ÉPIDÉMIOLOGIE DES MALADIES BACTÉRIENNES ET VIRALES

Photo 1.
Dépérissement bactérien de l'oignon (lésion sur feuilles et hampe florale) (L. Humeau).

Maladie des taches noires du manguier

La maladie des taches noires est l'une des menaces majeures du manguier dans la zone océan Indien. Ce constat repose largement sur le fait que (1) la lutte chimique est peu efficace contre la bactérie responsable *Xanthomonas* sp. pv. *mangiferaeindicae* (et contre les bactéries phytopathogènes de façon générale) et (2) que la résistance variétale est peu exploitée dans les schémas de lutte intégrée mis en place dans les pays touchés. L'objectif de notre travail est donc d'évaluer l'intérêt d'une nouvelle source de résistance partielle présente dans le cultivar sud-africain Heidi sélectionné au début des années 1990. Nous avons effectué en 2004 les dernières notations de maladie sur feuilles visant à mesurer l'efficacité de la résistance partielle de ce cultivar à la maladie des taches noires du manguier.
Les résultats de l'analyse statistique complète des données acquises depuis 1999 confirment les tendances précédemment décrites :

- Le pourcentage d'arbres malades (incidence) n'est pas un bon descripteur pour identifier des variétés de manguier partiellement résistantes. La sévérité de la maladie est beaucoup plus appropriée ; elle a permis de différencier statistiquement le cultivar partiellement résistant (Heidi) du cultivar sensible témoin (Haden).

- La répartition spatiale de la maladie en vergers évolue différemment sur des cultivars sensibles et partiellement résistants. Dans un verger sensible, la maladie progresse efficacement à partir des foyers primaires, ce qui se traduit par une agrégation précoce de la maladie, et une taille des agrégats qui tend à augmenter au cours du temps. Sur le cultivar partiellement résistant, aucune agrégation durable au cours du temps n'est détectée. Ceci s'explique probablement par la mise en place chez le cultivar résistant de mécanismes de défense qui se traduisent une dizaine de jours après l'infection par une mortalité de 90 à 99 % des cellules bactériennes présentes au niveau des symptômes foliaires. Sur un cultivar sensible, une telle mortalité n'est pas constatée.

- Cette limitation des niveaux de populations bactériennes dans la variété résistante a un impact net sur les pertes en fruits dues à la maladie. Selon les années et parcelles, les pertes sur le cultivar sensible de référence ont varié de 32 à 84 % ; elles ont été de 0,5 à 4 % sur la variété Heidi.

Les analyses génétiques des populations bactériennes présentes sur cultivars sensibles et partiellement confirment la durabilité de la résistance. La variété Heidi a donc un potentiel intéressant à la Réunion pour complémenter l'offre variétale sur le marché local. Des contacts pris avec les opérateurs de Rungis indiquent qu'elle a également un potentiel pour la relance de l'exportation. Sur la base de nos résultats expérimentaux, une présentation de cette nouvelle variété avait été faite il y a deux ans aux techniciens de la Chambre d'Agriculture et aux arboriculteurs intéressés. Cette initiative s'est récemment concrétisée par une demande auprès de l'organisme obtenteur en Afrique du Sud d'exploitation commerciale de cette nouvelle variété à la Réunion.

Les travaux de recherche menés en 2005 et 2006 viseront à finaliser les travaux prévus dans le cadre de la convention pluriannuelle 2000-2006, à savoir principalement (1) la compréhension de la nature de populations asymptomatiques et de l'importance biologique d'un état non cultivable de la bactérie responsable de la maladie des taches noires du manguier, (2) la validation de la méthode IS-LM-PCR en tant qu'outil de typage épidémiologique.

O. Pruvost, L. Gagnevin

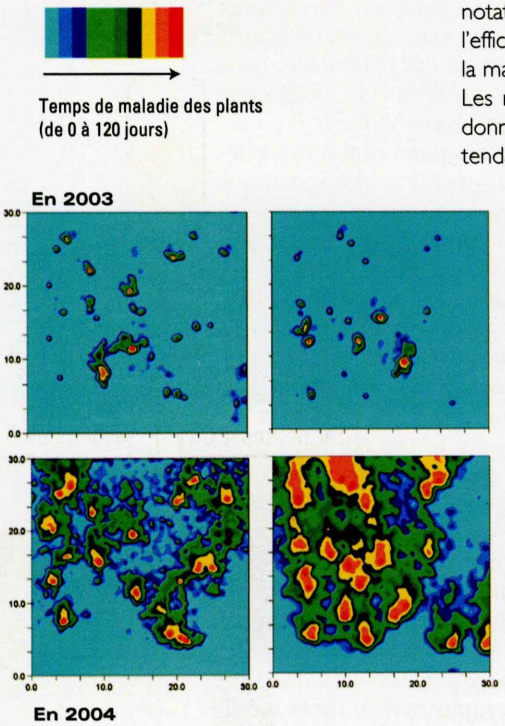


Figure 1.
Représentation des parcelles expérimentales d'oignons de second cycle contaminés par Xanthomonas axonopodis pv. allii en 2003 et 2004.

