

Photo 1 - "Exemple de quelques profils génétiques obtenus en Rep PCR pour les différentes espèces de *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre : *X. axonopodis* pv. *Vasculorum* (Xav), *X. albilineans* (Xa), *X. vasicola* pv. *Holcicola* (Xvh), *X. sacchari* (Xs) et *Xanthomonas* sp. (Xsp)". (Photo L. Costet)

Epidémiologie des maladies bactériennes et virales

Diversité génétique et variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre

L'étude de la diversité génétique et de la variabilité du pouvoir pathogène des *Xanthomonas* pathogènes de la canne à sucre a été poursuivie en 2003. Plusieurs espèces de *Xanthomonas* s'attaquent à la canne à sucre. Ce sont des maladies latentes qui peuvent causer des dégâts importants sur la culture. Les seuls moyens de lutte contre ces agents pathogènes sont des moyens préventifs et impliquent l'utilisation de variétés résistantes. Une bonne connaissance de la diversité, et de la variabilité du pouvoir pathogène de ces bactéries est donc nécessaire. Environ 130 souches de *X. axonopodis* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *vasculorum*, *X. vasicola* pv. *holcicola*, *X. sacchari* et *Xanthomonas* sp. ont été caractérisées d'un point de vue biochimique. Des analyses factorielles des correspondances (AFC) ont permis d'identifier des regroupements de souches en fonction des espèces bactériennes. Certains groupes sont cependant très proches les uns des autres et forment un continuum de souches. Ces mêmes souches qui avaient été génotypées par RFLP (sondes avr et hrp) en 2002 ont également été génotypées cette année par BOX, ERIC et REP-PCR (photo 1). Plusieurs haplotypes ont été identifiés au sein de certaines espèces. Pour chaque méthode moléculaire employée la distribution des souches des différentes espèces bactériennes est similaire :

- deux groupes de *X. axonopodis* pv. *vasculorum* distincts (un groupe contenant quatre souches originaires de Maurice et isolées de *Thysanolaena maxima* ; l'autre groupe comprenant une cinquantaine de souches originaires des Mascareignes et deux d'Australie, et isolées de canne à sucre, de *Thysanolaena maxima* et de *Roystonea regia*).

- un groupe formé des souches de *Xanthomonas* sp. causant la fausse striure rouge de la canne à sucre au Brésil.

- un grand groupe constitué de plusieurs sous-groupes comprenant chacun soit des souches de *X. vasicola* pv. *vasculorum*, soit des souches de *X. vasicola* pv. *holcicola* originaires d'Afrique de l'Est, de Nouvelle Zélande et des Mascareignes, et isolées de *Roystonea regia* et de diverses graminées (canne à sucre, maïs,...).

Un essai en champ a été mis en place pour l'étude du pouvoir pathogène du *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, agent causal de la gommose. On retiendra que certaines variétés (M134/32, M147/44, M377/56 et S17) ont été très sensibles à l'infection et sont mortes dans le mois qui a suivi l'inoculation. En revanche, les variétés B34104, B37172, R570 et R573 ont présenté un taux de mortalité de tiges après inoculation beaucoup plus faible.

L. Costet



Photo 2 - Symptômes de la maladie des taches noires du manguier sur les fruits. (Photo L. Gagnevin)

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

L'étude de l'efficacité et de la durabilité de la résistance partielle à la maladie des taches noires présente dans un cultivar sud-africain (Heidi) a été poursuivie. L'efficacité de la résistance est évaluée sous un angle épidémiologique en comparant les cinétiques de progression de la maladie dans le temps et dans l'espace pour un cultivar sensible (Haden) de référence et le cultivar partiellement résistant. La durabilité de la résistance est évaluée sous un angle populationnel en comparant les "empreintes génétiques" des populations bactériennes associées aux épidémies se développant sur les 2 cultivars et en

évaluant leur agressivité sur ces deux cultivars. Deux vergers expérimentaux (une parcelle plantée à l'aide du cultivar Heidi, et une parcelle plantée à l'aide du cultivar Haden, très sensible) avaient été installés en décembre 2001. L'incidence de la sévérité de la maladie dans les deux vergers a été estimée régulièrement au cours du temps (photo 2). L'incidence est le pourcentage d'arbres atteints, tandis que la sévérité est un indicateur de la quantité de symptômes présents sur les arbres. Les résultats des années antérieures (1998-2001) ont mis en évidence un effet négatif de la résistance partielle sur le

