



Dynamique évolutive de *Ralstonia solanacearum* en réponse aux pressions de sélection de l'aubergine résistante : approche populationnelle, de génétique évolutive et fonctionnelle de la durabilité de la résistance

Jérémy Guinard

► To cite this version:

Jérémy Guinard. Dynamique évolutive de *Ralstonia solanacearum* en réponse aux pressions de sélection de l'aubergine résistante : approche populationnelle, de génétique évolutive et fonctionnelle de la durabilité de la résistance. Bactériologie. Université de la Réunion, 2015. Français. <NNT : 2015LARE0032>. <tel-01379540>

HAL Id: tel-01379540

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01379540>

Submitted on 11 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Ecole Doctorale des Sciences, Technologies et Santé E.D. n°542
UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de la Réunion

THÈSE

Présentée par

Jérémy GUINARD

Pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génétique des populations, phytopathologie, bactériologie, épidémiologie moléculaire

Dynamique évolutive de *Ralstonia solanacearum* en réponse aux pressions de sélection de l'aubergine résistante : approche populationnelle, de génétique évolutive et fonctionnelle de la durabilité de la résistance

Soutenue le 14 Décembre 2015 devant le jury composé de

Mme Pascale BESSE
Mme Claire NEEMA
Mme Marie-Agnès JACQUES
M. Benoit MOURY

Professeure, Université de la Réunion
Professeure, Montpellier SupAgro
Directrice de recherche, INRA
Directeur de recherche, INRA

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Encadrée par :

M. Stéphane POUSSIER
M. Emmanuel WICKER

Professeur, Université de la Réunion
Chercheur, CIRAD

Directeur de thèse
Encadrant de la thèse

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Ecole Doctorale des Sciences, Technologies et Santé E.D. n°542
UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de la Réunion

THÈSE

Présentée par

Jérémy GUINARD

Pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génétique des populations, phytopathologie, bactériologie, épidémiologie moléculaire

Dynamique évolutive de *Ralstonia solanacearum* en réponse aux pressions de sélection de l'aubergine résistante : approche populationnelle, de génétique évolutive et fonctionnelle de la durabilité de la résistance

Soutenue le 14 Décembre 2015 devant le jury composé de

Mme Pascale BESSE
Mme Claire NEEMA
Mme Marie-Agnès JACQUES
M. Benoit MOURY

Professeure, Université de la Réunion
Professeure, Montpellier SupAgro
Directrice de recherche, INRA
Directeur de recherche, INRA

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Encadrée par :

M. Stéphane POUSSIER
M. Emmanuel WICKER

Professeur, Université de la Réunion
Chercheur, CIRAD

Directeur de thèse
Encadrant de la thèse

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Jérémy GUINARD**....., en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Pierre, le 10/03/2016

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.

REMERCIEMENTS

Voilà maintenant la partie la plus difficile de cette thèse, les remerciements... Par qui commencer lorsque l'on n'a tant de personne à remercier ? Le dépôt de ce manuscrit et la soutenance associée est l'aboutissement de 8 années d'études, d'un rêve d'étudiant qui se concrétise enfin. Faire une thèse était pour moi un objectif à atteindre depuis le début de mes études supérieures, autant dire que cela représente beaucoup pour moi. À l'écriture de ces mots, je suis traversé par une ambivalence de sentiments : je tremble de joie mais aussi de peur de voir ce rêve enfin accompli. Alors ça y est, je soutiens ma thèse ? Difficile de réaliser...

Ce travail a été financé par le Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), l'université de la Réunion, la Région Réunion, l'Union Européen (Projet FEDER), Agreenium (Programme EIR-A) ainsi que par le Ministère de l'Agriculture (Projet CASDAR). Cette thèse a été réalisée au Pôle de Protection des Plantes (3P), à la station Ligne Paradis du CIRAD de Saint-Pierre, Ile de la Réunion.

J'exprime toute ma reconnaissance à Bernard Reynaud pour m'avoir accueilli au sein de son UMR et à Jacques Dintinger pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je tiens à remercier Stéphane Poussier et Emmanuel Wicker, respectivement directeur de thèse et encadrant. Ils ont su faire preuve d'une grande patience envers moi. Merci pour toutes les connaissances qu'ils ont pu m'apporter, pour m'avoir permis de faire mes propres erreurs comme mes réussites, en étant relativement présents pour me conseiller et me guider. Merci d'avoir tenu bon jusqu'à la fin de cette thèse malgré les innombrables problèmes rencontrés durant cette thèse, que ce soit d'un point de vue humain comme d'un point de vue scientifique. Malgré tout, je n'oublierai jamais le brame de 18h... Merci aussi à l'ensemble du personnel administratif et scientifique du 3P qui a contribué de près ou de loin à cette thèse.

Je remercie Mmes Claire Neema et Marie-Agnès Jacques pour avoir accepté d'être les rapportrices de mes travaux de thèse ainsi que M. Benoît Moury pour sa participation au jury de thèse et aux comités de thèse. Je tiens également à remercier Virginie Ravigné, Pierre Lefeuvre et Alice Guidot pour avoir participé à mes comités de thèse, pour leurs critiques toujours constructives et leurs encouragements. Merci aussi à Fred, Sandrine et Agathe sans qui les statistiques seraient restées un monde obscur. Je remercie aussi Phillipe, Olivier, Virginie, Christian, Pierre, Rodolphe et Gilles pour les discussions enrichissantes en génétique moléculaire et en génétique des populations.

Merci à mes collaborateurs de Toulouse : Stéphane Génin, Nemo Peeters et Keke Wang. Travailler avec vous était très formateur et vraiment très intéressant. Bien sûr, par extension je remercie toute la SG-Team avec qui j'ai passé de très bons moments! I want to thank Boris Vinatzer who welcomed me in his lab, I really appreciated working with you boss. Thanks Marco for performing experiment. Thanks also to Chris Clarke and Caroline Monteil for countless explanation in science. I also wanted to thank Kevin and Hannah for their daily good mood. Thanks for the self-defence training and, I know, I am a mess. I had great time with all of you guys.

Je pense très souvent aux gens qui n'ont jamais cru en moi et qui m'ont toujours sermonné avec des phrases du type « tu n'y arriveras jamais ». Ces bâtons dans les roues ont aussi été très formateurs et m'ont donné suffisamment de hargne et de pugnacité pour leur montrer qu'ils avaient tort, que je valais finalement quelque chose. Je n'ai pas la prétention de dire que je suis devenu un bon scientifique ou que je mérite des éloges dithyrambiques, loin de moi cette idée, well...here I am folks !

J'ai tant de gens à remercier de m'avoir suivi, épaulé, aidé, soutenu, remonté le moral, boosté, motivé, qui m'ont fait partager tant d'instantanés qui ont de près ou de loin contribué au bon déroulement de cette thèse et (surtout) de ses à-côtés...

I want to thank John Andralojc, my supervisor during my three months-placement in Rothamsted Research Center. Even if I spent hours in the greenhouses measuring photosynthesis rate on willow leaves or hours in blooming wheat fields measuring chlorophyll contents, I really appreciated my time there. I learnt a lot with you and you gave me the « taste » of science and research. I will always be grateful for this. Thanks also to my aunties (Jo & Marina) who dragged me into science.

Merci à l'équipe de choc, la « Ralsto Team Peï » : Jacques le Yéti, Manu le cerf (tu descends ?), Sisi la princesse du Sud, Sylvain le nounours des hauts, Jean-Mi le coach, Edith et Marie les tantines des îles, Cyrill le bout-en-train du matin. Merci à l'excellence de l'équipe technique. Merci Sylvain pour m'avoir forcé à sourire en fin de thèse, ça aide mine de rien ! Merci coach pour l'entraînement et l'encadrement des matches de foot ! Merci aussi à Didier, Martial et Jim pour les coups de main salvateurs lors des manips de fin de cycle. Merci aussi à AG91-25 et à MM738...désolé de vous avoir tant torturé !

Merci aussi aux stagiaires Anne, Anaïs et Lakshmi qui ont contribué de manière hautement significative*** (bon ok je sors) à cette thèse. Elles ont fourni un travail de qualité qui m'a été indispensable au cours de cette thèse. J'espère que leur passage au CIRAD leur aura apporté au moins autant qu'elles m'ont apportées.

