Epidémiologie des maladies bactériennes et virales

Les *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre

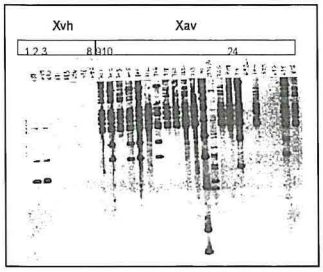

Photo 1 - *Plusieurs souches de Xanthomonas de 2 espèces ont été testées en RFLP (sonde AVR XA 10° ; digestion Bamtt). Pour les Xantomonas vasicola pv. holcicola (Xvh) un premier profil se distingue dans les puits 1 et 2, et un second profil dans les puits 3 à 8. Pour les Xanthomonas axonopodis pv. vasculorum (Xav), on peut différencier 3 profils a) puits 9 b) puits 10 c) puits 24.* *(photo J. Notaise)*

Une étude sur le développement de l'échaudure des feuilles suivant l'âge physiologique de la canne à sucre a été menée sous serre tunnel. Cet essai est conduit également au CIRAD Montpellier. L'objectif de ce travail est de connaître, en fonction de l'âge physiologique de la canne à sucre, les réactions de la plante vis-à-vis du développement de la maladie.

L'étude de la diversité génétique et de la variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre fait l'objet d'un travail de thèse. Il s'agit dans un premier temps de comprendre la diversité génétique et la structure des populations des cinq espèces de *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre. D'autre part, grâce aux essais en serre et au champ, nous caractériserons la variabilité du pouvoir pathogène de l'agent causal de la gommose (*Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*). L'analyse de la corrélation entre diversité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène de ces espèces pathogènes de la canne à sucre permettra d'évaluer l'importance des différents groupes génétiques.

La mise au point de nouveaux milieux sélectifs pour les *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre a pour but de pouvoir isoler spécifiquement les différentes espèces mises en cause. Deux antibiotiques (métronidazole et néomycine) incorporés aux milieux permettent la croissance de tous les *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre. Les autres bactéries associées en milieu naturel à la canne à sucre ne se multiplient pas sur les milieux contenant ces antibiotiques. De plus, deux espèces de *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre peuvent être isolées spécifiquement grâce à leur résistance à l'ampicilline incorporée dans le milieu sélectif. Ces milieux sélectifs autorisent la réalisation d'expérimentations dans un environnement non stérile, comme par exemple de travailler sur des bactéries in planta, ainsi que la détection de bactéries présentes à de faibles niveaux. Les derniers tests de validations des résultats sont en cours.

La diversité génétique des souches de *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre est analysée à l'aide de marqueurs moléculaires neutres ou liés au pouvoir pathogène (*avr*, *hrp*). L'objectif est d'obtenir une image de la structure des populations au niveau de la Réunion, mais également au niveau mondial. Les premiers résultats obtenus par RFLP et par REP-PCR ont révélé un polymorphisme entre les espèces de *Xanthomonas* pathogènes de la canne, mais également, au sein d'une même espèce (Photo 1). A partir de ces résultats, quatre techniques (RFLP, AFLP, RAPD et Box-PCR) ont été sélectionnées pour l'étude complète de la diversité génétique. Les travaux menés en AFLP seront effectués au CIRAD Montpellier.

J. Notaise, L. Gagnevin

Pôle 3 P en construction à Saint-Pierre.

Le flétrissement bactérien des solanacées

Les principaux résultats obtenus en 2000 pour ce qui concerne l'écologie de *Ralstonia solanacearum* et l'épidémiologie du flétrissement bactérien peuvent être déclinés en quatre points :

1) Des outils moléculaires (PCR et Nested-PCR) basés sur une amplification spécifique d'une séquence nucléotidique de la zone des gènes hrp ont été appliqués à la détection de *R. Solanacearum* dans les sols.
L'inhibition partielle ou totale de l'amplification dans les extraits de sol, obstacle majeur à une détection sensible et reproductible de *R. solanacearum*, a pu être levée par le choix d'une méthode d'extraction des bactéries appropriée au sol, renforcée par l'addition de substances intervenant lors de la