Dépérissement bactérien de l'oignon

Les travaux de recherche visant à comprendre le développement des épidémies de dépérissement bactérien de l'oignon provoqué par *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Xaa) se sont poursuivis en 2004. Cette maladie émergente au niveau mondial se manifeste par des lésions sur les parties aériennes de l'oignon (feuilles et hampes florales) (photo 1) et provoque une réduction de la taille des bulbes d'oignon conduisant à des pertes de rendement pouvant atteindre 50 %. En 2004, les conditions climatiques locales ont largement favorisé le développement d'épidémies chez les producteurs d'alliacées du sud de l'île de la Réunion.

Dans la continuité du programme, deux points principaux sont abordés en 2004 : (1) Analyse des épidémies de dépérissement bactérien dans des parcelles expérimentales d'oignon de second cycle, et (2) Analyse bactériologique des graines produites dans ces parcelles expérimentales.

Deux parcelles identiques à celles de 2003 ont été plantées avec des bulbes d'oignon. L'incidence de la maladie (pourcentage de plants malades) a été évaluée, après inoculation de quelques plants avec une souche connue et identifiable de *Xanthomonas* toutes les deux semaines par cartographie de tous les plants malades. Les expérimentations ont débuté à la fin de la saison chaude et les épidémies se sont largement développées jusqu'à atteindre des incidences de 44 et 61 % (contre 5 % en 2003). En comparant les conditions climatiques des deux années on explique les fortes incidences de maladie observées en 2004. En effet, contrairement à l'année précédente, les températures supérieures à 20°C et des pluies survenues en début d'expérimentation ont favorisé le développement de la maladie. Une modélisation de la progression temporelle de l'incidence de la maladie a été effectuée par régression non linéaire.

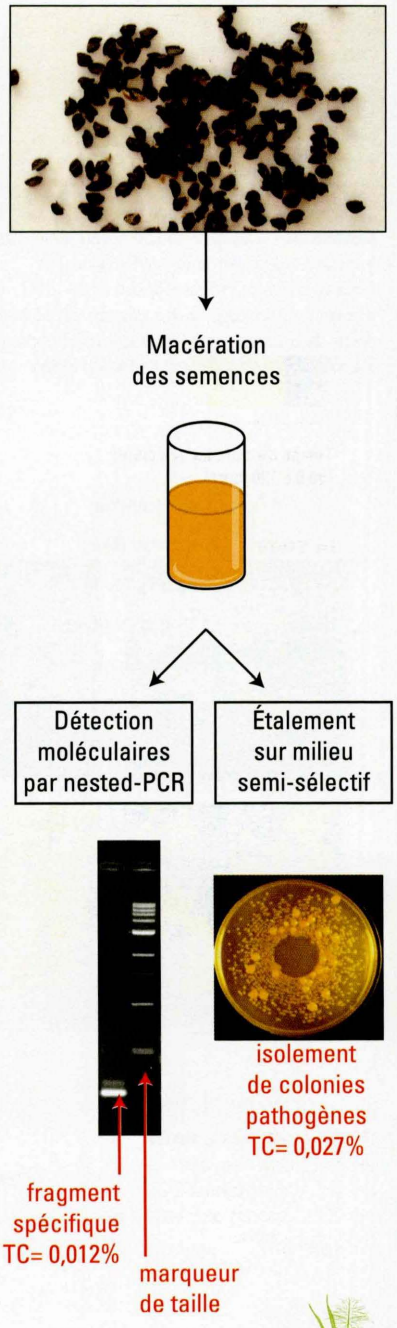
Le modèle « probit » est le plus adapté aux données de 2003 alors que le modèle Gompertz est le plus pertinent pour les données de 2004. L'analyse spatiale des épidémies grâce à la loi de Taylor et le calcul des paramètres betabinomiaux montre que tous les foyers de maladie sont de type agrégé, autour des plants inoculés, dans toutes les parcelles (Fig. 1). Les analyses géostatisques basées sur l'étude des semivariances révèlent que la dépendance spatiale des plants malades est particulièrement forte en 2004.