Je tiens à dire un grand merci à Steph', Mumu, Jean-Jacques, Karine, Lulu, Boubou, Laet, Claudine et aux deux Véro pour leur aide précieuse, leurs astuces et leurs savoirs-faire qui m'ont fait gagner un temps précieux ! Merci aussi de m'avoir formé aux ficelles de la µbio et de la bio mol'. Merci Océane d'avoir participé à mon esclavagisme.

Un grand merci à Caro. Son énergie, sa joie de vivre et sa passion pour la recherche sont communicatifs. Merci pour tes conseils en science, tes relectures de ce manuscrit et pour tes critiques constructives et mélioratives. Merci aussi de m'avoir fait découvrir le « Triadventure group », de m'avoir donné gout au Triathlon et de m'avoir inculqué la philosophie du « let it go » ! Nartrouv' ça vite.

Je tiens à saluer et à remercier mes collègues thésard(e)s (et ex-thésard(e)s), compagnons de galère, avec qui il suffit d'un regard pour savoir ce que l'autre traverse et d'un sourire compatissant pour donner un peu de baume au cœur. Sans ordre, merci à Alice, Oriane et Maud (Miaou ?), Mané, N-O, Max et Sisi, Morguen, Noura, Sasa, Alex-Virus, Minichief, Clara, Brice Toko, Sophie, Issa, Alassane, Carine, Julien, Bastien, Mathilde, Mathieu Gouine et Aline... Bon courage à ceux qui n'ont pas encore soutenu, on y survit (enfin je crois...) ! Une petite pensée ici pour les thésards (et amis) d'ailleurs qui sont (ou vont) passés par là : Bobo, Popo, Agathe, Keke, Fabien (le 12 c'est hardcore !), Pauline, Coupcoup, Lyly, Aurélie, Younes et Andrew.

Merci au trio des Vieilles meufs et à Mané pour les pauses café-toblerone-remontage de moral, les sessions natations, les discussions (et explications) en genet' des pop, les dépannages de Script R... j'en passe, la liste est longue ! Max, je n'oublierai pas tous les noms d'oiseaux divers et variés qui m'ont fait beaucoup rire (headless chicken, pause-caca, the hobo...), mais je ne me les ferai pas tatouer pour autant. N-o, notre ambianceur national, merci pour les crises de fou rire que tu m'as donné, par moments elles étaient salvatrices !

Merci à tous mes amis d'ici et d'ailleurs qui m'ont suivi et supporté tout au long de cette thèse. Sans ordre : Les loulous du Nord (Alex & Pauline, Agathe & Romy, Bobo), les kinés de la villa palette, Yvane (+ les bouseux du PB), Nico-koko, Declain bas, Pedro & Sandrine, Ju & Alex, Clément, Mel, Godet, BadBoy & Justine, Manu & Amandine, Samuel, Marbie & Floppy, Iltaf, Mathoch', Wawa, Sharham, Eli, Liz, Nabil, Gilloux, Laura Chef Cougar, Yan & Meeeeeeeeeeel, Emilie, Colique & Emerine, Quentin Baies-roses... Un grand merci à David et sa petite maman Cathy d'être venus (un peu sans le savoir) à la fin de cette thèse et qui m'ont fait m'aérer pendant mes gros coups de stress. Désolé de ne pas avoir pu trop me libéré. Merci aussi aux VSC et stagiaires du CIRAD, trop nombreux pour être cités ici mais je pense bien à vous aussi !

Charlotte, que dire ? J'admire ton courage de m'avoir supporté en cette fin de thèse. Ta présence à mes côtés a été plus que bienfaitrice. Tu as su m'apaiser avec tes mots et ta tendresse mais tu m'as aussi motivé à travailler le soir et les weekends, et m'a encouragé à ne rien lâcher malgré une cadence de travail infernale. Merci pour les relectures de ce manuscrit, Ralsto n'a plus de secrets pour toi désormais. Merci de m'avoir supporté pendant ces 2 derniers mois de stress, d'indisponibilité et d'ascenseur émotionnel et d'avoir pris soin de moi en ces moments d'égarement.

Et, bien évidemment, comment ne pas remercier mes colocataires Pierre (Boubou), Isa (l'ignoble) et Oriane (l'horrible) ? Ces trois personnes ont grandement contribué à cette thèse en me faisant répéter mes oraux, en me sortant de ma torpeur et en m'aidant à décompresser par des repas presque parfaits, des câlins colocs, et j'en passe. Parfois, rien que leur présence ou de les savoir pas loin me réconfortait et m'aidait à tenir le coup. Alors pour tout cela, je vous dis mille mercis (bisoubisounours !). Une fois cette thèse terminée, nous trinquerons aussi à la meilleure coloc' du monde !! Et puis Merci Jacquie et Michel ! Merci pour tout, merci d'avoir été là, merci d'être vous ! Merci aussi aux super coloc's de passage : Bricou, Alix, Momo et Nico.

Je remercie également ma famille (tous ne sont pas cités, mais cela ne m'empêche pas de penser à vous). Merci de votre patience, de vos encouragements et de votre soutien à distance. Merci d'avoir toujours cru en moi depuis le premier jour. Maman & Franck, Pierre & Auré (mes frères !), Alice, Papa & Manou, Sophie & Pierre, Papy, Papillon, Jo & Mimi... Serai-je sur la 3^e marche du podium ?

Une pensée toute émue à mes deux grands-mères, Nany et Coucoule, parties quelques mois avant la fin de cette thèse. J'aurai aimé voir la fierté dans vos yeux, votre 1^{er} petit fils vous annonçant qu'il a (enfin) terminé sa thèse.

Je dédie cette thèse à ma mère, Nathalie, sans qui rien de tout cela n'aurait pu être possible...

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET PROBLÉMATIQUE DE LA THÈSE ..	3
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Bases moléculaires de l'interaction hôte-pathogène	5
1.1. Interaction moléculaire entre un hôte et son pathogène	5
1.1.1. Le modèle de Jones et Dangl.....	5
1.1.1.1. Reconnaissance des motifs moléculaires associés aux microorganismes	5
1.1.1.2. Coévolution hôte-pathogène : la sensibilité médiée par les effecteurs.....	6
1.1.1.3. Les réponses de défense spécifiques	8
1.1.2. Le modèle d'invasion de Cook, Mesarich et Thomma.....	9
1.2. Résistance des plantes aux bio-agresseurs.....	11
1.2.1. Résistance non-hôte ou résistance non-spécifique	13
1.2.2. Résistance hôte	13
1.2.2.1. La résistance hôte race-non spécifique.....	14
1.2.2.2. La résistance hôte cultivar-race spécifique.....	14
1.1.1.1. Les différentes classes de gènes de résistance.....	16
1.1.2. Les différentes stratégies de déploiement de la résistance	18
1.1.2.1. Un seul gène de résistance.....	18
1.1.2.2. Rotation de gènes de résistance dans le temps	19
1.1.2.3. Mélange ou mixture de gènes de résistance	19
1.1.2.4. Pyramidage de gènes	19
1.1.2.5. L'épidémiologie du paysage.....	20
1.2. Durabilité de la résistance	20
1.2.1. La notion de durabilité de la résistance	20
1.2.2. Durabilité de la résistance : comment la mesurer ?.....	21
2. Potentiel évolutif des agents phytopathogènes.....	23
2.1. Diversité et structure génétique des microorganismes pathogènes	23
2.1.1. Forces évolutives générant de la diversité chez les microorganismes pathogènes....	23
2.1.1.1. Mutation	23
2.1.1.2. Sélection exercée par les gènes de résistance.....	24
2.1.1.3. Flux de gènes et de génotypes.....	24
2.1.1.4. Taille efficace et dérive génétique.....	24
2.1.1.5. Recombinaison	25