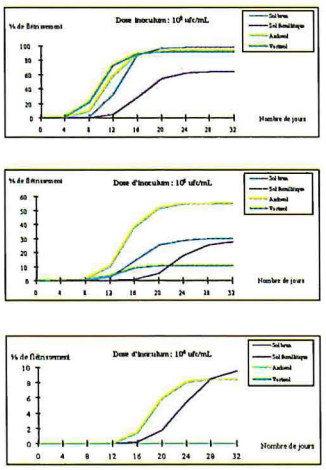

Figure 1 - *Evolution du pourcentage de flétrissement de plants de tomate en fonction du type de sol et de la dose d'inoculation (souche A) après modélisation.*

phase d'amplification (la sérum-albumine bovine ou la protéine P32 du phage T4).
Une comparaison de différentes méthodes d'extraction des bactéries a permis d'en sélectionner une (kit QIAmp) qui confère à la détection par PCR sensibilité et reproductibilité, mais son prix de revient relativement élevé est, pour le moment, un obstacle à une utilisation généralisée.
2) Les différentes méthodes basées sur la PCR et la Nested-PCR ont été comparées pour leur efficacité (sensibilité et reproductibilité) dans la détection de *R. solanacearum* au sein des principaux réservoirs d'inoculum (plantes infectées, semences, eaux d'irrigation et sols). L'efficacité d'une méthode varie selon le réservoir et pour chaque réservoir, une ou plusieurs méthodes sont disponibles. Cependant, la méthode basée sur l'extraction de l'ADN bactérien par le kit QIAmp montre une efficacité élevée quel que soit le réservoir d'inoculum. Le nombre et la nature des étapes requises pour la préparation de l'ADN bactérien et pour l'amplification varient en fonction du réservoir d'inoculum. Elles sont plus nombreuses pour ce qui concerne la détection de *R. solanacearum* dans le sol.

3) Une analyse de diversité génétique de *R. solanacearum* a été engagée sur les populations d'une parcelle dénommée "le vallon", située à proximité du laboratoire et maintes fois utilisée pour des essais de comportement variétal de la tomate en particulier. Sur cette parcelle, qui abrite naturellement "une" abondante population de *R. solanacearum* appartenant à la race 1-biovar 3, et qui manifeste des symptômes de flétrissement dès qu'une plante sensible y est installée, ont été implantés divers hôtes de la bactérie (tomate, poivron, aubergine, piment, tabac, géranium rosat et bringellier (*Solanum torvum*) selon un dispositif expérimental approprié. Un ensemble de 193 isolats extraits des plants en cours de flétrissement ou du sol situé à proximité et identifiés à *R. solanacearum* race 1- biovar 3 a été analysé par AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphysm*), en collaboration avec l'INRA deToulouse. Huit profils AFLP ou haplotypes ont pu être distingués mais leur fréquence est très variable (de 67% à moins de 1%). Leur répartition n'est pas homogène et en particulier les haplotypes minoritaires sont significativement associés à des plantes-hôtes comme le poivron, l'aubergine ou le geranium rosat, ce qui renforce l'hypothèse du rôle de la plante-hôte dans l'apparition de diversité.

4) La capacité des quatre types de sol les plus fréquents à la Réunion (andosol, sol brun, sol ferrallitique et vertisol) à favoriser la survie et la conservation des populations de *R. solanacearum* a été estimée dans une approche expérimentale en conditions contrôlées et portant soit sur un sol nu, c'est-à-dire sans plantes-hôtes, soit sur un sol porteur de jeunes plants de tomate d'une variété sensible. Dans un sol nu, la population bactérienne diminue plus ou moins rapidement selon la nature du sol et aussi selon la souche. Dans un vertisol, la durée de survie est inférieure à 4 semaines quelle que soit la souche ou légèrement supérieure dans un sol brun ou dans un sol ferrallitique. En revanche, dans un andosol, seule la souche de race 1 se maintient au-delà des 6 semaines de l'expérience. Dans un sol porteur de jeunes plants de tomate, la population bactérienne se maintient significativement mieux que dans un sol nu et le délai d'apparition des symptômes ainsi que le taux de flétrissement sont fonction de la souche et de sa concentration mais aussi de la nature du sol. Ainsi l'andosol favorise significativement le développement de la maladie, en particulier pour la souche de race 1, alors que le vertisol le réduit significativement, sauf lorsque la concentration initiale de la population est élevée, auquel cas le taux de flétrissement atteint le niveau de ceux des autres sols. Les sols brun et ferrallitique montrent une réceptivité au moins aussi élevée que celle de l'andosol (Figure 1).

