Epidémiologie des maladies bactériennes et virales

Etude de la diversité génétique et de la variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* de la canne à sucre

Plusieurs espèces de *Xanthomonas* attaquent la canne à sucre et provoquent l'apparition de symptômes foliaires souvent similaires (nécroses, stries, blanchiments,...) :

- X. *albilineans*, agent causal de l'échaudure des feuilles ;
- X. *axonopodis pv. vasculorum* ; responsable de la gommose ;
- X. *vasicola pv. holcicola*, responsable de la striure bactérienne du sorgho ;
- *Xanthomonas sp.*, agent causal de la fausse striure rouge au Brésil.

L'échaudure des feuilles et la gommose sont des maladies signalées dans beaucoup de zones de culture de la canne à sucre, notamment à la Réunion. Les seuls moyens de lutte sont préventifs. La sélection de variétés résistantes est nécessaire au sein des programmes d'amélioration variétale, et son efficacité repose sur une bonne connaissance de la diversité et de la variabilité de ces agents pathogènes.

Des gènes impliqués dans la virulence et l'agressivité des bactéries phytopathogènes *(avr et hrp)* ont été identifiés.

Dans cette étude, nous avons appréhendé la diversité de ces gènes parmi les différents *Xanthomonas* qui attaquent la canne à sucre. La variabilité mise en évidence au sein de ces gènes permet de distinguer les espèces de *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre, à l'exception de *Xanthomonas albilineans* ; et de classer le *pathovar X. axonopodis pv. vasculorum* en trois groupes comprenant :

1/ des souches réunionnaises isolées de canne à sucre ;

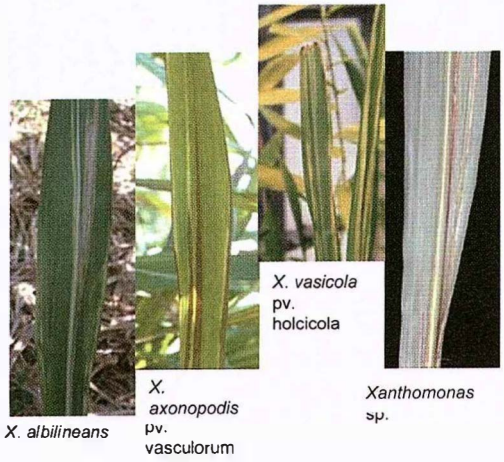
2/ des souches réunionnaises, mauriciennes et australiennes isolées de canne à sucre et d'autres plantes hôtes ;

3/ deux souches mauriciennes exclusivement.

Le pouvoir pathogène de six souches réunionnaises de X. *axonopodis pv. vasculorum* est actuellement évalué sur canne à sucre au champ.

Une variabilité dans l'expression des symptômes, en fonction des souches de l'agent pathogène a déjà été observée trois mois après inoculation des plantes. Cependant, aucune relation ne semble exister à ce stade entre la variabilité du pouvoir pathogène et la diversité génétique.

L. Costet et L. Gagnevin



Symptômes foliaires sur canne à sucre causés par différentes espèces de Xanthomonas.

Appuis en phytopathologie à la profession cannière

La lutte contre les maladies de la canne à sucre est en grande partie basée sur l'utilisation de variétés résistantes. L'objectif de ce travail est donc de s'assurer que les obtentions variétales du Cerf présentent un niveau suffisant de résistance aux principales maladies. Cette année, une trentaine de clones du Cerf ont été évalués vis-à-vis de leur comportement à l'échaudure des feuilles et à la gommose. Ces essais ont permis de classer les variétés selon leur comportement vis-à-vis de ces deux maladies. Parmi ces variétés, sept présentent une sensibilité marquée à au moins une des deux maladies. Dix autres variétés sont, dans les conditions de l'essai, tolérantes aux deux maladies.

L. Costet

Maladie des taches noires du manguier

L'analyse de l'influence de la résistance partielle à la maladie des taches noires (*Xanthomonas* sp. pv. *mangiferaeindicae*) présente dans un cultivar sud-africain (Heidi) a été poursuivie en conditions contrôlées et au champ par l'analyse du développement spatio-temporel de la maladie dans deux vergers expérimentaux de la station de Bassin Plat. Les notations effectuées à l'issue de la saison cyclonique 2000-2001 ont montré une diminution de la sévérité de la maladie dans les deux parcelles. Cette baisse globale de la quantité d'inoculum peut s'expliquer par trois phénomènes concomitants : chute importante de feuilles malades, opération de taille menée en fin de saison cyclonique et surtout conditions climatiques peu favorables au développement de la maladie pendant de la saison cyclonique 2000-2001.