Des prélèvements bactériens sur les symptômes des plants d'oignon ont permis de vérifier l'identité des souches responsables des épidémies dans les parcelles expérimentales par une analyse FAFLP (fluorescent amplified fragment length polymorphism). Cette technique moléculaire permet de distinguer les groupes génétiques du pathogène. Deux groupes principaux sont présents à la Réunion ainsi qu'une souche rare facilement identifiable, que nous avons utilisée pour les inoculations. Les résultats indiquent que les foyers autour des plants inoculés sont contaminés par la souche d'origine et que certains foyers, disposés en bordure de parcelles ou dans des zones éloignées des plants inoculés, sont contaminés par un inoculum exogène, appartenant au groupe génétique commun à la Réunion. Cette analyse qualitative des épidémies montre ainsi un flux de génotype dans les parcelles expérimentales, probablement provoqués par des évènements de dissémination sur la période étudiée. Des évènements climatiques mineurs (association de pluie et vent) sont effectivement apparus un mois avant l'apparition des premières souches exogènes.

Toutes les semences produites dans les parcelles expérimentales les deux années d'étude sont récoltées et analysées afin de détecter la bactérie pathogène (Fig. 2). Les graines issues des parcelles de 2003 ne semblent pas contaminées contrairement aux semences produites en 2004. Les taux de contamination obtenus pour ces lots de semences sont faibles mais en accord avec la littérature. Il semble donc exister une relation entre l'incidence de la maladie sur les plants d'oignon et le taux de contamination des semences produites. Par ailleurs, la détection par technique moléculaire est plus sensible que sur milieu sélectif, même si elle ne garantit pas la viabilité des bactéries, puisque le test PCR gigogne détecte aussi bien les pathogènes vivants que morts. Enfin, il est à noter que les graines contaminées sont produites aussi bien par des plants d'oignon malades que par des plants d'oignon ne présentant pas de symptômes. Ce qui souligne que la contamination des graines d'oignon par *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* se fait principalement par voie aérienne, la dissémination étant favorisée par l'arrosage par asperseurs et par la pluie.

La mise au point d'un outil de détection de la bactérie dans les semences a été poursuivie. Un premier SCAR avait déjà été identifié et avait servi de matrice pour développer une Nested-PCR (N-PCR) spécifique de *Xaa*. Une autre séquence spécifique de Xaa a été mise en évidence par

Figure 2.
Méthode d'analyse bactériologique des semences d'oignon produites dans les parcelles expérimentales. Taux de contamination (TC) par Xanthomonas axonopodis pv. allii obtenus pour 2004.



RAPD-PCR, puis clonée et séquençée. Une N-PCR Multiplex a été mise au point, qui fonctionne avec des paires d'amorces nucléotidiques sélectionnées sur les deux SCARs. Cet outil amplifie selon les souches un ou deux fragments d'ADN cible de *Xaa* et détecte de 95 % des souches de la collection mondiale de *Xaa* disponible au laboratoire. Seules quatre souches (trois en provenance d'Afrique du Sud, une en provenance des États Unis) ne sont pas reconnues par cette PCR multiplex. La spécificité de cet outil a été évaluée sur une collection de bactéries différentes du *Xanthomonas a.* pv. *alli*. L'outil montre une bonne spécificité puisque seules quelques souches différentes de *Xaa*, appartenant pour la plupart à *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (pathogène de la tomate) sont reconnues par le test. Il existe cependant une « signature » *vesicatoria* qui rend possible la distinction des deux types de souches par PCR-RFLP. Une extraction alcaline réalisée sur macérât de semences avant PCR permet de concentrer l'ADN cible et de l'isoler des substances inhibitrices de la PCR présentes dans ces macérâts. La N-PCR Multiplex détecte jusqu'à 3. 10^3 bactéries/g de semence, ce qui correspond à des concentrations bactériennes peu élevées, capables néanmoins de déclencher des épidémies au champ. L'outil PCR déjà applicable localement pour de la certification de semences reste à parfaire, afin de pouvoir détecter les quelques souches atypiques de *Xaa*. La recherche de marqueur(s) spécifiques(s) pour ces souches est en cours.