2.2.	Contournement de la résistance.....	25
2.3.	Coût de virulence/déficit de <i>fitness</i>	27
2.4.	Structuration génétique des populations bactériennes.....	27
2.5.	Outils pour l'épidémiologie des populations bactériennes : les marqueurs moléculaires .	30
2.5.1.	L'approche MLSA/MLST.....	31
2.5.2.	L'approche MLVA.....	33
2.5.2.1.	Caractéristiques des VNTRs.....	33
2.5.2.2.	Modèles de mutation et homoplasie	33
2.5.3.	L'analyse MLVA chez les bactéries phytopathogènes.....	34
2.6.	Analyse de la structure des populations	36
2.6.1.	Différenciation génétique	36
2.6.2.	Déséquilibre de liaison et recombinaison.....	36
3.	<i>Ralstonia solanacearum</i> , l'agent du flétrissement bactérien.....	39
3.1.	Symptomatologie et distribution géographique.....	39
3.1.1.	Cycle de vie.....	41
1.1.1.	Modes de conservation et de dissémination	43
1.2.	Morphologie, physiologie, taxonomie et phylogénie	43
1.2.1.	Caractéristiques morphologies et physiologiques	43
1.2.2.	Classification en race, biovars et écotypes	43
1.1.1.	Classification en phylotypes, clades et séquévars	47
1.1.2.	Classification en espèce génomique	49
1.2.	Structuration et plasticité du génome	50
1.3.	Les déterminants du pouvoir pathogène de <i>R. solanacearum</i>	51
1.3.1.	Les déterminants de la mobilité et de l'attachement	51
1.3.2.	Les exopolysaccharides et les biofilms	52
1.1.1.	Les enzymes extracellulaires (PCWDE)	53
1.1.2.	Le système de régulation dépendant de type <i>quorum sensing</i>	55
1.1.3.	Les différents systèmes de sécrétion	57
1.1.3.1.	Le Système de Sécrétion de Type 3 (SST3) et ses effecteurs.....	57
1.1.3.1.1.	Le SST3.....	57
1.1.3.1.2.	Les effecteurs de type III (ET3)	58
□	Rôles.....	58
□	Structure et fonctions.....	59
□	Les différentes familles d'effecteurs et leurs membres	59
1.1.3.1.3.	Répertoire d'ET3	61
□	Dynamique des répertoires des ET3	62

□ Répertoire complet	62
□ Core-effectome	63
□ Répertoire d'effecteurs et phénotypes	63
1.2. Stratégies de lutte contre <i>R. solanacearum</i>	64
1.2.1. Les différents types de lutte contre le flétrissement bactérien.....	64
1.2.2. La lutte génétique et la résistance à <i>R. solanacearum</i>	65
1.2.3. Sources et mécanismes de résistance à <i>R. solanacearum</i>	67
1.2.3.1. Chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
1.2.3.2. Chez <i>Medicago truncatula</i>	68
1.2.3.3. Chez les Solanacées à graines	69
1.2.3.3.1. Chez la tomate	69
1.2.3.3.2. Chez l'aubergine.....	69
1.2.3.3.3. Typologie de l'interaction Solanacées vs <i>R. solanacearum</i>	70
PROBLÉMATIQUE DE LA THÈSE	72
CHAPITRE 2 : DYNAMIQUE ÉVOLUTIVE D'UNE POPULATION PARCELLAIRE DE <i>R. SOLANACEARUM</i> SOUS PRESSIONS DE SÉLECTION.....	75
PARITE 2.1 : Mise au point d'un schéma MLVA permettant le suivi microévolutif d'une population parcellaire de <i>Ralstonia solanacearum</i> de phylotype I	77
1. Problématique.....	77
2. Méthodologie.....	78
3. Résultats et discussion.....	78
4. Conclusion.....	79
5. Publication.....	79
PARTIE 2.2 : La succession de cycles de culture d'aubergines sensibles (E8) et d'aubergines résistantes (E6) impacte fortement la structure génétique d'une population naturelle de <i>Ralstonia solanacearum</i> de phylotype I.....	127
1. Problématique.....	127
2. Méthodologie.....	128
3. Résultats et discussion.....	129
5. Publication.....	130
CHAPITRE 3 : RÔLE DE DIX EFFECTEURS DE TYPE TROIS DANS L'INTERACTION ENTRE <i>R. SOLANACEARUM</i> ET L'AUBERGINE RÉSISTANTE E6	175
PARTIE 3.1 : Détermination des répertoires d'effecteurs et analyses phylogénétiques	180
1. Matériel et méthodes	180
2. Résultats	184
3. Conclusion partielle.....	201
4. Publication.....	202

PARTIE 3.2 : Etude de la fonction d'avirulence des dix effecteurs candidats par mutagenèse et expression transitoire.....	207
1. Matériel et méthodes	207
2. Résultats	208
3. Conclusion partielle.....	209
PARTIE 3.3 : L'effecteur de type trois ripAX2 confère de l'avirulence à la souche GMI1000 de <i>Ralstonia solanacearum</i> sur l'aubergine (<i>Solanum melongena</i>) AG91-25 possédant le gène majeur de résistance Ers1	210
1. Résumé	210
2. Publication.....	210
CHAPITRE 4: DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	247
CHAPITRE 5 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	261
ANNEXES	287

SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Le modèle en zigzag illustrant le système immunitaire de la plante.....	4
Figure 2. Différents types de reconnaissance d'une protéine <i>avr</i> par une protéine R	7
Figure 3. Comparaison entre le modèle en zigzag et le modèle d'invasion	10
Figure 4. Vison de la réponse immunitaire par le modèle d'invasion lors de l'infection.....	10
Figure 5. Différents niveaux de la résistance non-hôte des plantes face aux agents pathogènes	12
Figure 6. Illustration de l'interaction de type « gène-pour-gène »	15
Figure 7. Principales classes de gènes de résistance des plantes.....	15
Figure 8. Stratégie de déploiement des résistances des plantes.....	17
Figure 9. Echelle du risque de contournement de la résistance.....	22
Figure 10. Représentation de la structure des populations bactériennes	28
Figure 11. Historique du développement des méthodes moléculaires.....	29
Figure 12. Notation des données MLST et assignation à un séquençotype (ST)	29
Figure 13. Deux des principaux modèles de mutation	33
Figure 14. Symptômes de flétrissement bactérien sur deux plantes modèles.....	38
Figure 15. Symptômes de flétrissement bactérien sur aubergine et tomate.....	38
Figure 16. Symptômes de la pourriture brune sur pomme de terre.....	38
Figure 17. Symptômes de jaunissement des feuilles sur <i>Anthurium</i>	38
Figure 18. Symptômes de la maladie de Moko sur bananier.....	38
Figure 19. Symptôme de flétrissement bactérien sur concombre.....	38
Figure 20. Répartition mondiale de <i>R. solanacearum</i> sur les 5 continents	40
Figure 21. Cycle infectieux de <i>R. solanacearum</i>	40
Figure 22. Phénotypes de <i>R. solanacearum</i> sur différents milieux de cultures.....	42
Figure 23. Gel d'électrophorèse type de diagnostic de <i>R. solanacearum</i> par PCR multiplex.....	45
Figure 24. Généalogie des phylotypes et des clades de <i>Ralstonia solanacearum</i>	46
Figure 25. Test de l'eau	52
Figure 26. Principales voies de régulation de la virulence chez <i>R. solanacearum</i>	54
Figure 27. Représentation schématique des six systèmes de sécrétion chez les bactéries	56
Figure 28. Représentation du système de sécrétion de type III chez <i>R. solanacearum</i>	56
Figure 29. Schéma représentatif de l'action de ripP2 dans la cellule végétale.....	66
Figure 30. Modèle d'interaction entre ripP2 et RRS-1.....	66
Tableau 1. Capacité des différents Biovars à dégrader les différents alcools et sucres.....	45
Tableau 2. Correspondance entre les différentes classifications de <i>R. solanacearum</i>	48
Tableau 3. Tableau représentatif des interactions entre la <i>core</i> -TEP et la <i>core</i> -Rs2.....	71