La pluviométrie a été plus faible que l'année précédente (370 vs. 530 mm) et la dissémination (fig 1) beaucoup moins efficace. En conséquence, le nombre de nouvelles infections n'a pas complètement contrebalancé les diminutions d'inoculum. Les arbres malades du cultivar sensible étaient beaucoup plus sévèrement infectés sur feuilles (en moyenne 15 fois plus de symptômes) (fig 2) que ceux du cultivar partiellement résistant. Les données recueillies sur fruits début 2001 confirment l'intérêt du cultivar Heidi :

- Rendement 2,4 fois plus faible chez le cultivar sensible qui peut s'expliquer partiellement par les chutes importantes de feuilles et de jeunes fruits liées aux infections bactériennes ;
- 57% de mangues récoltées infectées par la bactérie pour le cultivar sensible contre 1% pour le cultivar partiellement résistant ;

Cet essai a été reconduit en décembre 2001.

Ainsi, deux nouveaux vergers expérimentaux plantés avec les mêmes cultivars ont été installés à Saint-Pierre. La collecte d'isolats fin 2000 a été effectuée selon un plan en W qui a permis d'analyser 221 isolats de la parcelle Heidi et 244 isolats de la parcelle Haden. Nous avons comparé la structure des populations des deux parcelles pour l'année 2000 et entre l'année 2000 et 1999 à l'aide des deux outils de typage moléculaire IS1595 (en théorie neutre) et *avrXa*10 (qui joue en théorie un rôle dans le pouvoir pathogène). Le calcul des coefficients de différenciation génotypique (Fst) permet de mettre en évidence si les populations bactériennes des deux parcelles sont différenciées et quelles forces évolutives induisent cette différenciation :

- En 1999 les populations sont légèrement différenciées. Cette différenciation est similaire quel que soit l'outil moléculaire utilisé. Cela indique qu'il y a eu une forte migration correspondant à l'apport initial d'inoculum.
- En 2000 les populations sont plus fortement différenciées et le coefficient plus fort pour l'outil neutre, ce qui indique que l'inoculum n'a pas été réorganisé (en relation avec l'absence d'événements climatiques majeurs) et qu'il y a eu une dérive génétique des populations bactériennes.

La conclusion principale de ces résultats est qu'il n'y a pas de pression de sélection exercée par l'un ou l'autre des cultivars ou que si il y a une pression de sélection, elle s'exerce de façon homogène sur les populations des deux parcelles. Ceci est à vérifier à l'aide de tests de pouvoir pathogène.

O. Pruvost, L. Gagnevin

Fig. 1

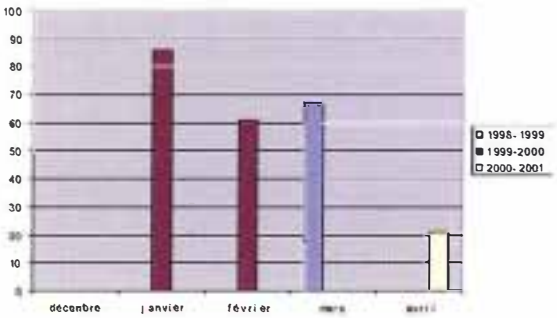


Fig. 1 Index de dissémination (calculé par un index prenant en compte le nombre d'occurrences où la dissémination naturelle est possible et la vitesse des vents associés aux pluies) sur la base de données météorologiques enregistrées sur le site expérimental pendant la saison cyclonique.

Fig. 2

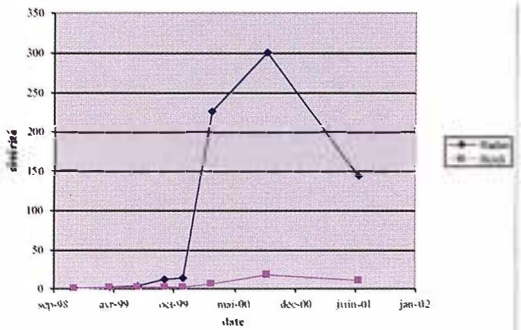
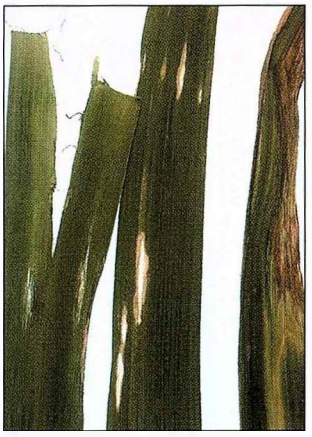


Fig 2. Evolution temporelle de la sévérité de la maladie des taches noires du manguier dans deux vergers expérimentaux plantés respectivement à l'aide d'un cultivar sensible (Haden) et partiellement résistant (Heidi).