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

Caractérisation moléculaire de deux nouvelles espèces de bégomovirus sur tomate

Suite à la première épidémie de *Tomato yellow leaf curl virus (Begomovirus, Geminiviridae)* à la Réunion en 1997, une enquête a été menée sur les cultures maraîchères des îles du sud-ouest de l'océan Indien, afin d'évaluer les risques sanitaires liés aux bégomovirus. Ce projet se déroule en partenariat avec les services officiels de la protection des végétaux et dans le cadre du PRPV (Programme Régional de Protection des Végétaux).

Des campagnes de prélèvement de feuilles de tomate présentant des symptômes de feuille en cuillère, de jaunissement et de nanisme, ont été effectuées à Madagascar en 2001, aux Comores (Mayotte, Anjouan et Grande Comore) en 2003-04 et aux Seychelles (Mahé) en 2004. L'utilisation d'un couple d'amorces dégénérées spécifiques des bégomovirus qui amplifient la partie centrale du gène de la protéine de capside (CP) a permis de détecter par PCR la présence de bégomovirus dans de nombreux échantillons foliaires. Sur la base de la séquence de la CP, certains isolats pouvaient être provisoirement classés dans deux nouvelles espèces au sein du genre *Begomovirus* : (1) le *Tomato leaf curl Madagascar virus* (ToLCMGV) détecté à Madagascar dans trois régions de la côte ouest, Miandrivazo, Morondava et Toliary et (2) le *Tomato leaf curl Mayotte virus* (ToLCMYV) détecté à Mayotte, sur la côte est à Dembeni et sur la côte ouest à Combani et Kahani. Ce dernier a également été détecté aux Seychelles à Mahé et dans le nord de Madagascar à Namakely et à Antsalaka. La distinction de deux nouvelles espèces a été confirmée par la séquence complète de l'ADN-A de deux isolats du ToLCMGV-[Morondava] et -[Toliary] de Madagascar, de deux isolats du ToLCMYV-[Dembeni] et -[Kahani] de Mayotte et d'un isolat réunionnais du TYLCV-Mld[RE]. A l'exception de l'isolat Toliary, le pouvoir infectieux des clones viraux a été vérifié par agroinfection de jeunes plants de tomate (Fig. 3). Ces clones agroinfectés provoquent des symptômes typiques de nanisme et de feuilles en cuillère comparables à ceux observés au champ, et sont transmissibles par l'aleurode *B. tabaci*. Ceci suggère que l'ADN-A représente l'intégralité du génome de ces virus. Des recherches de composants B et beta à l'aide d'amorce PCR à spectre large ont été infructueuses.

L'étude des relations phylogénétiques montre que le ToLCMGV et le ToLCMYV

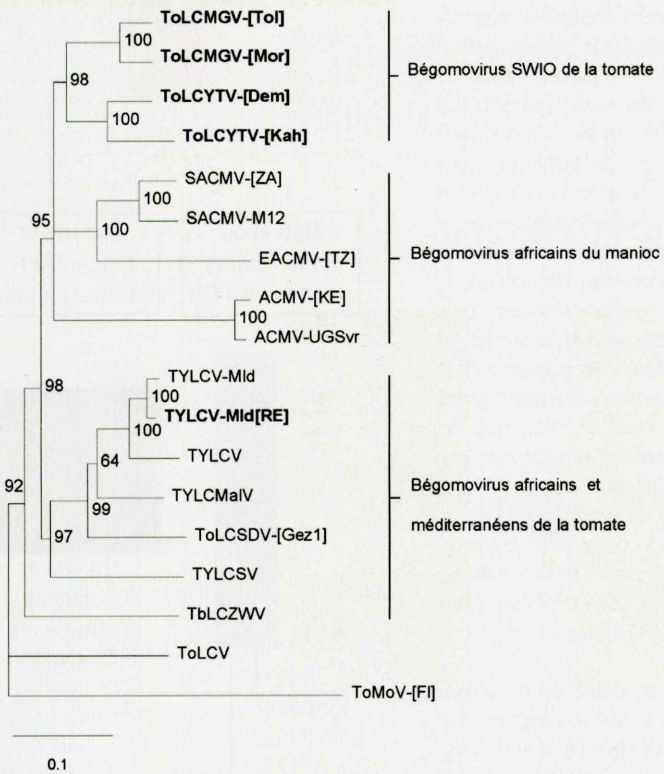


Figure 3.
Arbre phylogénétique indiquant les liens de parenté entre les séquences des génomes complets d'ADN des isolats du Tomato leaf curl Mayotte virus – [Kahani] et [Dembeni], du Tomato leaf curl Madagascar virus – [Morondava] et [Toliary], du Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Réunion] et des bégomovirus africains et méditerranéens de la tomate et du manioc les plus apparentés. SWIO : îles du sud-ouest de l'océan Indien.

