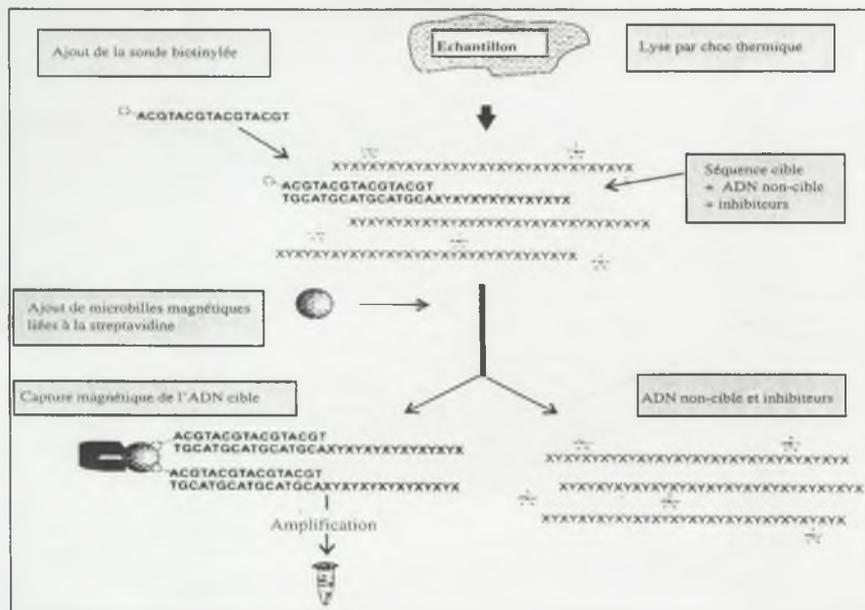
- 750 mL eau ultra pure.
- 200 mL solution A.
- 25 mL solution B.
- 25 mL solution C.

Fixateur :

- 750 mL eau ultra pure.
- 200 mL solution A.
- 50 mL solution B.

## Annexe 9. Extraction de l'ADN, par utilisation de micro-billes magnétiques Dynal®, adaptée de Mangiapan *et al.* (1996).

### Principe



### Protocole

- Laver les micro-billes (quatre fois) avec du tampon B&W (Binding & Washing) ou du tampon PBS; pH 7,4; 0,1 % BSA pour éliminer le  $\text{NaN}_3$ , conservateur présent sur les micro-billes.
- Placer 550  $\mu\text{L}$  d'échantillons à traiter dans des tubes Eppendorf.
- Faire bouillir les échantillons pendant 10 min puis les refroidir dans la glace.
- Ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'une solution contenant du  $\text{NaCl}$  3,75 M et 1  $\mu\text{L}$  (2,5 pmoles) des sondes (RS30 et RS31) biotinylées, incuber durant 1 à 3 h sous agitation à 60 °C.
- Ajouter 5  $\mu\text{L}$  de micro-billes lavées dans chaque tube, incuber sous agitation pendant 2 h à 20 °C.
- Capturer les micro-billes grâce au portoir aimanté (Dynal MPC®), les laver avec le tampon B&W deux fois.
- Resuspendre les billes dans 5  $\mu\text{L}$  d'eau stérile.
- Conserver à 4 °C avant utilisation pour la PCR.

### Solutions :

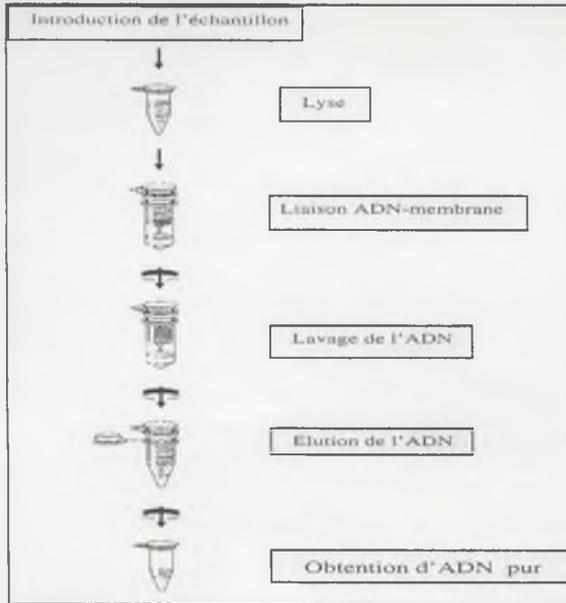
Tampon B&W (2X) : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl.