Symptômes de bactériose des Alliacées sur poireau. (P. Roumagnac)

Dépérissement bactérien de l'Anthurium

La mise au point d'une méthode de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, (*Xad*) basée sur l'amplification génique (Pcr) s'est poursuivie au cours de l'année 2001.

Une Pcr gigogne (Nested Pcr) a été développée pour un fragment spécifique de Xad préalablement déterminé par Rapd-Pcr. La détection du pathogène par cette méthode est extrêmement sensible puisqu'elle présente un seuil de l'ordre de 10^3 bactéries/ml. Sa spécificité a été démontrée in vitro sur la totalité de la collection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* constituée depuis le début des travaux. Aucune amplification n'est observée pour les autres *Xanthomonas* et genres bactériens testés à ce jour et pour les différentes souches bactériennes isolées non pathogènes. L'identification de ces dernières à partir de leurs caractères biochimiques et culturaux a été réalisée. Parmi les Gram -, le groupe des entérobactéries est fortement représenté (*Pantoea, Proteus, Morganella, Citrobacter*...) ainsi que les Pseudomonas et genres apparentés (*Sphingomonas, Burkolderia*...). Les bactéries à coloration de Gram +, moins nombreuses sont constituées essentiellement de *Bacillus*.

Les premiers essais de détection du pathogène in planta, réalisés sur des broyats de feuilles d'Anthurium contaminées, ont montré qu'il existait une inhibition de l'amplification. Elle est classiquement provoquée par diverses substances végétales (souvent phénoliques) libérées au cours du broyage. Différents protocoles de traitement des échantillons de plantes ont été testés dans le but d'éliminer ces substances inhibitrices et d'assurer ainsi une amplification optimale. Nous avons montré que l'ajout lors du broyage, d'un tampon d'extraction spécifique à base de Pvp supprime l'effet inhibant des extraits de plantes sur la Pcr et permet de détecter la bactérie avec un niveau de sensibilité égal à celui obtenu lorsque le test est réalisé sur la bactérie en culture pure. Différentes expérimentations sur du matériel infecté sont en cours afin de confirmer ces résultats sur différentes variétés d'Anthurium.

Un outil de diagnostic sensible et spécifique est d'ores et déjà au point mais nécessite une validation sur différentes variétés d'Anthurium.

Parallèlement, l'évaluation de la spécificité du test se poursuit pour chaque nouvelle entrée de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* dans la collection de souches bactériennes. Le transfert de la technique vers la Daf-Spv est prévu courant 2002. À terme, nous disposerons d'un test utilisable à différents niveaux de la lutte contre la bactériose de l'Anthurium : surveillance phytosanitaire, certification, études épidémiologiques...

Plusieurs techniques de quantification des bactéries sont en cours de mise au point pour la détection du pathogène dans les sols des sites de production (Pcr compétitive) afin de réaliser un suivi au cours du temps de l'inoculum

P. Laurent, I. Soustrade, L. Gagnevin

Dépérissement bactérien des Alliacées

En 2001, les dégâts occasionnés par le dépérissement bactérien des Alliacées ont été importants à la Réunion, plus particulièrement sur les parcelles d'oignon et d'ail. Pour la première fois au niveau international, des souches ont été isolées à partir de symptômes naturels sur poireau au Lpgr. Cette maladie bactérienne a par ailleurs été répertoriée pour la première fois dans plusieurs zones de culture de l'oignon ces deux dernières années (Texas, Colorado, Californie, Venezuela, Japon, Afrique du Sud), ce qui lui confère le statut de maladie émergente au niveau international.

La mise au point d'un outil moléculaire de détection de l'agent pathogène afin d'élaborer un test de dépistage de la bactérie au sein de lots de semences produites localement ou importées est en cours de réalisation.