développement des épidémies dans le temps et dans l'espace. La maladie est apparue dans les deux vergers quelques semaines après le passage du cyclone Dina et elle s'est généralisée dans les deux vergers expérimentaux au cours de l'année 2002. Fin 2003, chacun des deux vergers expérimentaux comptait environ 100% d'arbres malades, mais la sévérité de la maladie était beaucoup plus importante sur le cultivar sensible (figure 1). Une modélisation de la progression temporelle de l'incidence de la maladie a été effectuée par régression non linéaire. Le modèle de Gompertz s'est montré le plus pertinent, ce qui confirme les analyses épidémiologiques menées sur la période 1998-2001. Les taux d'accroissement de maladie (k) mesurés respectivement sur le cultivar sensible et partiellement résistant n'étaient pas significativement différents, ce qui est également en accord avec nos résultats antérieurs. Par rapport à ces résultats obtenus précédemment, nous avons mis en évidence une progression plus rapide de la maladie. Il est probable que la progression plus rapide de la maladie soit associée à un apport plus massif et plus efficace (blessures foliaires) d'inoculum lié au cyclone Dina (vitesses de vent maxima instantanés de 50 ms⁻¹), alors que l'événement climatique ayant permis le démarrage de l'épidémie (dépression Davina) précédemment étudiée avait généré des conditions moins favorables. La comparaison des deux paramètres du modèle de Gompertz, k et xi, obtenus pour le cultivar sensible et partiellement résistant, n'était pas statistiquement différente. Ceci indique que l'analyse de l'efficacité de sources de résistance partielle à la maladie des taches noires du manguié doit être principalement basée sur des mesures de sévérité de maladie, et non pas sur des données d'incidence.

La répartition spatiale de la maladie, étudiée par la technique des autocorrélations spatiales, était aléatoire au cours des mois qui ont suivi les premières infections, situation caractéristique des apports exogènes d'inoculum associés à une dépression cyclonique. Des premiers signes d'agrégation ont été détectés fin 2002 sur le cultivar sensible, se sont maintenus pour toutes les observations menées en 2003, où l'on a observé une légère augmentation de la taille des agrégats. Sur le cultivar partiellement résistant, les premiers signes d'agrégation ont été détectés fin 2003.

De nouvelles analyses de la diversité des souches prélevées sur deux parcelles (cvs. Haden et Heidi) depuis leur plantation en 1998 ont confirmé que les populations de bactéries subissent une forte dérive

génétique mais cette dérive semble compensée par une diversification probablement due à des mutations ou des réorganisations génomiques. Aucun flux de génotypes (arrivée de souches exogènes) ne peut être mis en évidence, ce qui est corrélé au fait qu'il n'y a pas eu d'événements de dissémination majeurs sur la période étudiée. Les tests de pouvoir pathogènes concernant des souches provenant des deux parcelles et inoculées sur les deux cultivars montrent, contrairement aux résultats préliminaires de 2002, qu'il n'y a pas de spécialisation du pouvoir pathogène sur l'hôte d'origine, c'est-à-dire que la variété partiellement résistante n'exerce pas de sélection pour le pouvoir pathogène qui pourrait aboutir à l'émergence de nouvelles populations plus agressives sur ce cultivar. Bien que cette étude n'ait pu être conduite que sur une période de trois ans, elle suggère que la résistance partielle portée par le cultivar Heidi est durable.

Par ailleurs, *Xanthomonas* sp. pv. *mangiferaeindicae* a servi de modèle pour l'évaluation de techniques de typage haut débit pour répondre à des problématiques d'épidémiologie bactérienne. La LMPCR (ligation-mediated polymerase chain reaction) permet de mesurer la diversité d'éléments insertionnels et de sites de restriction, tandis que l'AFLP (amplified fragments lengths polymorphism) ne concerne que les sites de restriction. Les deux techniques ont l'avantage de couvrir l'ensemble du génome et d'être automatisables, ce qui permet de traiter un grand nombre d'échantillons et d'augmenter la fiabilité des résultats (photo 3).

Les premiers tests effectués sur une collection de souches déjà typées par d'autres moyens (RFLP) ont montré que cette approche est robuste, discriminante, très informative et qu'elle donne des résultats bien corrélés avec la structure déjà connue des populations (figure 2). Par LMPCR, nous avons pu quantifier la stabilité in vitro et in planta de l'IS1595 dans les génomes. Les résultats de ce travail indiquent une grande stabilité (demi-vie de plusieurs années) de cet élément dans les génomes. Cette stabilité est suffisamment importante pour justifier l'utilisation de l'IS1595 en tant qu'outil d'épidémiologie-surveillance. Cette très grande stabilité pourrait néanmoins avoir comme conséquence négative une surestimation des relations épidémiologiques entre isolats, et indique donc que les données de génotypage, lorsqu'elles sont utilisées à des fins de recherche d'inoculum primaire, doivent être consolidées avec des données épidémiologiques conventionnelles (position GPS des foyers de maladie et données météorologiques).