J. Luisetti, S. Poussier

La bactériose de l'oignon

Xanthomonas sp., responsable du dépérissement bactérien, est un agent pathogène largement méconnu. Des études permettant de définir son spectre d'hôtes ont été développées.

Photo 2 - *Isolement de Xanthomonas sp. sur milieu semi-selectif NCTM1 à partir de semences d'oignon cv. Véronique.*
(Photo P. Roumagnac)

Photo 3 - *Dispositif expérimental utilisé pour l'analyse du rôle des semences en tant que source d'inoculum primaire lors d'épidémies du dépérissement bactérien de l'oignon.*
(Photo P. Roumagnac)

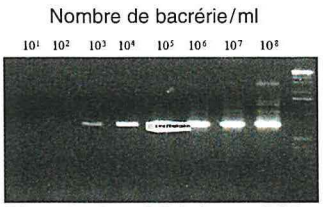

Photo 4 - *Sensibilité du test PCR évaluée sur différentes concentrations bactériennes.*
(Photo I. Soustrade)

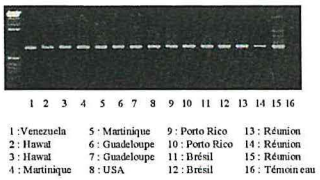

Photo 5 - *Même réponse positive au test PCR pour toutes les souches de X.a. diffenbachiae d'origines géographiques diverses testées.*
(Photo I. Soustrade)

Après inoculation par pulvérisation de souches de *Xanthomonas sp.* pathogène de l'oignon, des symptômes similaires à ceux décrits dans la littérature sur feuilles d'oignon ont été observés sur plusieurs plantes appartenant à la famille des Alliacées (ail, ciboulette, échalote, poireau). Toutefois, les souches sont plus agressives sur l'oignon, hôte d'origine, que sur les autres *Allium* spp. Après inoculation de la majorité des mêmes souches sur des feuilles de haricot, des symptômes morphologiquement proches de la graisse du haricot ont été observés. Nos résultats semblent confirmer des travaux antérieurs réalisés à la Barbade. D'un point de vue épidémiologique, la vérification en conditions naturelles de la présence du haricot dans la gamme d'hôte de *X sp.* reste à réaliser.

La présence dans les semences de *Xanthomonas* sp. a orienté les travaux (1999-2001) sur 1) une étude de l'importance épidémiologique de cet inoculum primaire et 2) la mise au point d'un outil moléculaire de détection de l'agent pathogène. Comme en 1999, l'étude épidémiologique a été axée sur le rôle que jouent les semences contaminées dans le développement d'une épidémie de dépérissement bactérien de l'oignon (photo 2 et 3).
Il a été montré qu'un taux de graines infectées de 4 pour 10000 permet le déclenchement d'une épidémie. L'incidence de la maladie en fin de cycle de culture sur les deux parcelles expérimentales a été respectivement de 8 et 16 %. La distribution de la maladie est agrégée, ce qui indique des infections secondaires (dissémination par les pluies et l'irrigation) à partir d'un nombre limité de foyers primaires (graines contaminées).
Cette étude qui sera renouvelée en 2001 montre que le *Xanthomonas* sp. responsable du dépérissement bactérien de l'oignon est transmissible par semences. Pour confirmer que l'inoculum associé aux épidémies a bien comme origine les semences, une étude de typage moléculaire des souches isolées sur plantes et sur semences sera entreprise en 2001-2002.
Plusieurs fragments d'ADN hautement conservés dans les génomes de sp. ont été identifiés par la méthode RAPD. Ces fragments ont été clonés et leur séquence nucléotidique a été déterminée. L'homologie des séquences obtenues avec des séquences disponibles dans les bases de données internationales a été évaluée.
Si plusieurs des fragments clonés sont homologues de gènes hautement conservés dans les génomes (et n'ont donc pas d'intérêt pour la détection spécifique de la bactérie), deux fragments n'ayant aucun homologue dans les bases de données semblent potentiellement intéressants et ont donc été retenus pour la suite de l'étude.