Un fragment d'Adn commun à l'ensemble des souches de *Xanthomonas* sp. isolées dans l'archipel des Mascareignes a été identifié. Il possède une bonne spécificité vis-à-vis de la bactérie cible, mais elle n'est pas totale.

Des fragments nucléotidiques non spécifiques issus d'amplifications à partir d'Adn de quelques souches de *Xanthomonas* associés à d'autres cultures ont été séquencés. Un nouveau couple d'amorces a été synthétisé à la suite de ces

travaux. La méthode Pcr en cours d'évaluation a été utilisée pour vérifier que des souches provenant de tous les pays nouvellement contaminés sont reconnues par le test.

Les résultats obtenus en 2000 et 2001 indiquent que la grande majorité des isolats, hormis quelques uns, sont reconnus par le test. Cela a conduit à la réalisation d'une étude sur la diversité génétique du *Xanthomonas* responsable du dépérissement bactérien des Alliacées par Aflp.

Le niveau de diversité intrapathovar est assez important, ce qui pourrait expliquer la difficulté à détecter l'ensemble des isolats par la méthode Pcr mise au point. Les prochains travaux viseront à optimiser les conditions expérimentales permettant une détection sensible de la bactérie in planta et dans les semences produites localement et à développer un protocole rendant universel le test de détection (Pcr multiplex).

L'étude épidémiologique menée en 2001 a confirmé les résultats obtenus en 2000. 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).

La transmission de la maladie par les semences doit être confirmée par une étude de typage moléculaire des souches isolées pluri-annuellement dans l'archipel des Mascareignes ainsi que dans les essais expérimentaux de 2000 et 2001 (à partir des semences naturellement contaminées et des plantes malades au champ). Si tel est le cas, un taux faible de semences contaminées (0,4 ‰) peut être à l'origine d'une épidémie se développant sur 15 % des plants d'une parcelle.

Cette valeur d'incidence de la maladie a été observée dans des conditions climatiques de saison sèche, conditions peu favorables au développement d'épidémie d'origine bactérienne. Une étude menée en Californie a montré que dans des conditions optimales de développement de l'épidémie, 70% des plants peuvent être atteints avec une perte de 50% sur le rendement final.

P. Roumagnac, O. Pruvost

Flétrissement bactérien des Solanacées

Une étude comparative des différentes méthodes de détection de *Ralstonia solanacearum* réalisée selon une approche expérimentale a permis de montrer :

- Les limites de certaines méthodes du fait de la présence de substances inhibitrices dans les extraits de plantes (tabac, geranium rosat) et dans les extraits de sol.
- L'efficience d'adjuvants d'extraction (polyvinylpyrrolidone et polyvinylpoly-pyrrolidone) pour neutraliser en partie ou en totalité les effets inhibiteurs et celle d'autres adjuvants (SérumAlbumine bovine, Proteine 32 du phage T4 ou Nycodenz) pour favoriser l'amplification génique.

L'utilisation de microbilles magnétiques auxquelles est associée une séquence spécifique de *Ralstonia solanacearum* s'est révélée efficace dans la détection de la bactérie sauf lorsque le milieu d'extraction contient des éléments figurés qui peuvent masquer la réaction d'hybridation (broyats de plantes ou de graines). L'efficacité est, en revanche, bonne à partir de la plupart des extraits de sol même si pour certains la sensibilité de détection est nettement moindre. L'utilisation du kit QIAmp (Qiagen®, GmbH, Allemagne) confère à la méthode de détection par Pcr une efficacité et une sensibilité de très bon niveau, quelle que soit l'origine de la population bactérienne.

En association avec les adjuvants précédemment cités, elle permet d'abaisser le seuil de détection à environ 1000 bactéries par ml d'extrait. Pour assurer une bonne reproductibilité, il convient que les conditions de l'amplification soient strictement respectées. L'étude en conditions contrôlées ("phytotron") de l'interaction entre les biovars 1 et 3 de *R. solanacearum* a pu être effectuée sous trois conditions de température : 20°, 25° et 30°C. Il se confirme que le résultat de la compétition entre les biovars, en terme de niveau de population, dépend de la température d'incubation, le biovar 3 étant favorisé à 30°C et le biovar 1 l'étant à 20°C.

On retrouve donc pour l'interaction entre les biovars 1 et 3, des résultats similaires à ceux enregistrés pour les biovars 2 et 3 avec, cependant, un effet positif des températures fraîches sur la compétitivité du biovar 1, moins marquée que pour le biovar 2.