O. Pruvost, L. Gagnevin

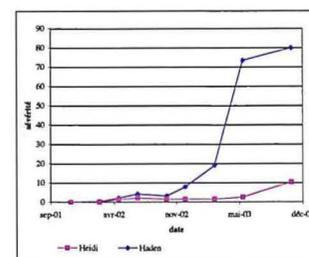


Figure 1 - "Evolution temporelle de la sévérité de la maladie des taches noires du manguié dans deux vergers expérimentaux plantés respectivement à l'aide d'un cultivar sensible (Haden) et partiellement résistant (Heidi) fin 2001".



Photo 3 - Système d'électrophorèse capillaire ABI PRISM 3100 permettant l'analyse automatisée de la diversité génétique par AFLP ou par LMPCR. (Photo L. Gagnevin)

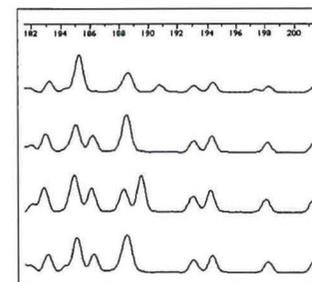


Figure 2 - Exemple de données collectées après électrophorèse capillaire pour 4 souches de *Xanthomonas* pv. *mangiferaeindicae* par LMPCR (détail). Chaque pic correspond à un fragment d'ADN, les variations de pics entre souches reflètent des variations de leurs génomes.



Photo 4 - Dépérissement bactérien de l'anthurium.
(Photo L. Gagnevin)

Dépérissement bactérien de l'Anthurium (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)

Les travaux de recherche visant à améliorer la lutte contre le dépérissement de l'anthurium se sont poursuivis en suivant les axes définis initialement (photo 4). Le test de détection par PCR gigogne mis au point précédemment a été modifié de façon à permettre la détection de l'agent pathogène responsable (*Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*) à partir d'échantillons végétaux bruts, en éliminant les risques d'inhibition causée par les extraits végétaux à l'aide de tampons spécifiques. Par ailleurs, un milieu de culture spécifique de *X. a. pv. dieffenbachiae* a été mis au point qui permet la croissance sélective de la bactérie recherchée en limitant celle des autres bactéries présentes dans les échantillons. Cette étape d'enrichissement avant la PCR doit permettre d'augmenter le seuil de détection de la technique et de traiter les échantillons à tester par lots.

Afin de pouvoir effectuer un suivi au cours du temps de l'inoculum dans différents réservoirs, la technique de PCR quantitative en temps réel a été choisie pour quantifier *X. a. pv. dieffenbachiae*. Cette technique est développée à partir des cibles ADN déjà mises au point. Les premiers résultats ont montré une grande spécificité de la méthode car seules les souches de *X. a. pv. dieffenbachiae* ont pu être détectées. De plus, des expériences de dilution ont montré un seuil de détection de 102 bactéries/ml. Cependant, des

expériences de détection *in planta* ont mis à jour une baisse de sensibilité de la méthode due à l'augmentation du bruit de fond qui devra être éliminé.

L'état viable non cultivable (VNC) est un état physiologique des populations bactériennes au cours duquel elles ne sont plus détectables par les méthodes classiques (culture). Afin de déterminer si la bactérie peut être présente dans des échantillons ou dans des réservoirs d'inoculum à l'état VNC et si elle est alors détectable par PCR, des travaux ont été effectués pour déclencher le passage à cet état en conditions artificielles. Une carence nutritive et un abaissement de pH en présence de cuivre dans le milieu de culture provoquent cet état mais les bactéries restent détectables par PCR.

Afin de pouvoir suivre la bactérie en conditions expérimentales et évaluer l'importance relative des différentes étapes de son cycle biologique et épidémiologique, une construction plasmidique permettant à *X. a. pv. dieffenbachiae* de produire une protéine fluorescente (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) est introduite dans une souche. Ceci permet de suivre la bactérie par microscopie à fluorescence d'une part au sein des communautés bactériennes dans lesquelles elle vit (dans les sols, eaux, à la surface des plantes...) mais aussi dans les tissus végétaux au cours de la pathogénèse.