Tampon PBS : 0,05 M phosphate buffer; 0,9 % NaCl.



## Annexe 11. Extraction de l'ADN par utilisation du kit QIAamp® (Qiagen®).

## Principe



## Protocole

- Centrifuger 1 mL d'échantillon pendant 5 min à 13000 tr/min et resuspendre le culot dans 180  $\mu$ L de tampon ATL (tampon de lyse).
- Ajouter 20  $\mu$ L de protéinase K, vortexer puis incuber à 55 °C en agitant de temps en temps pendant 1 h minimum (bain marie).
- Ajouter 200  $\mu$ L de tampon AL, vortexer et incuber durant 10 min à 70 °C.
- Ajouter 210  $\mu$ L d'éthanol absolu glacial, vortexer.
- Placer la minicolonne QIAamp dans un tube fourni, verser tout l'échantillon dans la colonne puis centrifuger pendant 1 min à 8000 tr/min (ADN fixé à la membrane).
- Ouvrir doucement la colonne placée sur un tube propre et ajouter 500  $\mu$ L de tampon AW1 (premier nettoyage de l'ADN), puis centrifuger pendant 1 min à 8000 tr/min.
- Ouvrir doucement la colonne placée sur un tube propre et ajouter 500  $\mu$ L de tampon AW2 (second nettoyage de l'ADN), puis centrifuger pendant 3 min à 13000 tr/min.
- Ouvrir doucement la colonne placée sur un tube Eppendorf de 2 mL, éluer l'ADN avec 200  $\mu$ L de tampon AE ou d'eau distillée à 70 °C. Incuber pendant 1 min à température ambiante et centrifuger pendant 1 min à 8000 tr/min.
- Conserver l'ADN à 4 °C avant utilisation pour la PCR.

**Solutions** : toutes les solutions utilisées sont fournies avec le kit à l'exception de l'éthanol absolu glacial.

**Annexe 12. Composition des tampons de macération des semences évalués pour leur efficacité à lever l'inhibition de la PCR.**

**Tampon PP**

$K_2HPO_4$	8,5 mM
$KH_2PO_4$	7,5 mM
PVP (polyvinylpyrrolidone) soluble	5 %

**Tampon PPP**

Même composition que le précédent mais avec du PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) insoluble au lieu du PVP.

**Tampon TENP 2 %**

Tris	50 mM
EDTA	20 mM
NaCl	100 mM
PVP	2 %

**Tampon TENPP 2 % et 5 %**

Même composition que le précédent mais avec du PVPP à 2 % et à 5 % au lieu du PVP à 2 %.

**Tampon SCPAPP**

Succinate	4,5 mM
Citrate	4 mM
$K_2HPO_4$	9 mM
$KH_2PO_4$	11 mM
Acide ascorbique	100 mM
PVPP	5 %

**Tampon SCPNAPP**

Même composition que le précédent mais avec de l'ascorbate de sodium (100 mM) au lieu de l'acide ascorbique.

**Annexe 13. Protocole d'extraction de l'ADN selon Audy *et al.* (1996).**

**Estimation de la contamination superficielle des graines**

- Laver les graines dans une solution de NaOH 0,5 N et 0,5 % PVP (200  $\mu$ L pour 25 graines) pendant 2 min.
- Centrifuger à 500 tr/min pendant 2 min (si nécessaire).
- Ajouter 5  $\mu$ L de cet extrait à 495  $\mu$ L de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8.
- Utiliser 2  $\mu$ L pour la PCR.

**Estimation de la contamination interne des graines**

- Laver les graines dans une solution de NaOH 0,5 N et 0,5 % PVP (200  $\mu$ L pour 25 graines) pendant 2 min.
- Rincer deux fois 5 min avec du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8.
- Broyer les graines dans 5  $\mu$ L de NaOH 0,5 N; 0,5 % PVP.
- Ajouter 5  $\mu$ L de cet extrait (éventuellement centrifugé à 500 tr/min pendant 2 min) à 495  $\mu$ L de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8.
- Utiliser 2  $\mu$ L pour la PCR.