ABRÉVIATIONS

Unités de mesure

%	Pourcent
°C	Degré Celcius
µL	Microlitre
cm	Centimètre
F_{ST}/F_{IT}/F_{IS}	Statistique F de Wright
g	Gramme
H	Heure
I_A	Indice d' Association (<i>Index of association</i>)
Kb	Kilobases
m	Mètre
M	Molaire
Mb	Megabase
mL	Millilitre
N°	Numéro
N_a	Nombre d'haploype
Pb	Paire de base
RPM	Rotation Par Minute
UFC/CFU	Unité formant colonie (<i>Colony Forming Unit</i>)
V	Volt

Instituts et programmes de recherche

3P	Pôle de Protection des Plantes
AVRDC	<i>Asian Vegetable Research and Development Center</i>
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
EPPO/OEPP	<i>European and Mediterranean Plant Protection Organization / Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes</i>
FAO	Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (<i>Food and Agricultural Organisation</i>)
GENETOM	Programme « Génétique de la Tomate »
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
PRAM	Pôle de Recherche Agro-environnemental de la Martinique
PVBMT	Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
UE/EU	Union Européenne (European Union)
UMR	Unité Mix de Recherche
UPSUD	Université Paris Sud
VT	Ecole Polytechnique de Virginie (<i>VirginiaTech</i>)

Termes de biologie moléculaire

ADN/DNA	Acide Désoxyribonucléique (<i>Désoxyribonucléique Acide</i>)
AFLP	Analyse du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)
BET/EtBr	Bromure d'Ethidium (<i>Ethidium Bromide</i>)
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde

EDTA	<u>E</u> thylène <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid
H₂O	Eau
HGC/CGH	Hybridation génomique comparative (<u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization)
HPLC	<u>H</u> igh- <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
ITS	<u>I</u> nternal <u>T</u> ranscript <u>S</u> pacer
K.O	<u>K</u> nock- <u>O</u> ut
MgCl₂	Chlorure de magnésium
PBS	Phosphate Buffer Salin
PCR	Réaction en chaîne par polymérase (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PFGE	Electrophorèse en champs pulsé (<u>P</u> ulsed- <u>F</u> ield <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
RAPD	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphism <u>D</u> NA)
RAPD	Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (<u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphism <u>D</u> NA)
RFLP	Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<u>R</u> andom <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism)
RFLP	Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (<u>R</u> andom <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism)
SA	Acide Salicylique (<u>S</u> alicylique <u>A</u> cid)
SA	Acide Salicylique (<u>S</u> alicylique <u>A</u> cid)
SNP	Polymorphisme d'un seul nucleotide (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucléotide <u>P</u> olymorphism)
SNP	Polymorphisme d'un seul nucleotide (<u>S</u> ingle <u>N</u> ucléotide <u>P</u> olymorphism)
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TAE	Tris-Acétate-EDTA
T_m	Température de fusion (<u>T</u> emperature of <u>m</u> elting)
T_m	Température de fusion (<u>T</u> emperature of <u>m</u> elting)
UV	Ultraviolet
UV	Ultraviolet
VBNC	Viable mais non cultivable (<u>V</u> iable <u>B</u> ut <u>N</u> ot <u>C</u> ulturable)
VBNC	Viable mais non cultivable (<u>V</u> iable <u>B</u> ut <u>N</u> ot <u>C</u> ulturable)
VES (milieu)	Van Elsa Smalla (milieu)
VNTR	Variation du nombre de répétition en tandem (<u>V</u> ariable <u>N</u> umber of <u>T</u> adem <u>R</u> epetition)

Termes en interaction plante-microorganisme

Avr	<u>A</u> virulence
C-C	<u>C</u> oiled- <u>C</u> oil
Core-TEP :	<u>C</u> ore collection de cultivars de tomate-aubergine-piment (<u>T</u> omato- <u>E</u> ggplant- <u>P</u> epper)
cv.	cultivars
ECS	Domaine signal de l'endocytose cellulaire (<u>E</u> ndocytosis <u>C</u> ell <u>S</u> ignaling <u>d</u> omain)
EPS	<u>E</u> xopolysaccharides
ET3/T3E	Effecteur de Type III (<u>T</u> ype <u>I</u> II <u>E</u> ffector)
EtHAn	<u>E</u> ffector- <u>t</u> o- <u>h</u> ost <u>A</u> nalyzer
ETI :	Immunité déclenchée par les effecteurs (<u>E</u> ffector- <u>T</u> riggred <u>I</u> mmunity)
ETS	Sensibilité liée aux effecteurs (<u>E</u> ffector- <u>T</u> riggred <u>S</u> usceptibilité)
flg22	<u>F</u> lagellin <u>22</u>
FLS2	<u>F</u> lagellin <u>S</u> ensitive <u>2</u>
FT/TF	Facteurs de transcription (<u>T</u> ranscription <u>F</u> actors)
Gène R	Gènes de résistance
HM1	<u>H</u> elminthosporium <u>c</u> arbonum toxin reductase enzym
HR	Réaction hypersensible (<u>H</u> ypersensitive <u>R</u> esponse)

Hrp	Gène associé à la pathogénicité et à la réaction hypersensible (<i>Hypersensitive response and pathogenicity</i>)
IP	Motif d'invasion (<i>Invasion Pattern</i>)
IPR	Récepteurs des motifs invasifs (<i>Invasive Pattern Receptors</i>)
IPTRs	Défenses immunitaires de la plante déclenchée par les motifs invasifs (<i>IP-triggered responses</i>)
LPS	Lipopolysaccharides
LRR	Répétition riche en leucine (<i>Leucine-Rich-Repeats</i>)
MAPK	Protéines kinases (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
MLSA	Analyse de séquences multilocus (<i>MultiLocus Sequence Analysis</i>)
MLST	Analyse des séquences de typage (<i>MultiLocus Sequence Typing</i>)
NBS	Site de liaison aux nucléorides (<i>Nucleotide Binding Site</i>)
NLS	Signal de localisation nucléaire (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
NPB	Non Pathogène de la Banane (<i>Not Pathogen on Banana</i>)
PAMP/MAMP	Motifs moléculaires associés à l'agent pathogène (<i>Pathogen/Microbial - Associated-Molecular Patterns</i>)
PCWDE	Enzyme de dégradation des parois cellulaire végétales (<i>Plant Cell Wall Degradation Enzyme</i>)
PEST	Domain de dégradation des protéines (proline-glycine-serine-threonine)
PGILPs	Polygalacturonases
PRRs	Récepteurs de reconnaissance de motifs (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PTI/MTI	Immunité déclenchée par les PAMPs/MAMPs (<i>PAMPs/MAMPs-Triggered Immunity</i>)
pv.	Pathovar
PVY	Virus Y de la pomme de terre (<i>Potato Virus Y</i>)
RILs	Lignées recombinants (<i>Recombinant Imbreed Lines</i>)
RLKs	Récepteur de type kinase (<i>Receptor Like Kinase</i>)
ROS	Espèce réactive de l'oxygène (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPS4	Resistant to <i>Pseudomonas syringae</i> 4
RRS1	Resistance to <i>Ralstonia solanacearum</i>
RTBV	Maladie de Tungro du riz (<i>Rice Tungro Bacilliform Virus</i>)
sp.	Espèce (<i>species</i>)
SSM	Glissement de la polymérase pendant la réplication (<i>Slipped Strand Mismatching</i>)
SST1/T1SS	Système de sécrétion de type I (<i>Type I Secretion System</i>)
SST2/T2SS	Système de sécrétion de type II (<i>Type II Secretion System</i>)
SST3/T3SS	Système de Sécrétion de Type III (<i>Type III Secretion System</i>)
SST3/T3SS	Système de sécrétion de type III (<i>Type III Secretion System</i>)
SST4/T4SS	Système de sécrétion de type IV (<i>Type IV Secretion System</i>)
SST5/T5SS	Système de sécrétion de type V (<i>Type V Secretion System</i>)
SST6/T6SS	Système de sécrétion de type VI (<i>Type VI Secretion System</i>)
ST	Sequençotype (<i>Sequence Type</i>)
TEP	Tomate-Aubergine-Poivron (<i>Tomato-Eggplant-Pepper</i>)
TIR	Récepteur de type Toll (<i>Toll-Interleukin1-Receptor</i>)
TMV	Virus de la mosaïque du tabac (<i>Tobacco Mosaic Virus</i>)
TrD	Domain Transmembranaire (<i>Transmembrane domain</i>)
vir	Virulence
WRKY	Domaine d'acides amines