P. Laurent, E. Jouen, L. Gagnevin

Détection et biologie de *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, responsable du dépérissement des Alliées



Photo 5 - Parcelle expérimentale d'étude épidémiologique du dépérissement bactérien de l'oignon de second cycle.
(Photo L. Humeau)

Une des contraintes sanitaires majeures de la filière alliacée est le dépérissement bactérien de l'oignon, causé par *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. Cette maladie a été observée pour la première fois en 1971 à Barbade puis est apparue par vagues successives sur pratiquement tous les continents, lui conférant le statut de maladie émergente. En 2003, les travaux de recherche se sont concrétisés par la soutenance de thèse de P. Roumagnac à l'INA-PG intitulée "Taxonomie et diversité du *Xanthomonas* responsable du dépérissement bactérien de l'oignon. Étude épidémiologique du rôle des semences dans la transmission de la bactérie".

La caractérisation polyphasique des souches bactériennes mondiales prélevées sur oignons montre qu'elles appartiennent toutes à une même espèce qui a été nommée *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*. L'étude de diversité génétique distingue des zones

géographiques à forte diversité (ex. USA, Afrique du Sud) et des zones à faible diversité (ex. Venezuela, Hawaii, Barbade). Dans la région Océan Indien, la diversité est actuellement en cours d'analyse sur une collection de grande taille. Les semences naturellement contaminées sont capables de déclencher des épidémies dans les parcelles expérimentales (photo 5). Les facteurs climatiques tels la pluie et le vent peuvent influencer la distribution et l'évolution de la maladie en disséminant la bactérie. De même, l'irrigation par aspersion favorise l'apparition de foyers d'infection secondaires dans les cultures.

La transmission de la maladie par les semences d'oignon est donc un facteur identifié qui pourrait expliquer l'émergence concomitante d'épidémies sur plusieurs continents, en relation avec des flux commerciaux de lots de semences contaminées par *X. a. pv. allii*.

suite à ce doctorat et dans la continuité du programme initialement établi, les recherches se sont orientées en 2003 selon plusieurs points, (1) étude de l'impact épidémiologique selon le taux de contamination initial des semences, (2) analyse épidémiologique du pathosystème sur oignon de second cycle et transmission de la bactérie aux semences produites, et (3) détection par PCR de la bactérie dans les semences d'oignon.

Les analyses spatio-temporelles montrent une incidence de maladie variant de 5 % dans les parcelles d'oignons de second cycle à 15 % pour les parcelles quadratisées de premier cycle, malgré des conditions climatiques peu favorables au développement d'épidémie. Tous les foyers de maladie sont de type agrégé, autour des semis initialement malades dans les parcelles de premier cycle et autour des plants inoculés pour les parcelles d'oignons de second cycle (photo 6). Les semences récoltées dans les parcelles expérimentales sont en cours d'analyse sur milieu semi-sélectif et par PCR gigogne. Des populations bactériennes ont été collectées dans les parcelles expérimentales et seront analysées en 2004 par AFLP (amplified fragment length polymorphism) pour évaluer l'importance biologique d'un inoculum exogène dans les épidémies analysées.

La mise au point d'un test PCR pour la détection de *X. a. pv. allii* a été poursuivie. Une séquence d'ADN caractérisée précédemment par RAPD-PCR a été clonée et séquencée. Des amorces "PCR spécifique" ont été désignées d'après la séquence nucléotidique. 90 % souches de *X. a. pv. allii* répondent au test PCR notamment toutes les souches isolées au niveau des Mascareignes. Le test PCR est d'une grande spécificité puisqu'aucune souche différente de *X. a. pv. allii* (autres *Xanthomonas* et genres bactériens ainsi que

différentes souches bactériennes isolées de l'oignon mais non pathogènes sur ce végétal) ne répond au test, excepté des souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, taxonomiquement très proche de *X. a. pv. allii*. Il existe néanmoins une "signature" *vesicatoria* qui rend possible la distinction des deux types de souches par restriction des produits d'amplification. Un protocole de PCR gigogne a été développé pour augmenter la sensibilité de la détection. Elle comprend une seconde étape d'amplification en utilisant un couple d'amorces plus interne dans le fragment d'ADN. Elle permet pour l'instant une détection de l'ordre de 10^4 bactéries par ml. Ce seuil de détection peut encore être abaissé en améliorant les conditions d'amplification. Nous avons adapté le test à la détection directe sur macérat de semences (sans phase d'extraction d'ADN). Des essais préliminaires avaient en effet montré l'inhibition de la PCR par des substances végétales contenues dans les macérats de semences. La levée de cette inhibition a pu être obtenue par l'utilisation d'un tampon à base de PVP neutralisateur de ces substances. Il reste néanmoins à évaluer l'effet des traitements couramment appliqués sur les semences (ex. Thirame) susceptibles d'exercer également un effet inhibiteur sur la PCR.