J. Luisetti (Inra)

Symptômes de bactériose des Alliacées sur ail (P. Roumagnac)

Jaunissements causés par le syndrome de la feuille jaune sur canne à Sucre. (L. Rassaby)

Vanillier sous ombrière. à gauche : plante virosée, à droite : plante saine. (L. Rassaby)

Syndrome des feuilles jaunes de la canne à sucre

Les recherches menées sur le syndrome de la feuille jaune causé par le Sugarcane yellow leaf virus (SCYLV) avaient pour objectifs de déterminer l'impact du virus, d'étudier l'évolution des populations virales dans la plante et au champ, d'analyser la dissémination de la maladie et de caractériser la variabilité génétique du SCYLV à La Réunion.

Les caractéristiques agronomiques de cannes à sucre infectées ou non ont été comparées au champ avec trois cultivars : R570, R577 et R579. Des pertes significatives de la production en tonnage (23%) et en sucre (11%) ont été mises en évidence en canne plantée pour R577 uniquement. En revanche, en première repousse, 10% de perte en sucre et 36% de perte en tonnage ont été constatés pour R577 et une perte en tonnage (16%) a été contatée pour R579.

L'enquête conduite pour déterminer la progression du SCYLV en conditions naturelles a montré que les pourcentages d'infection ont varié selon le cultivar et selon le site de prélèvement, mais sont restés relativement stables sur une période de 30 mois.

Ces résultats suggèrent qu'à La Réunion :

1/ le niveau de résistance à la maladie diffère selon les cultivars,

2/ les souches de canne à sucre infectées le demeurent lors des cycles de récolte successifs

3/ le virus est principalement propagé par la plantation de boutures infectées.

Deux espèces de pucerons ont été identifiées sur canne à sucre à La Réunion : *Melanaphis sacchari* et *Rhopalosiphum maidis*. Seul *M. sacchari* était porteur du SCYLV. Deux mois après la plantation du cultivar sensible R575 indemne de SCYLV dans une zone infestée par le virus, 14% des plantes étaient infectées par le SCYLV. Quatre mois plus tard, ce taux était de 24% et aucune nouvelle infection n'a été détectée entre 6 et 12 mois. Il existerait donc à La Réunion une fenêtre réduite de contaminations primaires qui serait située entre 0 et 2 mois après la plantation des boutures au champ.

La variabilité génétique du SCYLV a été analysée avec 48 isolats viraux de La Réunion et 24 isolats originaires d'autres pays. Une partie de chacun des six. ORF (Open Reading Frames) du génome a été amplifiée, clonée puis séquencée. L'analyse phylogénétique des séquences obtenues a permis de montrer que les régions les plus variables du SCYLV sont l'ORF1 et l'ORF2 et que la région la plus conservée est l'ORF3. En se basant sur la variabilité de l'ensemble du génome, la grande majorité des isolats de la Réunion se différencie des isolats d'autres origines.

L. Rassaby

Maladies virales du vanillier

Depuis 1994, la survie de la culture de la vanille à La Réunion dépend de l'intensification de sa production sous ombrière. Il a été montré que ces conditions de culture améliorent la production d'un point de vue agronomique mais favorisent le développement de problèmes phytosanitaires comme les viroses tel que le Cymbidium virus (CyMV), un potexvirus.

Pour lutter contre ce virus, il a été choisi d'éliminer les plantes malades et de les remplacer par des boutures certifiées saines. Cela a nécessité la mise en place de mesures prophylactiques et de structures et méthodes adaptées à la multiplication de matériel sain. Dans ce schéma de certification de lianes indemnes de CyMV, les outils de diagnostic employés jusqu'alors, Elisa et Pcr ont été comparés à une autre technique sérologique : l'immuno-empreintes (IE).

Pour garantir à terme la diffusion de boutures indemnes des principaux virus et se doter de méthodes de diagnostics fiables, une étude de caractérisation des potexvirus infectant le vanillier à la Réunion a été entreprise. Les premiers travaux ont montré qu'il existe sur vanille à la Réunion une seule souche de CyMV homogène sur le plan sérologique, biologique et moléculaire (CyMV-R). En comparaison, la caractérisation moléculaire des isolats de CyMV collectés aux frontières a permis de définir les risques associés à l'introduction de matériel végétal contaminé sur l'île.