P. Roumagnac, O. Pruvost

Le dépérissement bactérien de l'anthurium (*Xanthomonas axonopodis pv. dieffenbachiae*)

L'objectif des travaux engagés est la mise au point d'une méthode de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* basée sur l'amplification génique (PCR). Cet outil de détection, sensible et spécifique permettra d'évaluer de façon plus fiable l'état sanitaire du matériel végétal importé et sera également utile pour certifier indemne de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* du matériel végétal devant être multiplié à grande échelle. Cette méthode devra également être valide pour les autres régions (en particulier les Antilles) où la maladie est présente. La mise ou point de tels outils à la Réunion pourra faire l'objet d'une valorisation régionale, voire internationale.

La constitution d'une collection de souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* d'origines géographiques diverses, amorcée en 1999 a été largement poursuivie en 2000.
Au total, environ 180 souches de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* en provenance des différentes zones où le dépérissement bactérien est présent (La Réunion, Hawaii, Venezuela, USA, Brésil, Porto Rico, Guadeloupe et Martinique) ont été rassemblées.
L'identité de chaque souche a été vérifiée par des techniques sérologiques, couplées, quand cela s'est avéré nécessaire, à des tests de pouvoir

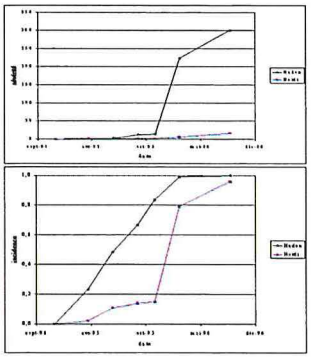

Figure 2 - *Evolution de l'incidence et de la sévérité de la maladie des taches noires du manguier sur cultivar sensible (Haden) et partiellement résistant (Heidi).*

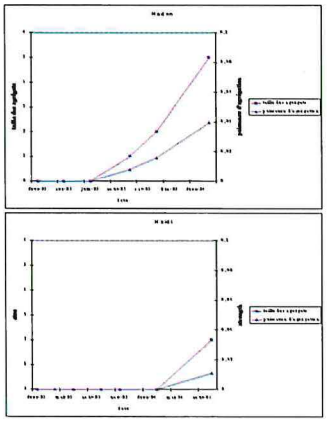

Figure 3 - *Mise en évidence par la technique des autocorrélations spatiales d'une distribution agrégée de la maladie des taches noires du manguier dans deux vergers expérimentaux plantés à l'aide d'un cultivar sensible (Haden) et partiellement résistant (Heidi).*

pathogène sur anthurium menés en milieu confiné. La première étape d'élaboration du test a consisté à identifier une séquence conservée caractéristique de X. a. pv. *dieffenbachiae* par la méthode RAPD-PCR. Une centaine d'amorces RAPD ont été testées sur plusieurs souches du pathogène d'origines géographiques diverses. Plusieurs amorces ont permis l'amplification de fragments spécifiques de *X.* a. pv. *dieffenbachiae*. Deux de ces fragments ont été clonés et séquencés. Une Nested PCR a été développée pour un de ces fragments à l'aide de deux couples d'amorces choisies d'après la séquence nucléotidique. Les deux amplifications successives de la Nested PCR assurent une grande sensibilité de détection du pathogène (de l'ordre de 10^3 bactéries/ml) (Photo 4). Cette technique permet l'amplification d'un même fragment chez toutes les souches testées de X. a. pv. dieffenbachiae pathogènes sur Anthurium. (Photo 5). Par contre aucune amplification n'est observée pour d'autres *Xanthomonas* et genres bactériens, ainsi que différentes souches bactériennes isolées de feuille d'anthurium mais non pathogènes sur ce végétal. L'étude de la détection de la bactérie in planta à l'aide de ce test est en cours au laboratoire. Ces travaux devraient aboutir à la mise au point d'un outil de diagnostic sensible, universel et rapide d'emploi, utilisable à différents niveaux de la lutte contre cette maladie : surveillance phytosanitaire, certification, études épidémiologiques.