**Annexe 14. Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Volossiouk et al. (1995).**

- Centrifuger 1 mL de broyat de sol pendant 5 min à 1000 tr/min à 20 °C.
- Récupérer le surnageant contenant les bactéries et ajouter 500 µL d'une solution de lait écrémé (0,1 g/25 mL d'eau stérile).
- Centrifuger pendant 5 min à 1000 tr/min.
- Récupérer le surnageant et ajouter 2 mL de tampon de lyse auquel est ajouté du PVPP à 5 %.
- Incuber au bain-marie à 70 °C pendant 30 min, en agitant toutes les 10 min.
- Centrifuger pendant 5 min à 500 tr/min pour éliminer le PVPP insoluble.
- Récupérer le surnageant et centrifuger à nouveau pendant 10 min à 13000 tr/min pour éliminer le reste du PVPP.
- Récupérer le surnageant et ajouter du phénol (vol/vol).
- Centrifuger pendant 10 min à 13000 tr/min à 4 °C.
- Précipiter l'ADN présent dans la phase aqueuse avec de l'éthanol (2,5 vol). Incuber à -20 °C pendant au moins 1 h.
- Centrifuger pendant 10 min à 13000 tr/min à 4 °C.
- Nettoyer le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol à 70 % puis centrifuger à nouveau pendant 15 min à 13000 tr/min.
- Sécher le culot d'ADN sous vide pendant 30 à 45 min.
- Resuspendre le culot d'ADN dans 50 µL de tampon TE ou d'eau.
- Conserver l'ADN à 4 °C avant utilisation pour la PCR.

## Composition du tampon de lyse :

SDS	0,3 %
NaCl	0,14 M
NaAc	50 mM
PVPP	5 %

(pH 5.1)

**Annexe 15. Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Porteous et al. (1997).**

- Centrifuger 1 mL de broyat de sol pendant 5 min à 1000 tr/min à 20 °C.
- Récupérer le surnageant contenant les bactéries et ajouter 500 µL de tampon de lyse TENSPP contenant du sodium dodécyl sulphate.
- Incuber au bain-marie à 70 °C pendant 30 min, en agitant toutes les 10 min.
- Centrifuger pendant 5 min à 500 tr/min pour éliminer le PVPP insoluble.
- Récupérer le surnageant et centrifuger à nouveau pendant 10 min à 13000 tr/min pour éliminer le reste du PVPP.
- Précipiter l'ADN contenu dans le surnageant par addition de 75 µL d'acétate de potassium à 5 M et 250 µL de polyéthylène glycol 8000 (PEG) à 40 %; le tout est placé à -20 °C pendant au moins 1 h.
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 tr/min à 4 °C. Eliminer le surnageant.
- Reprendre et précipiter à nouveau le culot par addition de 450 µL d'acétate d'ammonium à 2,5 M et 1 mL d'éthanol absolu, placer à -20 °C pendant au moins 30 min.
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 tr/min à 4 °C. Eliminer le surnageant.
- Nettoyer le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol à 70 % puis centrifuger à nouveau pendant 15 min à 13000 tr/min.
- Sécher le culot d'ADN sous vide pendant 30 à 45 min.
- Resuspendre le culot d'ADN dans 50 µL de tampon TE.
- Conserver l'ADN à 4 °C avant utilisation pour la PCR.

## Composition du tampon TENSPP :

Tris	50 mM
EDTA	20 mM
NaCl	100 mM
SDS	2 %
PVPP	5 %

**Annexe 16. Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Kuske et al. (1998).**

- Centrifuger 1 mL de broyat de sol pendant 5 min à 1000 tr/min à 20 °C.
- Récupérer le surnageant contenant les bactéries et ajouter 500 µL de tampon de lyse TENSPP.
- Incuber au bain-marie à 70 °C pendant 30 min, en agitant toutes les 10 min.
- Centrifuger pendant 5 min à 500 tr/min pour éliminer le PVPP insoluble.
- Récupérer le surnageant et centrifuger à nouveau pendant 10 min à 13000 tr/min pour éliminer le reste du PVPP.
- Précipiter l'ADN contenu dans le surnageant par addition d'acétate de sodium à 3,6 M (pH 5,2) (1/10 vol) et d'éthanol absolu (2,5 vol); le tout est placé à -20 °C pendant au moins 1 h.
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 tr/min à 4 °C. Eliminer le surnageant.
- Nettoyer le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol à 70 % puis centrifuger à nouveau pendant 15 min à 13000 tr/min.
- Sécher le culot d'ADN sous vide pendant 30 à 45 min.
- Resuspendre le culot d'ADN dans 50 µL de tampon TE.
- Conserver l'ADN à 4 °C avant utilisation pour la PCR.