Cet outil moléculaire permet de répondre à la demande locale de certification, puisqu'il fonctionne sur l'ensemble des souches isolées des Mascareignes. En vue de son utilisation dans les échanges internationaux de semences, l'évolution de l'outil en un système d'amplification par PCR dit "Multiplex", dans lequel on utilise plusieurs couples d'amorces, est en cours pour détecter les différents types de souches de *X. a. pv. allii* présents au niveau mondial.

L. Humeau, P. Roumagnac, I. Soustrade, O. Pruvost

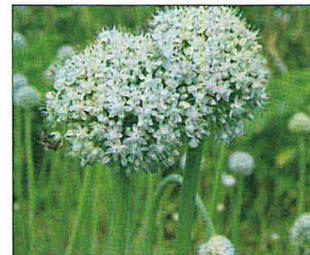


Photo 6 - Pollinisation des inflorescences d'oignon (variété Véronique; Réunion) de second cycle par les abeilles.
(Photo L. Humeau)

Flétrissement bactérien des solanacées (*Ralstonia solanacearum*)

L'essentiel de l'activité de recherche a porté sur l'étude de la diversité de *Ralstonia solanacearum* en fonction de l'hôte d'origine. Une expérimentation a été mise en place pour parvenir à démontrer que l'hôte était effectivement un moteur de diversité : une population de race 1, biovar 1, caractérisée par un échantillon de 40 isolats a été inoculée à 4 hôtes différents (aubergine, poivron, tomate cvs Roma et Calinago) et les populations réisolées des plants flétris sont réinoculées aux mêmes hôtes. À l'issue de 5 cycles successifs d'inoculation, un échantillon d'isolats a été extrait des plants flétris et conservés pour une analyse ultérieure. Dans une première étape, 379 isolats incluant les 40 isolats de la population ini-

tiale ont été caractérisés au niveau de leur profil métabolique (méthode Biolog) et le traitement des données au travers d'une classification (C.A.H.) montre une large diversité (12 groupes) et la présence de nombreux isolats d'aubergine dans des groupes écartés et ne comprenant aucun isolat initial. Ces isolats écartés se distinguent des isolats initiaux par une capacité différente d'utilisation de 28 substrats carbonés.

Une sélection de 32 isolats faite sur la base des groupes précédemment identifiés, a été inoculée selon la méthode de trempage du système racinaire sur les 4 hôtes utilisés pour les cinq cycles d'inoculation. Le taux de flétrissement à 30 jours ainsi que la

fréquence de présence d'une population significative dans la tige moyenne des plants non flétris ont permis de dresser une classification générant 9 groupes parmi lesquels 4 isolats d'aubergine et 1 isolat de poivron se retrouvent significativement écartés des isolats initiaux. Ce ne sont pas les mêmes isolats que ceux concernés par les profils métaboliques.

La dernière étape a été d'apprécier la diversité génomique de 125 isolats incluant les 40 initiaux, au travers de profils AFLP. L'analyse des données recueillies et la classification des isolats a permis de montrer une très large diversité génomique qui

concerne à la fois les isolats initiaux et ceux issus des 5 cycles d'inoculation. La différence de fréquence des isolats initiaux ou finaux dans les groupes générés par la classification suggère un processus de diversification par sélection à partir de l'inoculum initial.

L'ensemble de ces résultats portant à la fois sur les capacités métaboliques, sur le pouvoir pathogène et les séquences nucléotidiques des isolats issus de 5 cycles d'inoculation sur les mêmes hôtes, semble indiquer que l'hôte est un des moteurs de diversification au sein des populations de *Ralstonia solanacearum*.

M. Elbaz, J. Luisetti



Photo 7 - Symptômes d'enroulement foliaire observés sur des plants de tomate à Mayotte en 2003. Ces échantillons ont permis d'identifier une nouvelle espèce de bégomovirus appelé provisoirement Tomato leaf curl Mayotte virus. (Photo A. L. Abdoul-Karime. SPV Mayotte)

Caractérisation moléculaire des bégomovirus des cultures maraîchères dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien

Depuis l'introduction du TYLCV à la Réunion en 1997, une campagne de surveillance et d'étude de la diversité des bégomovirus sur les cultures maraîchères dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien a été mise en place. Ce projet se déroule en partenariat avec les services officiels de la protection des végétaux et dans le cadre du Programme Régional de Protection des Végétaux.

La première partie de l'année 2003 a été principalement consacrée au clonage et à l'obtention d'un clone agroinfectieux de l'isolat réunionnais du TYLCV. Ce clonage nous a permis de séquencer l'ensemble du génome du TYLCV-[RE] et de déterminer ses liens phylogénétiques avec les autres isolats du TYLCV. Le clone agroinfectieux du TYLCV-[RE] nous permet à présent de l'utiliser pour cribler la résistance variétale de la tomate au virus *sensu stricto*.