appartiennent au groupe africain des bégomovirus monopartite et qu'ils sont génétiquement proches des bégomovirus africains du manioc (bipartites) et méditerranéens de la tomate (monopartite) (Fig. 4). Contrairement au TYLCV qui a été introduit à la Réunion, ces deux nouvelles espèces virales semblent endémiques de la région : la plupart des îles du sud-ouest de l'océan Indien hébergent au moins une des deux espèces, la diversité intra espèces est relativement importante et les deux espèces sont plus proches l'une de l'autre que des autres bégomovirus.

H. Delatte, B. Reynaud, J-M. Lett

Figure 4.
Comparaison des symptômes de maladie observés sur des plants de tomate de la variété sensible Farmer, 20 jours après agroinoculation avec différents isolats de bégomovirus caractérisés dans cette étude : (1) Témoin plante saine, (2) Tomato leaf curl Mayotte virus – [Kahani], (3) Tomato leaf curl Madagascar virus – [Morondava], et (4) Tomato yellow leaf curl virus – Mild [Réunion].

Etude de la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV

Le SCYLV *(Sugarcane yellow leaf virus)*, agent causal de la maladie de la feuille jaune (photo 2), est présent dans la majorité des aires de culture de la canne à sucre. Des pertes notables de rendement ont été attribuées à ce virus dans plusieurs pays. A la Réunion, on le trouve, avec des taux d'infection variables, sur toute la sole cannière et pour toutes les variétés cultivées.

Le SCYLV est principalement disséminé par la plantation de boutures infectées, mais également par l'intermédiaire d'insectes vecteurs, notamment par le puceron *Melanaphis sacchari*. L'étude de la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV fait suite aux travaux de thèse de L. Rassaby qui avait caractérisé la variabilité génétique du virus. Ces travaux sont réalisés en collaboration avec le Cirad Montpellier dans le cadre de la thèse de Y. Abu Ahmad.

En 2002 et 2003, des collectes de *Melanaphis sacchari*, puceron vecteur du SCYLV, ont été effectuées dans le but de mettre en place des élevages de cet insecte. Toutes les tentatives d'élevage sur différentes plantes hôtes se sont soldées par un échec pour des raisons diverses. Des solutions de remplacement ont donc dû être envisagées. Dont une nouvelle méthode d'élevage de *M. sacchari*. Elle consiste à multiplier les pucerons sur fragment de feuille de canne à sucre détachée maintenue en survie dans un tube en verre (photo 3). Cette méthode d'élevage de *M. sacchari* pourra être utilisée en 2005 pour le transfert de différentes souches de SCYLV de plantes malades (en serre) à plantes saines (vitroplants).

Par ailleurs, la technique d'inoculation de vitroplants de canne à sucre avec le SCYLV par l'intermédiaire de *M. sacchari* a été mise au point. Les premiers essais ont été réalisés avec un isolat semi-purifié originaire du Pérou. Le SCYLV a été détecté dans 5 plantes sevrées sur 84 après 3 mois de croissance en chambre de confinement. Cependant, le virus transmis par les pucerons ne correspondait pas à la souche virale péruvienne mais à la souche présente naturellement à la Réunion. On peut conclure que la transmission du virus semi-purifié a été infructueuse et que le virus transmis était présent dans les pucerons prélevés au champ. Néanmoins, cette expérience a permis de montrer que la transmission du SCYLV à des vitroplants de canne à sucre via *Melanaphis sacchari* était possible.

En se basant sur ces résultats, on peut donc envisager d'étudier la variabilité du pouvoir pathogène du SCYLV présent à la Réunion par transmission de différents isolats du SCYLV (à partir d'un élevage de pucerons sur feuille détachée) à différentes variétés de canne à sucre cultivées *in vitro*.

L. Costet

Photo 2.
Symptômes de la maladie de la feuille jaune causée par le SCYLV (L. Costet).

Photo 3.
Elevage de Melanaphis sacchari sur feuille de canne à sucre détachée (L. Costet).

Photo 4.
Symptômes d'échaudure des feuilles de la canne à sucre, maladie causée par Xanthomonas albilineans (L. Costet).