**Composition du tampon TENSPP :**

Tris	50 mM
EDTA	20 mM
NaCl	100 mM
SDS	2 %
PVPP	5 %

**Annexe 17. Protocole d'extraction de l'ADN adapté de Ito *et al.* (1998).**

- Centrifuger 1 mL de broyat de sol pendant 5 min à 1000 tr/min à 20 °C.
- Récupérer le surnageant contenant les bactéries et ajouter 2,7 mL de tampon d'extraction (incluant soit du CTAB soit du PVPP) et 20 µL de protéinase K (10 mg/mL).
- Incuber pendant 30 min à 37 °C sous agitation périodique.
- Ajouter 300 µL de SDS à 20 % (pH 8.0) et incuber à 65 °C pendant 2 h en agitant toutes les 10 ou 15 min.
- (- Si le PVPP est utilisé, centrifuger pendant 5 min à 500 tr/min pour éliminer le PVPP insoluble puis récupérer le surnageant et centrifuger à nouveau pendant 10 min à 13000 tr/min pour éliminer le reste du PVPP.)
- Centrifuger pendant 10 min à 8000 tr/min à 4 °C. Récupérer le surnageant.
- Mélanger le surnageant récupéré avec un vol équivalent de chloroforme-alcool isoamylique (24:1).
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 tr/min à 4 °C.
- L'ADN présent dans la phase aqueuse est précipité avec 0,6 vol d'isopropanol pendant 1 h à température ambiante.
- Centrifuger pendant 15 min à 13000 tr/min à 20 °C.
- Nettoyer le culot d'ADN avec 1 mL d'éthanol à 70 % puis centrifuger à nouveau pendant 15 min à 13000 tr/min.
- Sécher le culot d'ADN sous vide pendant 30 à 45 min.
- Resuspendre le culot d'ADN dans 50 µL de tampon TE.
- Conserver l'ADN à 4 °C avant utilisation.

## Composition du tampon d'extraction :

Tris	100 mM
Na-EDTA	100 mM
sodium phosphate	100 mM
NaCl	1,5 M
CTAB ou PVPP	1 ou 5 %

## Annexe 18. Les étapes qui conduisent à la modélisation.

Exemple : évolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate après irrigation, au stade jeune plantule, par de l'eau contaminée par la souche A de *R. solanacearum* (concentration  $10^8$  ufc/mL).

## Première étape

Transformation des pourcentages en asin  $\sqrt{(\%)}$ .

Transformation des données initiales supposées réparties selon une sigmoïde pour en obtenir une droite.

X (jours)	Y (nb plants flétris)	Y (%)	Y [asin $\sqrt{(\%)}$ ]	Z = Y/(A-Y) * W = log(Z+0,01)	
0	0	0,000	0,00	0,00	-3,00
6	3	0,030	0,17	0,25	-0,60
7	4	0,040	0,20	0,30	-0,52
8	6	0,060	0,25	0,39	-0,41
9	11	0,110	0,34	0,63	-0,20
10	18	0,180	0,44	1,00	0,00
11	19	0,190	0,45	1,06	0,03
12	22	0,220	0,49	1,26	0,10
13	22	0,220	0,49	1,26	0,10
14	26	0,260	0,54	1,57	0,20
15	30	0,300	0,58	1,96	0,29
16	32	0,320	0,60	2,19	0,34
17	38	0,380	0,66	3,15	0,50
18	39	0,390	0,67	3,36	0,53
19	40	0,400	0,68	3,59	0,56
20	43	0,430	0,72	4,46	0,65
21	44	0,440	0,73	4,83	0,68
22	46	0,460	0,75	5,73	0,76
23	47	0,470	0,76	6,29	0,80
24	47	0,470	0,76	6,29	0,80
25	47	0,470	0,76	6,29	0,80
26	49	0,490	0,78	7,75	0,89
27	49	0,490	0,78	7,75	0,89
28	49	0,490	0,78	7,75	0,89