Cette caractérisation moléculaire sur des isolats d'orchidées thaïlandaises et sur des vanilliers polynésiens importés, met en évidence la présence d'au moins un groupe de CyMV différent de celui auquel appartient le CyMV-R.

F. Leclerq

Le tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) :

Evaluation du risque d'acquisition du TYLCV sur des fruits

En collaboration avec le service de la protection des végétaux d'Avignon et de la Réunion, un test d'évaluation du risque d'acquisition et d'inoculation du TYLCV par *Bemisia tabaci* à partir de fruits de tomate grappe a été réalisé. Un test préliminaire de cette expérimentation a prouvé la présence en quantité importante du virus dans le fruit d'où des risques potentiels d'introduction de souches de TYLCV voire d'autres bégomovirus via les échanges commerciaux de tomates.

Des tests d'acquisition du virus par des aleurodes non virulifères sur tomates grappes virosées, ont été réalisés et comparés à ceux sur plantes en végétation. Ils donnent des pourcentages d'acquisition de 10% et d'inoculation de 4%. Même si ces pourcentages sont nettement inférieurs à ceux réalisés à partir des parties végétatives, il y a un risque non négligeable de transmission du TYLCV par ce biais.

Importance des bégomovirus dans la zone Océan Indien :

Le TYLCV a été introduit à la Réunion en 1997, des symptômes de type TYLCV ont depuis été signalés à Mayotte (2000) mais l'espèce virale n'a pas encore été déterminée au niveau moléculaire. A Madagascar, la maladie des feuilles jaunes en cuillères est signalée depuis 1997 mais aucune information n'existe sur l'agent viral. Une enquête a été réalisée en collaboration avec les services officiels malgaches à Madagascar en avril - mai 2001 dans le but de prélever des échantillons de feuilles avec des symptômes de viroses (en Bos) et des adultes de *Bemisia tabaci* (dans de l'éthanol pur) dans différentes régions de l'île (Fig3). Ceci, afin de détecter la présence ou l'absence de bégomovirus et d'étudier la diversité de *B. tabaci* dans la zone du Sud ouest de l'océan Indien. Les sites de prélèvements ont été choisis pour quadriller l'île, dans la région des hauts plateaux (zone maraîchère par excellence) mais aussi dans les régions côtières. De l'Adn viral a été extrait de trois échantillons provenant de la côte ouest de Madagascar (Toliary et Morondava).

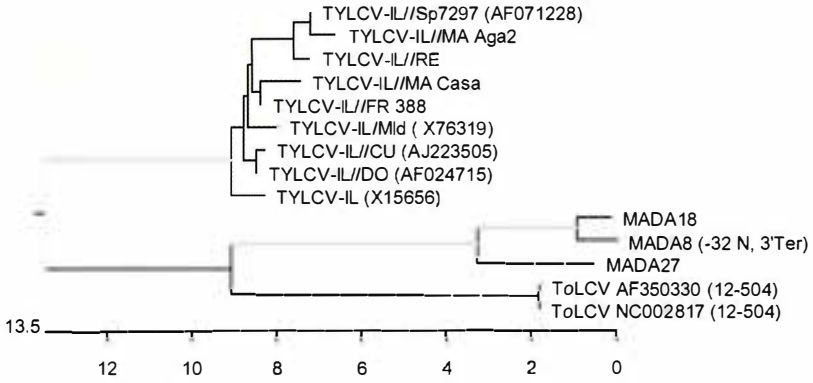


Fig 3 :
Arbre phylogénétique réalisé à partir de séquences de 500 pb de génome virale de différents isolats de TYLCV et de TbLCV incluant les échantillons de Madagascar.

Ces échantillons ont été amplifiés par des amorces dégénérées (MP16/MP82) supposées amplifier une partie de l'Adn A des bégomovirus sur un fragment de 500 paires de base.

La séquence amplifiée s'est révélée plus proche du *Tobacco leaf curl virus* du Zimbabwe (77%) que du TYLCV (73%) avec toutefois un pourcentage d'homologie inférieur à 80%, ce qui révèle la présence d'un nouveau bégomovirus sur la côte ouest de Madagascar.

Entre les trois souches, il y a un pourcentage d'hétérogénéité nucléotidique relativement élevé, allant de 94 à 98%. De plus amples analyses seront nécessaires afin d'avoir les séquences complètes des souches et de les caractériser.

B. Reynaud

L'aleurode vecteur du TYLCV : Bemisia tabaci (P. Ryckeweart)