Termes de génétique

AMOVA	Analyse de la <u>V</u> ariance <u>M</u> oléculaire (<i>Analysis of <u>M</u>olecular <u>V</u>ariance</i>)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC	Complexe <u>C</u> lonaux (<i><u>C</u>lonal <u>C</u>omplex</i>)
DL/LD	<u>D</u> éséquilibre de <u>L</u> iaison (<i><u>L</u>inkage <u>d</u>esequilibrium</i>)
DLV	<u>D</u> ouble <u>L</u> ocus <u>V</u> ariant
GSM	Modèle de mutation pas à pas généralisé (<i><u>G</u>eneralized <u>S</u>tepwise <u>M</u>utation model</i>)
IAM	Modèle en nombre infini d'allèles (<i><u>I</u>nfinite <u>A</u>llele <u>M</u>utation model</i>)
KAM	Modèle à k-allèles (<i><u>K</u>-<u>A</u>llele <u>M</u>odel</i>)
LG	Groupe de liaison (<i><u>L</u>inkage <u>G</u>roup</i>)
MASH	Homoplasie de taille moléculairement accessible (<i><u>M</u>olecularly <u>A</u>ccessible <u>S</u>ize <u>H</u>omoplasly</i>)
MLG	Génotype multi-locus (<i><u>M</u>ulti <u>L</u>ocus <u>G</u>enotyping</i>)
MLVA	Analyse multi-locus des répétitions en tandem (<i><u>M</u>ulti <u>L</u>ocus <u>V</u>NTR <u>A</u>nalysis</i>)
MST	Minimum Spanning Tree
QTLs	Loci à caractère quantitatif (<i><u>Q</u>uantitative <u>T</u>rait <u>L</u>oci</i>)
R_{ST}	Statistique de Slatkin
SLV	Single Locus Variant
SMM	Modèle de mutation pas à pas (<i><u>S</u>tepwise <u>M</u>utation <u>M</u>odel</i>)
TPM	Modèle de mutation en 2 phases (<i><u>T</u>wo <u>P</u>hases <u>M</u>odel</i>)

Autres

Coll.	Collaborateur(s)
ND/NA	Non disponible (<i><u>N</u>ot <u>A</u>vailable</i>)
NS	Non significatif (<i><u>N</u>ot <u>s</u>ignificant</i>)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aujourd'hui, notre planète compte 6,8 milliard d'êtres humains dont 860 000 souffrent de malnutrition. D'ici 2050, la FAO (Food and Agricultural Organisation) prévoient que la population mondiale dépassera 9 milliards d'êtres humains. Nourrir l'humanité apparaît alors comme l'un des enjeux majeurs de notre société actuelle. Une des pistes proposées pour pérenniser la sécurité alimentaire est l'augmentation de la productivité des cultures agricoles. Cependant l'agriculture est tributaire du changement climatique qui est notamment en train de créer des conditions propices au développement des ravageurs et des maladies des plantes dans de nouvelles régions. L'amélioration des plantes apparaît comme l'un des leviers pour atteindre les objectifs de productivité, de qualité des produits récoltés et transformés, et de résistance aux différentes contraintes biotiques. Parallèlement, elle permet aussi la mise en place de nouvelles pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement et de la santé des consommateurs, et également d'adapter le matériel végétal à des conditions agro-climatiques variées et changeantes. Les maladies limitant fortement le potentiel de rendement et la qualité des produits agricoles, la recherche de résistances à ces maladies est donc une des préoccupations majeures du sélectionneur et du phytopathologiste. La résistance durable à une maladie est devenue un trait d'intérêt agronomique de première importance qui s'oppose à la capacité d'évolution et d'adaptation génétique des agents pathogènes. Il s'agit de limiter au maximum les risques de contournement des facteurs génétiques de résistance dans les variétés, en trouvant la meilleure stratégie de déploiement spatio-temporel des cultivars résistants pour maximiser la durabilité de la résistance. Initialement, la durabilité de la résistance était définie comme la période séparant l'introduction d'un cultivar résistant dans un agroécosystème et le moment où la fréquence de génotypes virulents atteint un seuil au-delà duquel la résistance est considérée comme « contournée » [2]. Toutefois, il est également possible de prédire cette durabilité en étudiant la biologie de l'agent pathogène considéré, plus particulièrement sa dynamique évolutive ainsi que des bases moléculaires régissant l'interaction entre ce pathogène et son hôte (gène d'avirulence vs gène *R* par exemple).

L'introduction bibliographique que je propose ici se focalisera dans un premier temps sur les bases moléculaires de l'interaction entre une plante hôte et son agent pathogène. Dans cette première partie, je détaillerai les grands concepts qui régissent la coévolution entre la plante hôte et son pathogène. Je présenterai ensuite les différents types de résistances des plantes et leurs impacts sur cette coévolution, avant d'aborder les stratégies de déploiement de ces résistances, et les différentes mesures de la durabilité. Dans un second temps, je m'intéresserai au potentiel évolutif de l'agent pathogène comme estimateur de la durabilité de la résistance. Je discuterai des facteurs influençant cette dynamique évolutive et des outils disponibles pour l'étudier. J'exposerai dans un dernier temps le pathosystème que j'ai étudié en me focalisant sur la biologie, la dynamique évolutive et les déterminants du pouvoir pathogène de *R. solanacearum*. Je terminerai par exposer l'intérêt de cette bactérie en tant que modèle d'étude des interactions plantes-microorganismes.

CHAPITRE 1 :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE
ET PROBLEMATIQUE DE LA
THÈSE