En 2001, à Madagascar, des symptômes de maladie à bégomovirus ont été identifiés sur des cultures de tomate et des prélèvements foliaires ont été effectués. Des symptômes similaires ont aussi été observés en 2003 à Mayotte sur des cultures de tomate et aux Seychelles sur plusieurs cultures maraîchères (photo 7). Nos données de séquences partielles du corps de la protéine de capsid des isolats mal-

gaches, mahorais et seychellois, ont permis de proposer une classification taxonomique provisoire de nos échantillons. Nos résultats suggèrent la présence de deux nouveaux bégomovirus du Sud-Ouest de l'Océan Indien : le Tomato leaf curl Madagascar virus (isolats Toliary et Morondava) et le Tomato leaf curl Mayotte virus (isolats Dembeni, Combani et Kahani de Mayotte et trois isolats Seychellois). Les relations phylogénétiques avec les autres bégomovirus montrent que ces deux virus appartiennent au groupe africain des bégomovirus monopartites et qu'ils sont génétiquement proches des bégomovirus africains du manioc (ACMV, EACMV et SACMV). Le clonage, le séquençage et l'obtention de clones agroinfectieux des deux isolats de Madagascar et de l'isolat Dembeni de Mayotte ont permis de réaliser une classification définitive de ces deux nouvelles espèces de bégomovirus du Sud-Ouest de l'Océan Indien (figure 3). Les relations phylogénétiques avec les autres bégomovirus montrent qu'au contraire du TYLCV qui a été introduit à la Réunion, ces deux nouvelles espèces sont plus proches l'une de l'autre que des autres bégomovirus et qu'elles appartiennent au groupe africain des bégomovirus.

H. Delatte, J.M. Lett

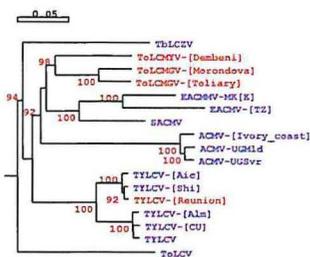


Figure 3 - Arbre phylogénétique réalisé à partir de l'alignement des séquences nucléotidiques complètes des génomes comprend l'isolat réunionnais du TYLCV, les isolats Morondava et Toliary du nouveau bégomovirus de Madagascar (ToLCMGV) et l'isolat Dembeni du nouveau bégomovirus de Mayotte (ToLCMYV).

Transfert de connaissances vers les professionnels du secteur agricole

Appuis en phytopathologie à la profession cannière

Comme chaque année, des expérimentations réalisées en conditions d'inoculation artificielle ont été réalisées afin de vérifier que les variétés obtenues par le CERF présentent un niveau suffisant de résis-

tance aux principales maladies présentes à la Réunion. Une trentaine de variétés prometteuses du CERF ont subi les tests de criblage pour la résistance à l'échaudure des feuilles et à la gommose. L'essai d'évaluation du comportement des variétés vis-à-vis de l'échaudure des feuilles s'est déroulé

dans des conditions assez particulières en 2003, puisque très peu de symptômes de la maladie sont apparus au cours de l'expérimentation. En revanche, l'agent responsable de la maladie, *X. albilineans*, a été détecté dans les tiges. Le taux de colonisation des entre-nœuds, déterminé par empreintes sur milieu sélectif (WSD), a permis de différencier les variétés et de leur attribuer un niveau de résistance à l'échaudure des feuilles par comparaison aux variétés témoins incluses dans l'essai. L'essai d'évaluation du comportement des variétés du CERF vis-à-vis de la gommose s'est, quant à lui, déroulé dans des conditions assez favorables. Finalement, ces essais ont permis de distinguer des grandes classes de comportement des variétés testées vis-à-vis de ces deux maladies. Parmi les nouvelles variétés, dix présentent une sensibilité marquée à au moins une des deux maladies. Sept autres variétés sont, dans les conditions de l'essai, tolérantes aux deux maladies.

Un autre aspect de l'appui à la profession concerne la veille phytosanitaire dont l'objectif est d'identifier et de caractériser les différents phénomènes pathologiques apparaissant sur la sole cannière réunionnaise. Aucun phénomène pathologique nouveau n'a été signalé récemment à la Réunion. On signalera cependant, suite à l'abondance des précipitations en avril-mai 2003, une épidémie de la maladie dite des taches jaunes (ou "yellow spot") sur toutes les variétés cultivées, notamment R570 et R579, et surtout dans les hauts de l'Est (Grand Etang, Salazie,...). (Photo 8). Par ailleurs, lors d'une des inspections de la quarantaine canne à sucre, les détections immunologiques et moléculaires ont révélé la présence du SCYLV, agent responsable du syndrome de la feuille jaune de la canne à sucre sur des cannes en provenance de Maurice. Le SCYLV peut avoir un impact économique sur la culture. Bien que ce virus soit présent à La Réunion, il est préférable de ne pas introduire de nouvelles souches virales sur l'île. En conséquence, il a été conseillé d'assainir ces quatre variétés par culture de méristème avant de subir un nouveau cycle de quarantaine.