I. Soustrade, L. Gagnevin

La maladie des taches noires du manguier *(Xanthomonas sp. pv. mangiferaeindicae)*

L'analyse de l'influence de résistance partielle à la maladie des taches noires présente dans un cultivar sud-africain (Heidi) a été poursuivie en conditions contrôlées et au champ par des analyses du développement spatio-temporel de la maladie dans deux vergers expérimentaux de la station de Bassin-Plat. La maladie s'est généralisée dans les deux parcelles (Figure 2) suite au passage des dépressions de faible intensité Connie (janvier 2000) et Eline (février 2000). Toutefois, les arbres malades du cultivar sensible (Haden) portaient en moyenne 20 fois plus de symptômes que ceux du cultivar partiellement résistant (Figure 2).

La modélisation du développement temporel de l'incidence de la maladie dans les deux parcelles démontre que la résistance partielle entraîne un retard significatif dans la progression des épidémies. Les résultats confirment que la dissémination de Xm en vergers est majoritairement associée à la Réunion au passage de dépressions. Cependant, les analyses spatiales d'épidémies par la méthode des autocorrélations spatiales mettent en évidence que, chez un cultivar sensible, des disséminations à courte distance (d'arbre à arbre) se produisent rapidement après l'arrivée d'inoculum liée au passage d'une dépression (pluies et vents à faible vitesse, opérations d'entretien du verger). La maladie a alors rapidement une distribution agrégée (Figure 3). Sur le cultivar partiellement résistant, ces disséminations secondaires sont beaucoup plus limitées. La présence d'agrégation a été détectée avec un an de retard par rapport au cultivar sensible (Figure 3). L'analyse génétique des isolats collectés lors de la première année d'épidémie (1999) a permis de mettre en évidence que le cultivar partiellement résistant sélectionne assez rapidement une sous-population bactérienne qui est un sous-ensemble de celle présente sur un cultivar sensible planté dans la même zone.

Cette sélection est mise en évidence lorsqu'un gène d'avirulence est utilisé comme sonde (Photo 6). En revanche, les indices de diversité mis en évidence à l'aide d'un marqueur neutre vis-à-vis du pouvoir pathogène ne sont pas différents sur les deux cultivars. Il est maintenant nécessaire d'une part de suivre cette évolution au cours des cycles épidémiques suivants et, d'autre part, de mesurer le pouvoir pathogène des souches sélectionnées de façon à estimer le risque à moyen terme de voir se développer des épidémies causées par des sous-populations plus agressives.

En conditions contrôlées, les résultats indiquent que l'épaisseur de la cuticule (barrière à l'infection) sur les cultivars sensibles et partiellement

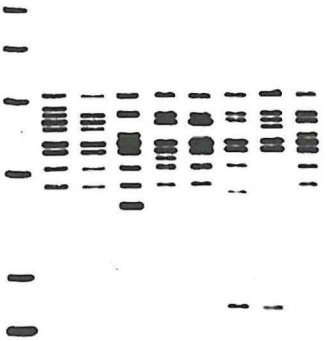

Photo 6 - *Exemples de profils RFLP obtenus avec la sonde avcXa10 (souches provenant des essais épidémiologiques).* *(O. Pruvost)*

résistants n'est pas statistiquement différente, mais qu'à l'issue de blessures, la cicatrisation est plus rapide chez le cultivar partiellement résistant.

L'analyse de la diversité génétique par des souches prélevées dans un verger expérimental de manguier cv. Haden a été poursuivie. Le typage moléculaire de ces isolats (± 700) avec la séquence insertionnelle IS1595 a permis de confirmer que la grande majorité de l'inoculum primaire était exogène et que les populations épiphytes détectées en pépinière n'ont contribué que très faiblement à l'épidémie. Ces résultats indiquent qu'une dépression de très faible intensité (Daniela) peut permettre la migration d'inoculum sur au moins quelques centaines de mètres.