\* A = max [Y (asin  $\sqrt{(\%)}$ )] + 0.1

## Seconde étape

Calculs préliminaires

X	W	x = X - X <sub>moy</sub>	x <sup>2</sup>	w = W - W <sub>moy</sub>	w <sup>2</sup>	x w	W est.	West-West
0	-3,00	-16,29	265,42	-3,21	10,31	52,31	-1,34	-1,55
6	-0,60	-10,29	105,92	-0,81	0,66	8,35	-0,77	-0,98
7	-0,52	-9,29	86,34	-0,73	0,54	6,81	-0,67	-0,88
8	-0,41	-8,29	68,75	-0,62	0,38	5,13	-0,58	-0,79
9	-0,20	-7,29	53,17	-0,41	0,17	3,00	-0,48	-0,69
10	0,00	-6,29	39,59	-0,21	0,04	1,32	-0,39	-0,60
11	0,03	-5,29	28,00	-0,19	0,03	0,98	-0,29	-0,50
12	0,10	-4,29	18,42	-0,11	0,01	0,47	-0,20	-0,41
13	0,10	-3,29	10,84	-0,11	0,01	0,36	-0,10	-0,31
14	0,20	-2,29	5,25	-0,01	0,00	0,03	-0,01	-0,22
15	0,29	-1,29	1,67	0,08	0,01	-0,11	0,09	-0,12
16	0,34	-0,29	0,09	0,13	0,02	-0,04	0,18	-0,03
17	0,50	0,71	0,50	0,29	0,08	0,20	0,28	0,07
18	0,53	1,71	2,92	0,32	0,10	0,54	0,37	0,16

19	0,56	2,71	7,34	0,34	0,12	0,93	0,47	0,26
20	0,65	3,71	13,75	0,44	0,19	1,63	0,56	0,35
21	0,68	4,71	22,17	0,47	0,22	2,23	0,66	0,45
22	0,76	5,71	32,59	0,55	0,30	3,12	0,75	0,54
23	0,80	6,71	45,00	0,59	0,35	3,94	0,85	0,64
24	0,80	7,71	59,42	0,59	0,35	4,53	0,94	0,73
25	0,80	8,71	75,84	0,59	0,35	5,12	1,04	0,83
26	0,89	9,71	94,25	0,68	0,46	6,59	1,13	0,92
27	0,89	10,71	114,67	0,68	0,46	7,26	1,23	1,02
28	0,89	11,71	137,09	0,68	0,46	7,94	1,33	1,11

**Troisième étape**

Calcul des paramètres de la régression

n	24
$Sx^2$	1288,96
$Sw^2$	15,62
$Sxw$	122,66
$Sw^2_{est}$	11,68
$Sw_{est}$	5,06
$S(w_{est})^2$	12,74
$d2WX = Sw^2 - S(w_{est})^2$	3,94
Freg	65,22
$r^2 = (Sxw)^2 / Sx^2 * Sw^2$	0,75
b	0,10
a	-1,34
$sb = \sqrt{(d2xw / (n-2)) / Sx^2}$	0,0118
$t(r^2) = \sqrt{F} = \sqrt{(r^2(n-2)) / (1-r^2)}$	8,08
$t(b=0)$	8,07
$t(0,05 ; 22)$	2,07
-a/b	14,07
moy W	0,21