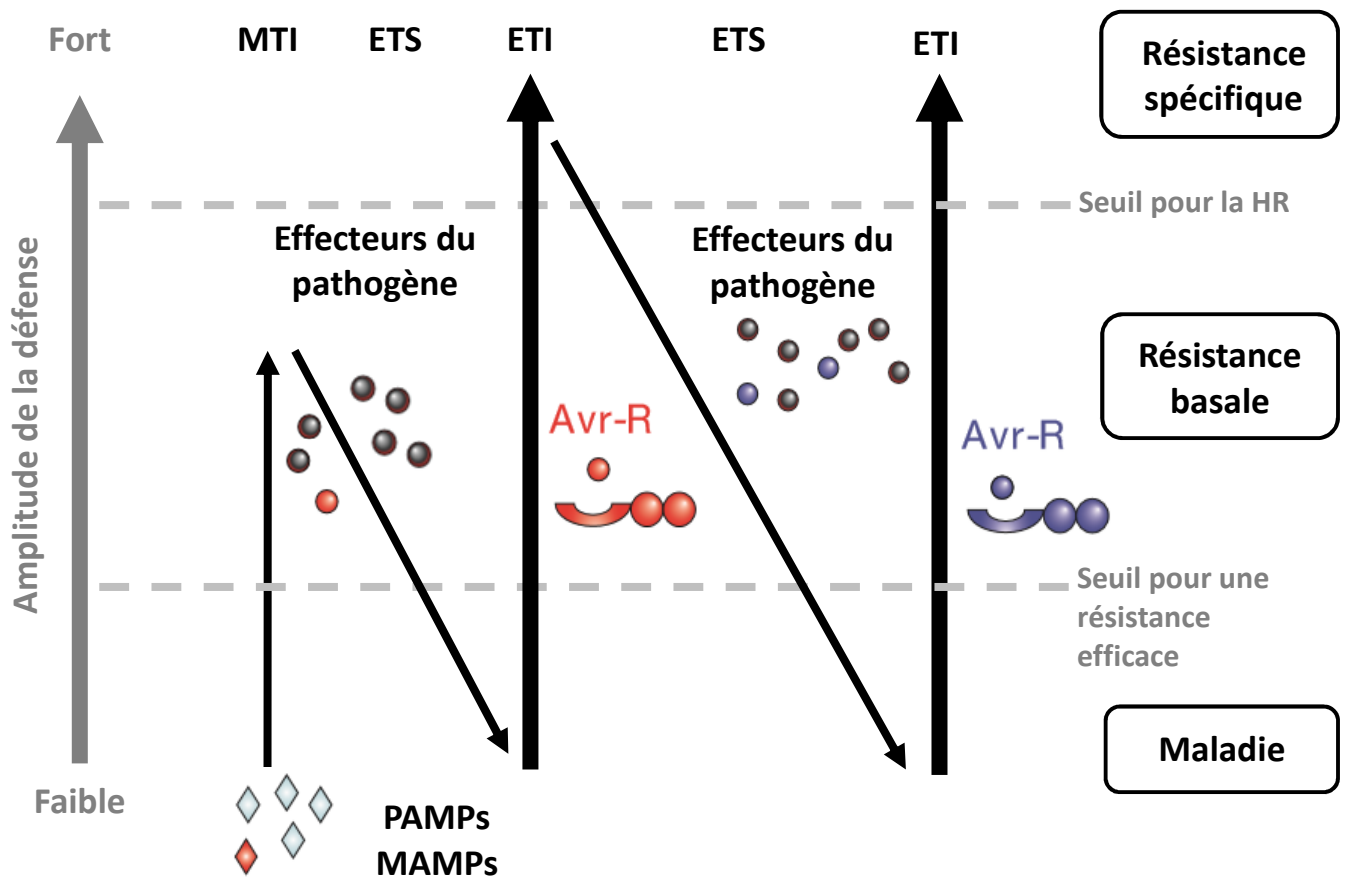


Figure 1. Le modèle en zigzag illustrant le système immunitaire de la plante. Phase 1 : la plante détecte les MAMPs/PAMPs (« Microbe/Pathogen Associated Molecular Pattern » ; diamants rouges) via les récepteurs PRRs (« Pathogen Related Receptor ») pour déclencher la MTI/PTI (« MAMPs/PAMPs-Triggered Immunity »). **Phase 2 :** le pathogène va délivrer des effecteurs qui vont interférer avec la MTI/PTI ou qui vont permettre sa nutrition et sa dispersion, résultant en une sensibilité nommée ETS (« Effector-Triggered Susceptibility »). **Phase 3 :** un effecteur (indiqué en rouge) est reconnu par une protéine de résistance de type NBS-LRR (« Nucleotid Binding Site–Leucin Rich Repeat ») activant l’ETI (« Effector-Triggered Immunity »), une résistance de niveau plus fort que la MTI/PTI permettant la mise en place de la réaction hypersensible ou HR (« Hypersensitive Response »). **Phase 4 :** les agents pathogènes ayant perdu l’effecteur reconnu (en rouge) ou ayant acquis un nouvel effecteur par transfert horizontal (en bleu) sont sélectionnés, capables de supprimer l’ETI. La co-évolution va alors sélectionner les plantes présentant un nouvel allèle NBS-LRR capable de reconnaître l’un des effecteurs néo-acquis, ce qui résultera en une nouvelle ETI. L’amplitude de la résistance est proportionnelle à [PTI – ETS+ETI]. D’après [3].

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Bases moléculaires de l'interaction hôte-pathogène

1.1. Interaction moléculaire entre un hôte et son pathogène

L'ensemble de la communauté scientifique s'accorde à dire que la réponse immunitaire des plantes aux agents pathogènes s'effectue en quatre phases [3]. Cependant, ce modèle a comporté un certain nombre de limites, et a été récemment remis en question [4, 5].

1.1.1. Le modèle de Jones et Dangl (2006)

1.1.1.1. Reconnaissance des motifs moléculaires associés aux microorganismes

L'agent pathogène produit naturellement des molécules constitutives appelées MAMPs ou PAMPs. Ces molécules sont très conservées et présentes chez l'ensemble des microorganismes, elles sont le plus souvent impliquées dans la physiologie de l'organisme. Les principaux MAMPs/PAMPs décrits jusqu'à présent sont d'origines diverses : elles peuvent par exemple être associées au flagelle des bactéries phytopathogènes (par ex. flg22) [6], être un composant de la membrane externe des bactéries (lipopolysaccharides ou LPS, chez les bactéries gram-négatives) [7], ou encore provenir du cytoplasme des agents pathogènes (facteur d'élongation EF-Tu) [8]. Les MAMPs/PAMPs sont donc intrinsèquement difficiles à modifier et/ou à supprimer. Lors de la **première phase** de l'interaction entre un agent phytopathogène et sa plante hôte, les MAMPs/PAMPs sont reconnus par des récepteurs de la plante appelés PRRs (« Pathogenesis Recognition Receptors »). Cette reconnaissance, nommée PTI/MTI (« PAMPs/MAMPs Triggered Immunity »), déclenche une cascade de signalisation induisant des réactions de défense dite « défense basale » de la plante. Ces réactions incluent le dépôt de callose [9] et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (également appelés ROS pour « Reactive Oxygen Species ») [10] dont le but final est d'inhiber la colonisation de l'hôte par le pathogène.

L'un des cas les plus étudiés illustrant ce mécanisme est celui du PAMP flg22, un épitope du flagelle bactérien [6]. Le flagelle est une structure déterminante pour la mobilité des bactéries et donc pour la pathogénicité bactérienne. La plupart des plantes reconnaissent un épitope conservé de 22 aminoacides présent en position N-terminal sur le flagelle [10]. Le récepteur responsable de la reconnaissance chez *Arabidopsis thaliana*, nommé Flagelin-Sensing 2 (FLS2), possède un motif extracytoplasmique riche en leucine (eLRR), un domaine transmembranaire et un domaine de type sérine-thréonine kinase [6, 11]. FLS2 reconnaît spécifiquement flg22 [6] puis se lie avec la protéine adaptatrice BAK1 *via* une interaction type ligand-récepteur [12, 13], et s'attache finalement avec d'autres récepteur RLKs [14]. La reconnaissance de flg22 induit des réponses immunitaires telles que la production de ROS, la phosphorylation et l'activation de protéines kinases (« Mitogen-Activated Protein Kinases » [MAPKs]) ainsi que des changements transcriptionnels [15-17]. Des orthologues

fonctionnels de FLS2 ont été identifiés chez *Nicotiana tabacum* [13] ainsi que chez *Solanum lycopersicum* [18].

Des travaux récents ont montré que les MAMPs n'étaient pas forcément sous pression de sélection diversifiante et que leur évolution était plus rapide qu'initialement prédit par le modèle en zig-zag [19]. En effet, les MAMPs ont initialement été décrits sur la base de leur degré de conservation entre les populations pathogènes, les mutations d'un MAMPs n'étaient par conséquent qu'occasionnellement identifiés entre microorganismes phylogénétiquement distants [19, 20]. Ainsi il a été démontré qu'une région du flagelle de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*), flgII-28, était sous sélection diversifiante et que ce domaine était un MAMPs important dans l'interaction *Pto* vs tomate [21]. Parallèlement, différents allèles de flgII-28 déclenchent une MTI variable en fonction de l'hôte fournissant un exemple de la diversification des MAMPs comme une stratégie de virulence du pathogène [19]. Ainsi la course à l'armement entre les MAMPs et les PRRs est déterminée à la fois par la présence/absence et par diversification allélique des MAMPs et des PRRs, tout comme la course à l'armement entre les ET3 et les gènes *R* [19].

1.1.1.2. Coévolution hôte-pathogène : la sensibilité médiée par les effecteurs (ETS pour « Effector Triggered Susceptibility »)

En réponse aux défenses immunitaires des plantes, les agents pathogènes ont évolué afin de déployer des molécules nommées « effecteurs » capables de subvertir les défenses basales mises en place lors de la PTI ; c'est la **deuxième phase** de l'interaction [22, 23]. Les effecteurs sont des protéines ou des composés bactériens sécrétés à l'intérieur des cellules ou dans l'espace intercellulaire (l'apoplaste) de la plante-hôte, modifiant ainsi le fonctionnement ou la structure des cellules végétales [24]. L'action des effecteurs est ambivalente : ils altèrent les fonctions cellulaires pour faciliter l'infection par l'agent phytopathogène (facteurs de virulence et toxines) mais peuvent aussi déclencher les défenses immunitaires de la plante si un ou plusieurs de leur domaine protéique sont détectés par la plante (facteurs d'avirulence et éliciteurs) [25, 26]. C'est notamment le cas de l'effecteur *AvrBs3* dont un domaine est spécifiquement reconnu (*avr*) tandis qu'un autre contribue à la virulence [27]. Alors que certains effecteurs sont reconnus par le système immunitaire de la plante, d'autres effecteurs sont capables de supprimer la réaction hypersensible déclenchée par certaines protéines *avr* [24].