L. Costet

Validation et transfert d'outils de détection du Tomato Yellow Leaf Curl Virus

Ce sujet a été mené en collaboration avec le SPV et la FDGDON. Il s'agissait de comparer plusieurs méthodes de détection du virus : ELISA, Tissu Print Hybridization, dot blot (photo 9) et PCR dans deux situations :

(i) l'évaluation du risque d'entrée du TYLCV et d'autres bégomovirus via des lots d'importation de tomates.

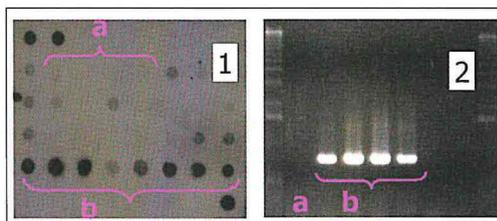


Photo 9 - Détection du TYLCV : Réponses obtenues avec les méthodes Dot-Blot (1) et PCR (2). Aucun signal pour des tomates saines (a). Un signal positif pour des tomates infectées par le TYLCV (b). (Photo I. Soustrade)

(ii) l'inventaire des adventices potentiellement réservoirs du TYLCV à la Réunion.

Les hybridations ont été réalisées avec une sonde du TYLCV Réunion élaborée au 3P, couvrant la totalité du génome viral. Les PCR ont été réalisées à l'aide d'une paire d'amorces dégénérées amplifiant le genre bégomovirus ainsi qu'une paire d'amorces plus restreinte aux isolats de TYLCV.

Dans les deux études, les méthodes ELISA et PCR se sont montrées les méthodes les plus fiables et adaptées à la recherche de bégomovirus dans les tissus végétaux, la PCR étant la plus sensible.

Dans la première étude, le TYLCV et autres bégomovirus ont été recherchés au sein de 7 lots de tomate d'importation. Trois lots se sont avérés contaminés (54% à 77% des fruits testés). Deux types de bégomovirus ont été rencontrés : le premier présente une très grande homologie de séquence avec le TYLCV. Le second est très proche d'un géminivirus partiellement décrit sur tomate au Sénégal. Ces résultats montrent qu'il ne faut pas négliger la possibilité d'introduction de nouveaux bégomovirus par cette voie, d'autant plus que la transmission du TYLCV du fruit à des plants de tomate via *Bemisia tabaci* a déjà expérimentalement démontrée. Ces résultats fournissent des éléments concrets aux dossiers d'analyse de risque d'introduction de bégomovirus.

Dans la deuxième étude, TYLCV et autres bégomovirus ont été recherchés sur 258 spécimens appartenant à 37 espèces d'adventices et représentant 19 familles botaniques. Les adventices ont été collectés sur des parcelles de tomate ou de haricots montrant des symptômes de TYLCV. Le TYLCV Réunion (confirmé par comparaison de séquences) a été détecté principalement dans 6 familles d'adventices, dont 3 qui n'ont jamais été décrites comme hôtes du TYLCV ou d'autres bégomovirus (*Amaranthaceae*, *Commelinaceae* et *Convolvulaceae*). (Photo 10). Ces résultats, intéressants en terme d'aide à la lutte contre le TYLCV, doivent être confirmés par des tests de transmission par *Bemisia tabaci*.

I. Soustrade



Photo 8 - Symptômes de la maladie des taches jaunes (ou "yellow spot") causée par le champignon *Mycovelosiella koepkei* (W. Krüger). (Photo L. Costet)



Photo 10 - *Amaranthus viridis* L. : une adventice abondante en culture maraîchère détectée positive pour le TYLCV (Photo Thomas Le Bourgeois).