Des travaux complémentaires ont été initiés en phytotron dans l'objectif de mieux comprendre l'importance biologique de la phase épiphyte chez X.m. La bactérie se maintient mieux à la surface des feuilles étant à un stade phénologique jeune. De plus, elle colonise plus fréquemment et plus abondamment la face inférieure des feuilles. On la retrouve souvent localisée au niveau de la nervure centrale (zone de fort relief) et en pourtour du limbe (accumulation fréquente d'eau libre). Ce micro-climat lui permet d'être abritée des rayons UV et de la dessiccation par exemple. La localisation plus précise de la bactérie (réellement en surface ou au niveau de sites plus internes ?) reste à évaluer. De plus, des résultats préliminaires indiquent que sa survie à l'état de biofilms semble limitée. Trois groupes génomiques, dont deux semblent provenir d'un ancêtre commun, existent à l'île de la Réunion. Il semble que la lignée regroupant les groupes génomiques C et D ait une aptitude épiphyte nettement plus prononcée que les représentants du groupe génomique A.
Nous utilisons au laboratoire plusieurs techniques d'analyse du génome nous permettant de mesurer la diversité génétique des bactéries et de comprendre la structure des populations et leur évolution dans le temps et dans l'espace. De nouveaux outils (AFLP : amplification enzymatique à partir de sites de restriction et LMPCR : amplification enzymatique à partir de sites de restriction et de sites d'éléments insertionnels) ont été évalués et adaptés à *Xm*.
Les techniques AFLP et LMPCR permettent de différencier un plus grand nombre de types au sein d'une population, et il existe une bonne corrélation au niveau des relations mises en évidence entre souches. L'utilisation de nouveaux outils d'analyse du génome devrait permettre d'améliorer la précision des résultats et la taille des échantillons analysés pour des études d'épidémiologie.

O. Pruvost, L. Gagnevin

Le syndrome de la feuille jaune de la canne à sucre

Le Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV), agent causal du syndrome de la feuille jaune de la canne à sucre, était largement répandu à la Réunion en 1998. Les taux d'infection variaient de 10 à 100% selon les six lieux et les trois cultivars étudiés. Ces taux d'infection n'ont pas beaucoup varié de 1998 à 2000. Ces résultats suggèrent que :
1/ il existe une différence variétale vis-à-vis de l'infection virale,
2/ les souches de canne à sucre ne " récupèrent " pas de la maladie après une récolte,
3/ la maladie serait surtout disséminée à la Réunion par la plantation de boutures contaminées et non par l'intermédiaire d'insectes vecteurs.
L'évolution des populations virales in planta a été étudiée à l'aide de boutures infectées. La distribution du SCYLV dans les tiges était systémique et uniforme depuis la germination des boutures jusqu'à 10 mois de croissance, quelle que soit la variété. Si aucune différence de répartition du virus n'a été mise en évidence entre variétés, des différences de densités de populations virales ne peuvent cependant pas être exclues.
Une autre étude a été effectuée pour déterminer l'impact du syndrome de la feuille jaune causé par le SCYLV sur les variétés R570, R577 et R579. Des boutures issues de cannes à sucre saines et infectées ont été plantées au champ dans un essai blocs incomplets à 6 répétitions.
Plusieurs paramètres ont été considérés pour étudier l'impact économique : nombre de tiges par touffe, hauteur, diamètre, poids et richesse en

sucre des tiges. Des différences significatives entre plantes saines et plantes virosées ont été observées pour la variété R577 quel que soit le paramètre considéré, excepté le nombre de tiges par touffe. Un effet de la maladie sur le diamètre et le poids des tiges de la variété R579 n'est pas mis en évidence au seuil statistique de 5% mais au seuil de 8%. Aucun impact n'a pu être mis en évidence pour la variété R570, quel que soit le paramètre mesuré.

```
117                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
1 RPTDRERAAHSIGKYGALARQRIQNGNLITNIAEVTKGHLGSTNTLYALPAPPTERQTGVWFSKVC
2 A•LTATC•LDREVRRPCPSAYPERQPHHQHCRGHQGPSW•HQHSLRS•CTPYI•PNLIRRVVFSLF
3 •T•••••••••••••••••••••••••••••••E••••Q•••••••W•R•••••IRR••SL•••
```

Alignement des séquences protéiques du gène capside des isolats de CymV réunionnais et asiatiques –S2 et –K2 (1), -S1 (2) et –K1 (3)

- homologies entre (1) et (2)
- homologies entre (2) et (3)

Figure 4 - *Séquence génétique*

Une relation entre la présence du virus et la présence de symptômes a pu être mise en évidence. Plus les symptômes sont sévères, plus le taux d'infection par le SCYLV est élevé, quelle que soit la variété étudiée. La variété R577 présentait le plus grand nombre de plants virosés ainsi que les symptômes les plus sévères.