Ainsi, à l'issue de cette phase de l'interaction, soit la plante est sensible et les effecteurs vont permettre à l'agent phytopathogène de continuer l'interaction avec la plante hôte (« Effector Triggered Susceptibility » [ETS]), soit la plante est résistante et synthétise des protéines de défense nommées protéines de résistance (ou protéines R) reconnaissant spécifiquement les effecteurs.

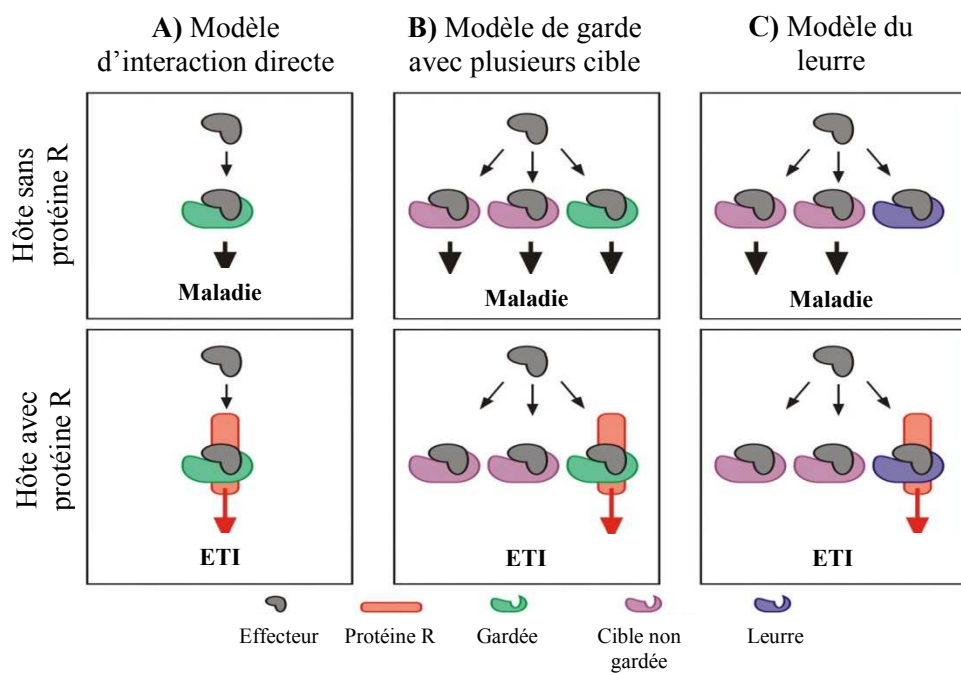


Figure 2. Représentation des différents types de reconnaissance d'une protéine *avr* par une protéine R. (A) Modèle direct de reconnaissance (B) Modèle de garde où les effecteurs ont plusieurs cibles végétales (C) modèle du leurre. D'après [28].

1.1.1.3. Les réponses de défense spécifiques (ETI pour « Effector Triggered Immunity»)

La plupart des protéines de résistance possèdent un domaine de liaison à l'ADN de type NBS (« Nucleotide Binding Site ») ainsi qu'un domaine composé de répétitions riches en Leucine (Leucine-Rich-Repeat, LRR) [3, 29, 30]. Lors de la **troisième phase** de l'interaction les effecteurs sont spécifiquement reconnus par les protéines de résistance (codées par des gènes *R*) qui déclenchent une réaction de défense immunitaire, l'ETI (Effector Triggered Immunity), plus intense et plus rapide que la PTI. Cette réaction est souvent caractérisée par la réaction hypersensible (HR) au niveau du site d'infection [31], assimilable à la mort cellulaire programmée chez les animaux et les humains [3]. Les premiers modèles décrivant une interaction gène *R* vs gène *avr* proposèrent une interaction directe de type protéine-protéine, ou ligand-récepteur [32] (**Figure 2.A**). Cette interaction directe a été démontrée de façon expérimentale pour seulement quelques modèles : entre *Magnaporthe grisea* et *Oryza sativa* (gène d'avirulence *AVR-Pita* vs gène de résistance *Pi-ta* [33]) ; entre *Ralstonia solanacearum* et *Arabidopsis thaliana* (gène d'avirulence *ripP2* vs gène de résistance *RRS1-R* [34]) ; entre *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et la tomate (gène d'avirulence *AvrPto* vs gène de résistance *Pto*) ; entre *Melampsora lini* et le lin (gène d'avirulence *AvrL567* vs gènes de résistance *L5*, *L6* et *L7* [35]) ; ou encore entre le virus de la mosaïque du tabac (« Tobacco Mosaic Virus » [TMV]) et *Nicotiana tabacum* (gène *p50* vs gène de résistance *N* [36]). Cependant, pour certains modèles, une telle interaction directe n'a pas pu être observée, comme l'illustre le cas du gène de résistance *Cf-9* chez la tomate et le gène d'avirulence correspondant (*AVR9*) chez *Cladosporium fulvum* [37]. Face au manque de données sur les interactions directes, une nouvelle hypothèse a été formulée suggérant qu'une interaction gène-à-gène implique plus de deux gènes chez la plante. Le « modèle de garde » [38] propose que les protéines *avr* ne seraient pas les cibles directes des protéines R mais qu'une troisième molécule serait impliquée. Une première protéine de résistance agirait en tant que « gardien » en protégeant une deuxième molécule (ou molécule « gardée ») ciblée par l'effecteur, ce qui déclencherait les réactions de défense de la plante lorsque la cible est modifiée (**Figure 2.B**). Un autre modèle a été proposé pour l'interaction effecteur-protéine de résistance : le modèle du leurre (**Figure 2.C**). Une molécule de la plante, surveillée par une protéine R, mimerait la cible d'un effecteur afin de piéger l'effecteur et de déclencher les réponses de la plante lors de la perception du pathogène. Contrairement au modèle de garde, la manipulation de la cible en l'absence de la protéine R ne contribue pas à la *fitness* bactérienne.

Cette reconnaissance par la plante ainsi que la stratégie d'évitement de la reconnaissance par l'agent pathogène illustrent une longue coévolution entre les agents pathogènes et leurs plantes hôtes, comparable à une « course à l'armement » (ou « *arm race* ») [39].

Durant la **quatrième phase** de l'interaction, la pression de sélection imposée par les gènes de résistance va favoriser soit la mutation, voire la délétion de l'effecteur reconnu par la plante, soit des réarrangements intra-génétiques par recombinaison, soit la synthèse de nouveaux effecteurs ; le but final étant d'éviter une reconnaissance par les protéines de résistance. La population d'agents pathogènes devient alors hautement virulente avec ce nouvel allèle. La résistance perd alors son efficacité car elle ne permet plus de contrôler l'agent pathogène, et par conséquent son intérêt économique car celui-ci menace de décimer la culture en place [40]. Toutefois, l'augmentation de la virulence d'un agent pathogène va également entraîner de nouvelles spécificités des gènes de résistance de la plante-hôte, permettant à l'ETI de fonctionner à nouveau [3]. Si la réponse ETI est remise en place, l'agent pathogène sera reconnu, ce qui va exercer une nouvelle pression de sélection pour contourner la résistance néo-acquise.