Transfert de connaissance vers les professionnels du secteur agricole

Appuis en phytopathologie à la profession cannière

Cette activité se décline en deux actions : (1) une aide à l'amélioration variétale qui est continue et permet de s'assurer, par des expérimentations réalisées en conditions d'inoculation artificielle, que les variétés obtenues par les sélectionneurs canne à sucre du Cerf (Centre d'Etude, de Recherche et de Formation) présentent un niveau suffisant de résistance aux principales maladies présentes à la Réunion (2) une surveillance générale des maladies sur l'île.

Concernant l'action de criblage variétale pour la résistance aux maladies deux nouveaux essais ont été mis en place sur la station de la Mare en juillet 2004. Le premier permettra l'évaluation de 29 clones du Cerf et 5 variétés du MSIRI (Mauritius Sugar Industry Research Institute) à l'égard de l'échaudure des feuilles (photo 4) et de la gommose. Alors que le second est une répétition de l'essai criblage à l'égard de l'échaudure des feuilles suivi en 2002-2003 à Saint-Benoît et qui comportait une trentaine de clones. L'objectif de cette étude est de valider la méthode d'estimation de la résistance à l'échaudure des feuilles basée sur la colonisation de la tige. L'année 2004 est également marquée par la libération par le Cerf d'une nouvelle variété aux qualités agronomiques exceptionnelles : R580. Cette nouvelle variété que nous avons évaluée à plusieurs reprises au cours des années précédentes pour sa résistance aux maladies, présente néanmoins une certaine sensibilité en condition d'inoculation artificielle à l'échaudure et à la gommose. Une vigilance particulière devra être observée au fur et à mesure de la diffusion de cette variété.

Dans le cadre de la surveillance générale des maladies, aucun phénomène pathologique nouveau n'a été signalé cette année à la Réunion. On signalera cependant qu'une nouvelle épidémie de taches jaunes (ou yellow spot) a eu lieu en avril-mai 2004 sur toutes les variétés cultivées, notamment R570 et R579, et surtout dans les hauts de l'est (Grand Etang, Salazie,…). Il s'agit du même type d'épidémie qui s'est déjà produite en 2003 à la même période, mais lors de pluies plus importantes. Au cas où cette maladie s'installe de manière durable et récurrente à la Réunion, il faudrait envisager un criblage pour la résistance des nouveaux clones produits par le Cerf.

Par ailleurs, deux visites de la quarantaine canne à sucre du Cerf ont été réalisées en juin et novembre 2004. Aucune anomalie d'ordre phytopathologique n'a été observée sur les 24 variétés internationales importées à partir de la quarantaine du Cirad à Montpellier, et toutes ces variétés ont été libérées. En revanche, en novembre 2003, le *Sugarcane yellow leaf virus* ou SCYLV a été détecté dans la quarantaine canne à sucre du Cerf dans quatre variétés originaires du MSIRI à Maurice. En 2004, la culture de méristème pour assainir ces variétés ayant échoué, ces variétés ont été détruites.

L. Costet

Identification et détection de *Xanthomonas fragariae*, agent de la maladie des taches angulaires du fraisier.

Ce sujet a été mené en collaboration avec le Service de Protection des Végétaux (SPV).
Xanthomonas fragariae (*Xf*), bactérie inscrite sur la liste européenne des organismes de quarantaine a été mise en évidence à plusieurs reprises sur des plants de fraisier importés de métropole. En 2001 une nouvelle maladie du fraisier est apparue en Europe. Peu de données sont disponibles sur la bactérie responsable, dénommée *Xanthomonas arboricola pv. fragariae* (*Xaf*), qui fut confondue au début avec *Xf*. Dans le but de contrôler les plants de fraisier à l'importation vis-à-vis de la présence de *Xf* et *Xaf*, il est nécessaire de posséder des outils de détection performants de ces bactéries. Dans la littérature sont déjà décrits différents outils de diagnostic de *Xf* (tests ELISA et PCR). La réalisation de tests biochimiques et de tests de pouvoir pathogène est également conseillée pour différencier les deux types de bactéries. Nous avons comparé ces différentes méthodes de caractérisation et de détection sur une collection de bactéries appartenant aux deux espèces.
Pour *Xanthomonas fragariae*, un test DAS-ELISA ainsi qu'une multiplex PCR donnent de bons résultats en terme de spécificité et sensibilité. Toutes les souches de *Xf* montrent une réponse positive à ces deux tests. Ces deux outils permettent de confirmer la présence de *Xf* dans des plants exprimant des symptômes.
Les souches de *Xaf* ne répondent à aucun test sérologique ou moléculaire effectué. Leur profil biochimique étudié est différent de celui de *Xf*

mais ne permet pas de typer formellement du *Xaf*. Seuls les symptômes obtenus sur fraisier après inoculation de la bactérie permettent de confirmer l'identité de cette bactérie.