**équation de base**

$$W = u + v * (X - X_{moy}) = bX + a$$

avec  $u = W_{moy}$ 

$$b = v = S(xw) / S(x^2)$$

$$a = u - v * X_{moy}$$

**Quatrième étape**

Calcul des valeurs ajustées par transformations inverses

X(jours)	West	Zest	Y (asin)est	Y (%)est
0	-1,34	0,04	0,04	<b>0,001</b>
6	-0,77	0,17	0,13	<b>0,016</b>
7	-0,67	0,21	0,15	<b>0,023</b>
8	-0,58	0,26	0,18	<b>0,033</b>
9	-0,48	0,33	0,22	<b>0,046</b>
10	-0,39	0,41	0,25	<b>0,063</b>
11	-0,29	0,51	0,30	<b>0,085</b>
12	-0,20	0,63	0,34	<b>0,111</b>
13	-0,10	0,79	0,39	<b>0,142</b>
14	-0,01	0,98	0,43	<b>0,177</b>
15	0,09	1,22	0,48	<b>0,214</b>
16	0,18	1,52	0,53	<b>0,254</b>
17	0,28	1,90	0,57	<b>0,294</b>
18	0,37	2,36	0,61	<b>0,333</b>
19	0,47	2,94	0,65	<b>0,369</b>
20	0,56	3,66	0,69	<b>0,403</b>
21	0,66	4,56	0,72	<b>0,432</b>
22	0,75	5,68	0,74	<b>0,459</b>
23	0,85	7,07	0,77	<b>0,481</b>
24	0,94	8,80	0,79	<b>0,500</b>
25	1,04	10,96	0,80	<b>0,516</b>
26	1,13	13,64	0,82	<b>0,530</b>
27	1,23	16,98	0,83	<b>0,541</b>
28	1,33	21,14	0,84	<b>0,550</b>

**Notations :**

West	W estimé = $bX + a$
$Sx^2$	Somme des carrés des $x_i$
$Sw^2_{est}$	Somme des carrés des $w_i$ estimés
$SW^2_{est}$	Somme des carrés des $W_i$ estimés
Freg	Valeur F de la régression
$r^2$	Coefficient de corrélation
b	Coefficient de régression
a	Ordonnée à l'origine
sb	Erreur sur b

**Annexe 19. Principaux paramètres des modélisations des courbes de temps de survie de *R. solanacearum* (souches A et C) dans différents types d'eau.**

Type d'eau	Inoculum log (ufc/mL)	Souche A				Souche C			
		r <sup>r</sup>	t (r <sup>r</sup> )	ord. orig. a	pente b	r <sup>r</sup>	t (r <sup>r</sup> )	ord. orig. a	pente b
Eau osmosée (20-25 °C)	7	0,025	0,420	6,809	-0,004	0,704	4,628*	7,031	-0,029
	5	0,185	1,262	3,016	-0,033	0,550	3,320*	4,670	-0,023
	3	0,021	0,383	1,313	0,004	0,757	5,299*	3,628	-0,029
Eau de ville (20-25 °C)	7	0,633	3,941*	4,810	-0,046	0,495	2,973*	5,343	-0,041
	5	0,601	3,684*	4,137	-0,030	0,554	3,345*	3,703	-0,023
	3	0,473	2,843*	2,943	-0,022	0,213	1,561	2,837	-0,014
Première eau d'irrigation (20-25 °C)	7	0,949	7,469*	7,866	-0,508	0,482	1,671	7,293	-0,342
	5	0,933	6,481*	5,034	-0,302	0,381	1,360	4,983	-0,240
	3	0,783	3,292*	2,770	-0,180	0,810	3,576*	2,598	-0,164
Seconde eau d'irrigation (20-25 °C)	7	0,948	7,362*	7,775	-0,503	0,785	3,314*	6,842	-0,379
	5	0,906	5,391*	4,768	-0,334	0,588	2,070	4,620	-0,236
	3	0,650	2,362*	2,502	-0,157	0,860	4,300*	2,388	-0,141
Troisième eau d'irrigation (28 °C)	8	0,835	6,756*	9,281	-0,438	0,751	5,763*	7,715	-0,283
	5	0,841	6,899*	6,181	-0,252	0,764	5,974*	4,688	-0,217
	3	0,761	5,355*	4,437	-0,194	0,815	6,952*	2,903	-0,121
Troisième eau d'irrigation (20-25 °C)	8	0,839	6,840*	8,405	-0,461	0,741	4,476*	8,684	-0,570
	5	0,812	6,237*	3,828	-0,227	0,832	5,883*	4,872	-0,315
	3	0,675	4,319*	2,523	-0,138	0,894	7,685*	3,178	-0,238

\* : valeur supérieure à la valeur tabulaire du t de Student (P=0,05).