Mise au point et transfert d'une technique d'enrichissement visant à améliorer la sensibilité de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

Les travaux, menés en partenariat avec l'ARMEFLHOR et le Service de Protection des Végétaux, ont consisté en la mise en place d'une technique de Bio-PCR basée sur l'amplification biologique du pathogène avant sa détection moléculaire. Un bouillon semi sélectif contenant 4 antibiotiques et un fongicide a été mis au point permettant l'inhibition de la croissance de plus de 86% des bactéries sapro-

phytes retrouvées sur *Anthurium*. Le taux de croissance de la bactérie à 28°C sur ce milieu a été déterminé afin de connaître la durée d'incubation théorique nécessaire pour obtenir une population détectable par PCR à partir d'une seule cellule. Des comptages bactériens et des tests PCR ont permis de valider cette technique comme permettant de garantir l'absence du pathogène dans l'échantillon testé. Un plan d'échantillonnage a été mis sur pied afin de déterminer le nombre de feuilles à prélever dans le cadre du suivi de lots d'*Anthurium* soumis à quarantaine. Cette technique a été transférée au Service de Protection des Végétaux et a été utilisée dans le cadre de la sortie de quarantaine d'un lot de 5000 plantes.

P. Laurent

Dynamique des populations et comportement des ravageurs et de leurs auxiliaires

L'aleurode *Bemisia tabaci*, vecteur de bégomovirus

Figure 4 : Répartition des biotypes B et Ms en fonction de leurs allèles, le biotype B est en 1 et le biotype Ms en 2. (B. Reynaud).

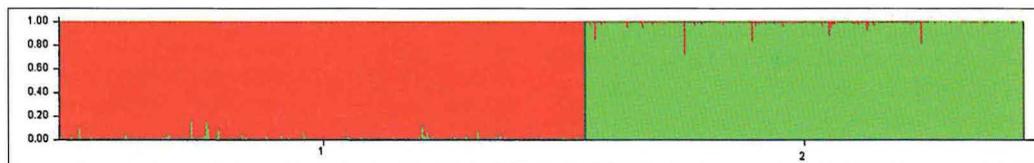
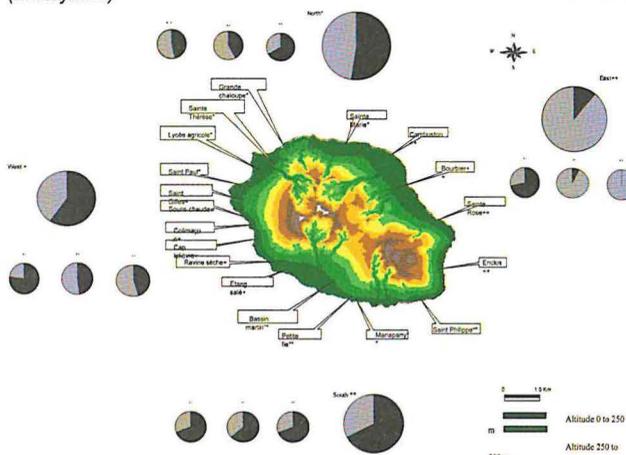


Figure 5 - Répartition géographique des biotypes B et MS à La Réunion. (B. Reynaud)



Variabilité moléculaire

L'aleurode *B. tabaci* est l'un des ravageurs des cultures les plus préoccupants, principalement par ses capacités à transmettre plus de 100 espèces de bégomovirus. Suite à la pullulation de *B. tabaci* à La Réunion à partir de 1997, nous avons confirmé en 2000 l'introduction accidentelle du biotype B et son installation. Deux biotypes de *B. tabaci* sont maintenant présents à La Réunion : le biotype MS, indigène de la zone des Mascareignes, et le biotype B, cosmopolite et généralement invasif. Cette colonisation de nouvelles zones géographiques par le biotype B conduit selon les cas à une élimination du biotype indigène (biotype A aux USA) ou à une cohabitation (bio-

type Q en Espagne). Nous avons donc amorcé dès 2001 une étude des populations de *B. tabaci* en réalisant tous les 6 mois des prélèvements sur une trentaine de sites sur le pourtour de l'île et sur différentes plantes hôtes, lors des périodes de pullulation (février/mars et Octobre/novembre). Les insectes collectés en 2001 et en 2002 ont été analysés fin 2002 grâce à des marqueurs microsatellites. Le traitement des résultats a été optimisé en 2003 par l'utilisation du logiciel de Pritchard ("Structure") qui nous a permis de reclasser les individus analysés entre B et Ms (figure 4). Afin de vérifier les résultats de groupement obtenus à l'aide du logiciel, le gène de la cytochrome oxydase I de 5 insectes Ms et de 5 insectes B pris au hasard parmi les groupes donnés par "Structure" a été séquencé. Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences de référence des biotypes B et MS et le classement de individus par le logiciel "Structure" en B ou Ms a ainsi été validé.

A partir de ce nouveau classement, une carte de la répartition effective des biotypes B et Ms sur l'île de La Réunion a pu être dressée (figure 5). On remarque que la majorité des insectes du biotype B se trouve dans la