Validation d'outils de diagnostic moléculaire de *Ralstonia solanacearum*. Détection de la bactérie *in planta* et dans l'eau

Cette étude est conduite en collaboration avec le SPV. A la Réunion, *Ralstonia solanacearum* est présente sur les cultures de basse altitude, tomate et aubergine et dans les Hauts de l'île, essentiellement sur pomme de terre et Géranium rosat. L'eau constitue un mode de transmission de la maladie. En effet, la bactérie peut être véhiculée par les pluies, l'eau de ruissellement, l'eau d'irrigation, les réseaux hydrographiques. On peut également la retrouver dans les réservoirs et retenues collinaires utilisés par les agriculteurs en secours suite à des problèmes d'alimentation d'eau.

La mise au point d'une méthode de détection de la bactérie dans les eaux, rapide et fiable, est un préalable à la mise en oeuvre d'un réseau d'alerte et de prévention des contaminations.

D'autre part, l'utilisation d'un matériel sain avant plantation est une règle indispensable pour lutter contre l'introduction de la maladie dans une exploitation. Pour cela, il est nécessaire de posséder un test suffisamment sensible pour certifier des plants de pépinière indemnes de *Ralstonia solanacearum*.

Le but de ces travaux est de mettre au point et de valider un outil PCR pour détecter la bactérie dans l'eau et également *in planta*.

Nous avons dans un premier temps comparé deux protocoles PCR d'identification et/ou de détection de la bactérie existants : une PCR Multiplex (Fegan/Prior) et une Nested-PCR (Poussier) sur un panel de souches représentatif de la diversité de *Ralstonia solanacearum* à la Réunion. Les essais réalisés avec la Nested-PCR montrent des résultats peu répétitifs, avec des problèmes récurrents d'absence d'amplification, alors que la Multiplex PCR permet d'identifier et de typer les différents phyllotypes réunionnais. Par contre, ce n'est pas un outil suffisamment sensible pour être utilisé tel quel pour détecter la bactérie dans les eaux et garantir l'absence du pathogène dans des plants. En effet, cette PCR simple rend possible la détection de concentrations bactériennes supérieures à 107 bactéries par ml (suspensions bactériennes). Nous avons fait évoluer cet outil en Nested-PCR en désignant des amorces plus internes dans la séquence d'intérêt. Deux amplifications successives abaissent le seuil de détection à 102 bactéries par ml. Afin de minimiser les problèmes de contamination entraînant des faux positifs, assez fréquents en N-PCR, nous avons mis au point une "One-tube Nested-PCR" : les deux étapes successives de la Nested-PCR sont réalisées dans un seul tube, sans ouverture du tube entre les deux amplifications.

La sensibilité de l'outil dans l'eau d'irrigation artificiellement contaminée par *Ralstonia solanacearum*, a été évaluée à 103 bactéries par ml, après concentration et nettoyage de l'ADN cible par filtration et centrifugation.

L'évaluation de la spécificité est en cours sur une gamme de bactéries différentes de *Ralstonia solanacearum*.

J. Pompon, I. Robène-Soustrade

Utilisation du test de détection par bio-PCR pour valider la sortie de quarantaine d'anthuriums importés

Cinq mille vitroplants d'anthurium de 16 variétés différentes ont été importés des Pays-Bas (société Anthura) en décembre 2003 et placés en quarantaine chez un pépiniériste particulier. La sortie de quarantaine de ces plants a été validée par un travail de diagnostic effectué de façon coordonnée entre le Service de Protection des Végétaux et le Laboratoire de Pathologie et Génétique Moléculaire du Cirad. En mars et avril 2004, trois cent feuilles ont été prélevées parmi toutes les variétés et ont subi le test de détection. Les tests ont consisté en une première étape d'enrichissement bactérien dans un milieu semi-sélectif contenant quatre antibiotiques, suivie d'une seconde étape de recherche par amplification enzymatique (PCR) de la présence d'un gène spécifique révélant la présence de la bactérie. Théoriquement, une seule bactérie est détectée par échantillon. Comme tous les tests se sont avérés négatifs, ces plantes ont été autorisées à sortir de quarantaine en juin 2004. Cette approche a permis de faire passer la durée de quarantaine pour les vitroplants d'anthurium de 24 mois (temps approximatif pour l'apparition de la première fleur et date à laquelle un plant n'ayant pas exprimé de symptômes est considéré comme sain) à 6 mois environ.