L. Rassaby

Photo 7- *Bulbes de la variété Ti l'ail Rouge assainie en potyvirus (OYDV et LYSV).*
(Photo F. Leclerc)

Les virus du vanillier et de l'ail

Les cultures réunionnaises sont soumises à de nombreuses contraintes phytosanitaires. Parmi celles-ci, les virus limitent le rendement de deux cultures traditionnelles que sont l'ail et la vanille. Pour lutter contre ce fléau viral, les voies de l'assainissement et de la multiplication de matériel indemne de virose ont été choisies. Elles nécessitent non seulement la mise en place de structures adaptées à l'entretien de matériel assaini mais aussi le suivi de mesures prophylactiques limitant les phénomènes de recontamination en plein champ.
Pour garantir à terme la diffusion de boutures indemnes des principaux virus et donc se doter de méthodes de diagnostic fiables, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des potexvirus et potyvirus infectant le vanillier à la Réunion et également en Polynésie Française. Nous assurons également la multiplication d'ail assainie en potyvirus dont les performances agronomiques ont été suivies chez le producteur.
Les premiers travaux de caractérisation virale montrent qu'une seule souche de cymbidium mosaic virus (CymV) (Figure 4), homogène sur le plan sérologique, biologique et moléculaire, infecte les vanilliers à la Réunion. Dans le schéma de certification de lianes indemnes de potexvirus, développé sur l'île depuis 1998, les outils de diagnostic employés, ELISA et PCR, seront prochainement comparés à la technique d'immunoempreinte plus pratique à mettre en œuvre sur le terrain. La rédaction du règlement technique de production de boutures indemnes de potexvirus est en cours et le document provisoire est actuellement soumis à des experts du SOC. Les techniques de diagnostic et de caractérisation des potyvirus disponibles à ce jour sont loin d'être optimales. S'il est prévu une nouvelle production de réactifs immunologiques (K. Farreyrol, boursière de la Région Réunion en PhD à l'Université d'Auckland, NZ) celle-ci devra prendre en compte la diversité des situations et donc se faire à partir d'isolats réunionnais et polynésiens. Les outils moléculaires d'identification restent à optimiser et devraient apporter les premiers éléments de réponse à la variabilité suspectée des potyvirus du vanillier. Outre les potex- et potyvirus, les prospections effectuées en 2000 par K. Farreyrol révèlent la contamination des vanilliers polynésiens par un virus, le cucumber mosaic virus (CMV), encore non inventorié sur cette espèce végétale.

Depuis la multiplication en pleine terre de somaclones assainis en potyvirus de la variété Ti l'ail Rouge (Photo 7) nous disposons de bulbes de fort calibre et de forme homogène (ronde à plateau racinaire bombé). Sur les 6 clones multipliés, les numéros de poids moyen et de calibre plus élevés soit 2B, 3B et 17B, sont retenus pour amplification

Ces clones présentent également des colorations diverses avec des tuniques externes/internes plutôt blanches/rosées pour le clone 2B, rosées/rosées pour le clone 3B et blanches/violacées pour le clone 17B.

La variété assainie en potyvirus,Ti l'ail Rouge, exprime un potentiel agronomique élevé puisque sa croissance végétative significativement supérieure à celle de la variété Vacoa se traduit par la production de bulbes d'aspect régulier et de calibre et poids moyens supérieurs à ceux enregistrés pour la variété Vacoa.