**Comparaison des paramètres des droites de régression sans (régression linéaire) ou avec (sigmoïde descendante) transformation des données initiales modélisant la survie de *R. solanacearum* dans l'eau.**

Type d'eau	Inoculum log (ufc/mL)	Souche A		Souche C	
		rég. linéaire t (r <sup>2</sup> )	sigmoïde desc t (r <sup>2</sup> )	rég. linéaire t (r <sup>2</sup> )	sigmoïde desc t (r <sup>2</sup> )
Eau osmosée (20-25 °C)	7	0,420	0,837	4,628*	3,956*
	5	1,262	1,229	3,320*	2,870*
	3	0,383	0,405	5,299*	3,377*
Eau de ville (20-25 °C)	7	3,941*	2,932*	2,973*	2,475
	5	3,684*	3,006*	3,345*	2,286
	3	2,843*	2,043	1,561	1,195
Première eau d'irrigation (20-25 °C)	7	7,469*	12,443*	1,671	1,100
	5	6,481*	6,230*	1,360	0,864
	3	3,292*	2,539	3,576*	3,079*
Seconde eau d'irrigation (20-25 °C)	7	7,362*	8,383*	3,314*	3,886*
	5	5,391*	3,214*	2,070	2,420
	3	2,362*	1,956	4,300*	4,089*
Troisième eau d'irrigation (28 °C)	8	6,756*	5,558*	5,763*	3,925*
	5	6,899*	7,435*	5,974*	5,205*
	3	5,355*	4,185*	6,952*	5,859*
Troisième eau d'irrigation (20-25 °C)	8	6,840*	4,547*	4,476*	3,994*
	5	6,237*	4,195*	5,883*	4,533*
	3	4,319*	3,559*	7,685*	6,544*

\* : valeur supérieure à la valeur tabulaire du t de Student (P=0,05).

Annexe 20. Principaux paramètres des droites de régression modélisant l'évolution dans le temps du taux de germination ou du flétrissement observé après irrigation, aux stades semis et jeune plantule de tomate, par de l'eau contaminée par *R. solanacearum* (souches A et C).

### Germination

Souche	Inoculum log (ufc/mL)	r <sup>2</sup>	t (r <sup>2</sup> ) *	ord. orig. a	pente b
Témoin 1		0,937	11,539	-3,807	0,720
Témoin 2		0,945	12,450	-3,313	0,708
A	3	0,930	10,964	-3,837	0,738
	5	0,905	9,258	-3,805	0,778
	8	0,927	10,686	-3,753	0,688
C	3	0,929	10,882	-3,179	0,703
	5	0,919	10,116	-3,230	0,732
	8	0,929	10,865	-3,190	0,705

\* : toutes les valeurs sont supérieures à la valeur tabulaire du t de Student (P=0,05).

### Flétrissement

Souche	Stade	Inoculum log (ufc/mL)	r <sup>2</sup>	t (r <sup>2</sup> ) *	ord. orig. a	pente b
A	Semis	3	0,768	11,514	-1,745	0,073
		5	0,811	13,110	-3,543	0,140
		8	0,924	22,018	-1,695	0,080
C	Semis	3				
		5	0,660	5,569	-1,758	0,093
		8	0,975	25,160	-3,344	0,165
A	Plantule	3	0,390	3,753	-0,230	0,090
		5	0,831	10,418	-1,512	0,159
		8	0,943	19,061	-2,353	0,170

\* : toutes les valeurs sont supérieures à la valeur tabulaire du t de Student (P=0,05).

**Annexe 21. Exemple d'application du test de Kramer.**

Evolution dans le temps des populations dans le sol selon la combinaison souche-type de sol pour une concentration d'inoculum de  $10^8$  ufc/mL.

**1. Données initiales exprimées en log(ufc/g sol)**

JOURS	0	7	14	22	27
Souche A sol brun	7,28	5,99	5,98	5,82	6
Souche A sol ferrallitique	7,6	4,8	4,71	4,75	4,91
Souche C sol brun	7,54	5,42	5,18	5,38	5,06
Souche C sol ferrallitique	7,17	6,03	5,44	5,36	5,07

**2.** On classe les combinaisons par ordre décroissant des populations, pour chacun des contrôles dans le temps.

JOURS	0	7	14	22	27	SOMME
Souche A sol brun	3	2	1	1	1	8
Souche A sol ferrallitique	1	4	4	4	4	17
Souche C sol brun	2	3	3	2	3	13
Souche C sol ferrallitique	4	1	2	3	2	12

**3.** On compare les sommes des classements pour chaque combinaison aux valeurs données par la table de Kramer. Ici les valeurs seuils : valeur supérieure du groupe inférieur / valeur inférieure du groupe supérieur sont 7 / 18 et les valeurs calculées sont comprises entre ces deux valeurs seuils.