L. Gagnevin

Caractérisation moléculaire d'un Tospovirus sur culture d'oignon

Cette étude a été menée avec le SPV et la FDGDON. Une maladie virale a été mise en évidence fin 2003 sur culture d'oignon à la Réunion. Les symptômes observés s'apparentent à ceux provoqués par un Tospovirus, l'IYSV déjà décrit dans plusieurs pays sur alliacées. L'identité du virus a été confirmée par des tests sérologiques (ELISA, immunoempreinte) et moléculaires (RT-PCR). Une

Photo 5. Symptômes d'IYSV sur feuilles et tiges d'oignon.

Photos 6.
Symptômes de la maladie du tomato yellow leaf curl ou des feuilles jaunes en cuillère sur tomate en plein champ identifiés à Saint-Gilles les Hauts en avril 2004.
La caractérisation moléculaire de l'agent pathogène, par PCR et par séquençage, a permis d'identifier la souche Israël dite recombinante du TYLCV.

prospection a été menée d'octobre à décembre 2004 dans 10 parcelles de production de bulbes d'oignon localisées dans les principales aires de culture de l'île. Le virus a été mis en évidence par ELISA dans 75 % des feuilles symptomatiques récoltées (n=221). Le virus a également été détecté par ELISA dans 27 % de bulbes testés (n=64), 15 % de semis d'oignon âgés de 45 jours (n=119). Par contre, les tests ELISA réalisés sur lots de semences (n=59) se sont montrés négatifs. IYSV a également été mis en évidence sur d'autres espèces du genre *allium* : poireau, ail et échalotte.

I. Robène-Soustrade, M. Roux-Cuvelier

Présence des souches recombinantes et non recombinantes du *Tomato yellow leaf curl* (TYLCV), virus sur tomate à la Réunion

Depuis la première épidémie de TYLCV à la Réunion en 1997, une campagne de prélèvement d'échantillons foliaires présentant les symptômes typiques de nanisme, de jaunisme et d'enroulement foliaires, a été mise en place. L'objectif était d'étudier (1) la répartition géographique du virus sur l'île et (2) l'évolution moléculaire du virus depuis son introduction. Les échantillons prélevés de 1997 à 2003 ont permis d'identifier la présence unique de la souche Mild dite non recombinante du TYLCV. En avril 2004, la présence de symptômes très sévères, plus sévères que ceux observés habituellement, de la maladie du TYLC dans une parcelle de tomate en plein champ à Saint-Gilles les Hauts suggérait l'apparition d'un variant plus sévère de la souche Mild du TYLCV ou l'introduction d'une nouvelle souche du TYLCV ou encore celle d'un nouveau bégomovirus (photos 6). La présence et l'identité du virus ont été étudiées par PCR avec deux couples d'amorces l'un amplifiant les deux-tiers du gène de la protéine de capside (région CP) et l'autre la moitié du gène de la protéine de réplication (région Rep). La dernière région du génome du TYLCV a été utilisée pour distinguer la souche Israël dite recombinante (TYLCV-IL), de la souche mild dite non recombinante (TYLCV-Mld). L'analyse des séquences nucléotidiques virales de la région Rep, correspondant aux échantillons prélevés à Saint-Gilles-les Hauts, a permis d'identifier pour la première fois à la Réunion la présence de la souche Israël dite recombinante du TYLCV.

H. Delatte, B. Reynaud, J-M. Lett

DYNAMIQUE DES POPULATIONS ET COMPORTEMENT DES RAVAGEURS ET DE LEURS AUXILIAIRES

L'aleurode *Bemisia tabaci*, vecteur de bégomovirus

Variabilité moléculaire du vecteur

L'aleurode *B. tabaci* est l'un des ravageurs des cultures les plus préoccupants, principalement par ses capacités à transmettre plus de cent espèces de bégomovirus dont le TYLCV à la Réunion. 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 des îles du sud de l'océan Indien et le biotype B cosmopolite et généralement invasif. La cartographie de répartition du biotype B invasif et du biotype MS indigène à la Réunion a été établie en 2003. Le biotype B invasif est prédominant sur les espèces maraîchères et le biotype MS indigène présent plutôt sur certaines adventices (en particulier *Euphorbia heterophylla*) est prédominant uniquement dans la région Est.

Cette récente introduction du biotype B à la Réunion permet d'analyser son processus de colonisation. Les biotypes de *B. tabaci* étant indistincts morphologiquement, un jeu de huit marqueurs