F. Leclerc

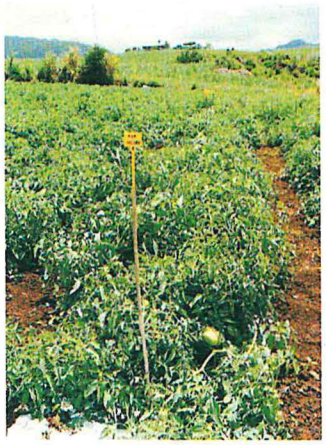

Photo 8 - *Vue générale de l'essai agronomique 99-2000 de variété de petites tomates de plein champ résistante au TYLCV.*
(Photo B. Reynaud)

Photo 9 - *Exemple d'obtention de tomate résistante au TYLCV potentiellement intéressante en terme agronomique (rendement et type de fruit).*
(Photo B. Reynaud)

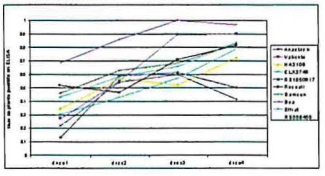

Figure 5 - Essai 2000 – Incidence du TYLCV sur différentes variétés de grosse tomate indéterminée après infestation artificielle selon différentes durées cumulées d'inoculation.

Le tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)

Variabilité moléculaire du TYLCV

Pour confirmer en 2000 que nous avons bien toujours une seule souche de TYLCV présente sur tomate dans l'île et surtout suivre son évolution depuis son introduction en 1997, nous sommes allés prélever des échantillons sur les mêmes exploitations maraîchères infectées en 1997. Seul un exploitant avait arrêté la culture de tomate et nous avons donc pu récolter des échantillons positifs en juillet de 6 origines. Les six séquences correspondantes ont été comparées entre elles et avec les 7 séquences obtenues précédemment. L'hétérogénéité des séquences obtenues en 2000 a été évaluée à $4,8 \times 10^{-3}$. Une comparaison avec les résultats de 1999 (2×10^{3}), suggère que l'hétérogénéité de la population de TYLCV de La Réunion est en augmentation.
En terme de variabilité du virus, ces résultats confirment l'hypothèse d'une introduction récente et limitée. La souche de la Réunion serait très proche d'une des dernières souches de TYLCV-II déterminées en Espagne et au Maroc. L'évolution de la population sur la base des séquences analysées étant vraisemblablement le résultat de la dérive génétique, il sera intéressant de montrer à plus long terme l'existence ou non de sélection positive (en particulier concernant la virulence).

Evaluation du niveau de résistance des variétés de tomate d'intérêt agronomique

Comme en 1998 et 1999, nous avons participé à la campagne d'essai 99-2000 des variétés de tomates résistantes au TYLCV chez les maraîchers sous l'égide du groupe de travail TYLCV (Photo 9) (cf. rapport REYNAUD et al.) (ARMEFHLOR, Chambre d'Agriculture, CIRAD, DAF/SPV, FDGDEC). Le niveau agronomique des obtentions des semenciers privés a pu être évalué et certaines obtentions sont maintenant d'un grand intérêt commercial pour la Réunion (photo 9). Par contre, les niveaux d'infestation naturelle par le TYLCV ont été insuffisants pour juger leur niveau de résistance.

Pour remédier à cela, des essais sous infestation artificielle étaient prévus sur les meilleures obtentions. En 2000, ils ont pu être réalisés uniquement sur les variétés indéterminées de grosses tomates pour la culture sous abri en raison d'un manque de semences (Figure 5). Une technique d'inoculation en cage permettant de moduler l'importance de l'infestation (Durée Cumulée d'Inoculation (DCI)) a été utilisée pour mieux évaluer le niveau de résistance en fonction de la quantité d'inoculum.
Les résultats montrent que l'on a bien une augmentation de l'incidence en fonction de la DCI, quelles que soient les variétés résistantes, alors même que le témoin sensible est déjà totalement atteint. Cette augmentation de l'incidence en fonction de la DCI est hautement significative et prouve l'intérêt de cette technique pour évaluer la résistance. On a également un effet variété hautement significatif, ce qui permet de classer les obtentions en fonction de leur niveau de résistance.

B. Reynaud, M. Peterschmitt

Dynamique des populations et comportement des ravageurs et de leurs auxiliaires

Le foreur ponctué de la canne à sucre (*Chilo sacchariphagus*)

Le foreur ponctué, *Chilo sacchariphagus*, est un ravageur majeur de la canne à sucre dans le sud-est asiatique et l'Océan Indien. A la Réunion, il est responsable de pertes importantes pour la variété de canne à haut rendement R579. La dynamique des populations du foreur est étudiée à l'échelle régionale depuis 4 ans, en relation avec les variétés, les pratiques culturales et le climat ; cette étude constitue un observatoire