**DONC, PAS DE DIFFERENCE DE CLASSEMENT DES COMBINAISONS  
ET PAR EXTENSION, PAS D'INFLUENCE DE LA SOUCHE ET DU SOL SUR  
LA SURVIE DES POPULATIONS**

## Résumé

Le flétrissement bactérien, dont l'agent causal est *R. solanacearum*, est responsable de dégâts considérables sur un grand nombre de cultures, en particulier les Solanacées maraîchères et les bananiers, en zones tropicales et subtropicales. Seule une prophylaxie adaptée en complément de l'utilisation de variétés résistantes peut réduire l'incidence de la maladie. L'optimisation de la lutte implique une meilleure connaissance de la diversité génétique de l'agent pathogène mais aussi des réservoirs d'inoculum.

La diversité génétique de l'espèce *R. solanacearum* a été évaluée à l'aide de divers outils moléculaires et l'exploration de plusieurs régions du génome. Ces études ont permis de confirmer les divisions 1 (« Asiaticum ») et 2 (« Americanum ») au sein de l'espèce mais surtout d'identifier une nouvelle subdivision constituée uniquement de souches africaines. Par ailleurs, l'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) s'est révélée une technique de choix pour l'étude de la structure d'une population naturelle de *R. solanacearum*.

L'exploration des gènes *hrp* a été un choix pertinent pour l'obtention d'un outil moléculaire, N-PCR-RFLP (Nested-Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), capable de discriminer les biovars ou des groupes de biovars de *R. solanacearum* mais aussi d'assurer la détection efficace de la bactérie dans ses différents réservoirs. La maîtrise d'un tel outil pour la détection dans le sol constitue un résultat majeur de ce travail.

Nous avons clarifié et approfondi certains aspects de la biologie et de l'épidémiologie de la bactérie. Nous avons confirmé que l'eau est un milieu dans lequel la bactérie peut se conserver et qui est susceptible d'assurer efficacement sa dissémination. De même, la semence peut être désormais considérée comme une voie potentielle de transmission de la maladie. Enfin, il apparaît que la durée de survie de *R. solanacearum* est limitée dans un sol nu et que le type de sol est un facteur influençant la conservation de la bactérie mais aussi l'expression de la maladie.

**Mots clés :** flétrissement bactérien, *Ralstonia solanacearum*, biovars, lutte, diversité génétique, PCR, AFLP, gènes *hrp*, structure des populations, identification, détection, épidémiologie, survie, dissémination, eau, semence, sol, île de la Réunion.

## Abstract

The bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is responsible for severe losses to many important crops, mainly Solanaceous plants and bananas, in tropical and subtropical regions. Prophylactic measures, in addition to the use of resistant varieties, is, up to now, the only effective mean to reduce the incidence of the disease. Improving the knowledges on the genetic diversity of the pathogen and on the inoculum sources, is essential to increase the efficiency of the control of the disease.

Genetic diversity of *R. solanacearum* was evaluated by using different molecular tools and exploring different regions of the genome. These studies confirmed divisions 1 (« Asiaticum ») and 2 (« Americanum ») within the species and identified a new subdivision including only African strains. Moreover, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) was demonstrated to be a useful tool for the analysis of the structure of *R. solanacearum* populations in a microgeographic area.

The exploration of the *hrp* region was successful since a efficient molecular tool, N-PCR-RFLP (Nested-Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism), allowing the discrimination of biovars or groups of biovars of *R. solanacearum* and the detection of the pathogen within any inoculum sources, was obtained. The development of such tool for bacterial detection in soil is one of the major results of this work.

Some important traits of the biology of the pathogen and of the epidemiology of the disease were clarified and new informations were provided. Bacterial survival in water was confirmed to depend on the quality of water. Contaminated water, when used as irrigation water, was highly efficient for disease spread. Seeds were demonstrated to be either damaged by *R. solanacearum* or able to insure the spread of the disease. Survival of *R. solanacearum* in soil was rather reduced but was mainly depending on the nature of soil. Nature of soil was shown to modulate disease incidence.

**Key words :** bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, biovars, control, genetic diversity, PCR, AFLP, *hrp* genes, population structure, identification, detection, epidemiology, conservation, spread, water, seed, soil, Reunion island.