1.1.2. Le modèle d'invasion de Cook, Mesarich et Thomma (2015)

Dans le modèle d'invasion [5], les récepteurs de la plante hôte, nommés récepteurs des motifs invasifs (IPR pour « Invasive Pattern Receptors »), détectent un ligand externe ou un ligand auto-modifié indicateur de l'invasion, appelé motif d'invasion (IP pour « Invasion Pattern », **Figure 3B**). Toutes les molécules peuvent être des IPs et peuvent être potentiellement reconnues par des IPRs. Cette probabilité de reconnaissance augmente avec les contraintes moléculaires pour conserver une fonction, la conservation de l'IP entre les organismes, son accessibilité et son importance dans l'interaction [5]. Ces IPs regroupent les MAMPs et les DAMPs précédemment mentionnés, ainsi que les molécules gardées modifiées [41, 42]. Les IPRs restent efficaces du moment où ils continuent à reconnaître la présence des pathogènes et élicitent une réponse immunitaire appropriée. Le modèle d'invasion différencie les IPs et les molécules conduisant à IP. En effet, certaines molécules telles que la flagelline, le facteur d'élongation EF-Tu, et la chitine contiennent des molécules perçues par l'hôte mais sont initialement impliquées dans la physiologie de l'organisme [6]. Il en est de même pour la pectine qui, une fois dégradée en oligogalacturonide, est un IP. Certaines molécules synthétisées par les agents pathogènes favorisent initialement l'infection (PCWDE, effecteurs TALs, phosphatase, toxines etc.) mais peuvent aussi contenir ou produire des IPs.

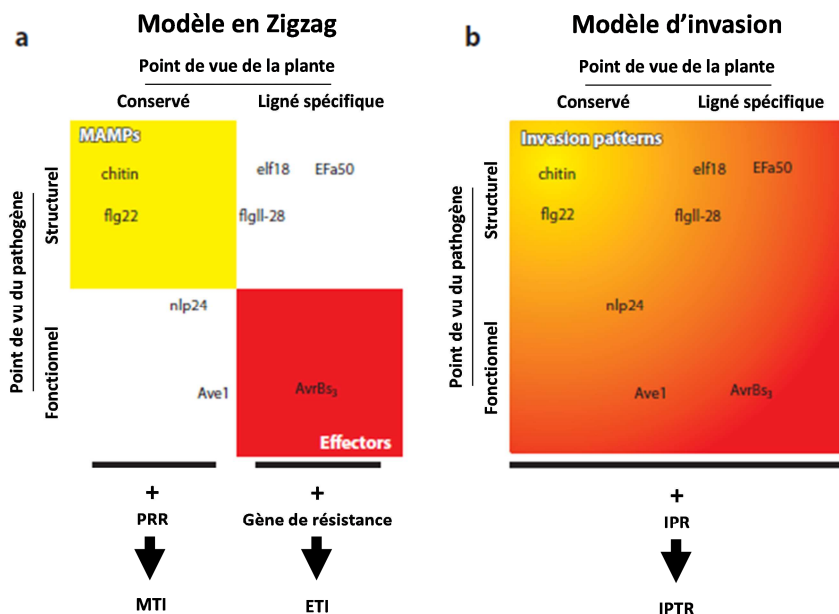


Figure 3. Comparaison de la vision de l'interaction plante-microorganisme entre le modèle en zigzag [3] et le modèle d'invasion [5]. (a) le modèle en zigzag est défini en terme strict. La plante perçoit (i) les MAMPs/PAMPs (carré jaune) grâce aux PRRs, conduisant à la MTI/PTI et (ii) les effecteurs (carré rouge) grâce aux protéines R, conduisant à l'ETI. Les axes du « point de vue de la plante » et du « point de vue de l'agent pathogène » définissent les caractéristiques les plus communes aux molécules impliquées dans l'interaction. Quelques exemples de molécules perçues apparaissent illustrant le fait que certaines d'entre elles ne sont pas représentées de façon optimale dans ce schéma. (b) Le modèle d'invasion est représenté de façon similaire excepté que les molécules immunogènes sont représentées dans un continuum afin de respecter l'appartenance de ces molécules et des réponses associées à différentes catégories (réponse, signalisation etc.). Le ligand ici est défini comme un motif d'invasion (IPs pour « Invasion Pattern »), reconnu par les récepteurs de la plante (IPRs pour « IP Receptors ») conduisant aux réponses IP dépendantes (IPTRs pour « IP-Triggered Responses »). D'après [5].

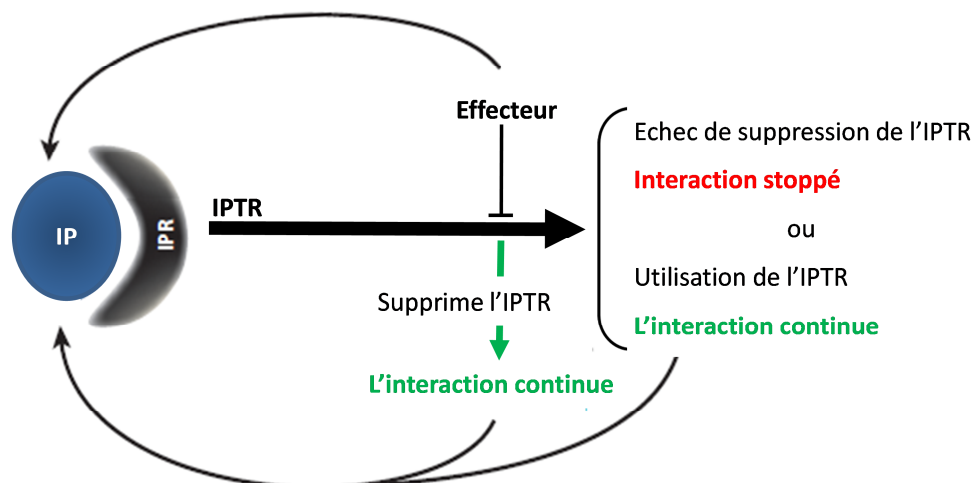


Figure 4. Vision de la réponse immunitaire par le modèle d'invasion lors de l'infection par un agent pathogène. Lors de l'infection, les motifs d'invasion (IPs) sont perçus par les récepteurs de la plante (IPRs) suscitant une réponse IPs dépendante (IPTRs). Les agents pathogènes peuvent utiliser des effecteurs pour influencer l'interaction mais si le pathogène ne réussit pas à manipuler l'IPTR, l'interaction s'arrête. Potentiellement, l'IPTR peut être supprimée (par exemple par les organismes biotrophes) ou utilisée (par exemple par les organismes nécrotrophes) pour continuer l'interaction. La suite de l'interaction ainsi que l'utilisation des effecteurs peut générer la perception des IPs par l'hôte conduisant à l'IPTR. Les événements multiples de reconnaissance et les stratégies d'invasion de l'agent pathogène influencent l'IPTR et éventuellement résultent en la fin ou la continuation de l'interaction. D'après [5].

Les IPs une fois reconnus activent les défenses immunitaires de la plante (IPTRs pour « IP-triggered responses ») conduisant à un arrêt de l'interaction ou à une continuation de l'infection (**Figure 4**). Ces deux événements sont médiés par trois mécanismes définis selon le « point de vue » du pathogène : (1) l'échec de la suppression de l'IPTR, (2) la suppression de l'IPTR ou (3) l'utilisation de l'IPTR. Les agents pathogènes peuvent utiliser les effecteurs pour manipuler la réponse de l'hôte et donc pour influencer l'issue de l'interaction. Les effecteurs peuvent cependant devenir des IPs et être reconnues par les IPRs, déclenchant continuellement les défenses de la plante, et peuvent conduire à l'arrêt et ou la continuité de l'interaction.

1.2. Résistance des plantes aux bio-agresseurs

La résistance des plantes aux bioagresseurs peut être définie selon trois critères établis par [43]. Le premier critère est le niveau (où l'efficacité) de la résistance, c'est-à-dire si la résistance est de type qualitative (totale) ou quantitative (partielle). Le deuxième critère est la spécificité d'hôte de cette résistance, à savoir si la résistance est à large spectre (résistance « horizontale », par exemple à plusieurs phylotypes dans le cas de *R. solanacearum*) ou si la résistance est phylotype/race/souche-spécifique (résistance « verticale »). Le dernier critère, la durabilité de la résistance, reste une notion assez complexe qui n'était, jusqu'à récemment, évaluée que lorsque cette résistance se trouvait contournée [1].

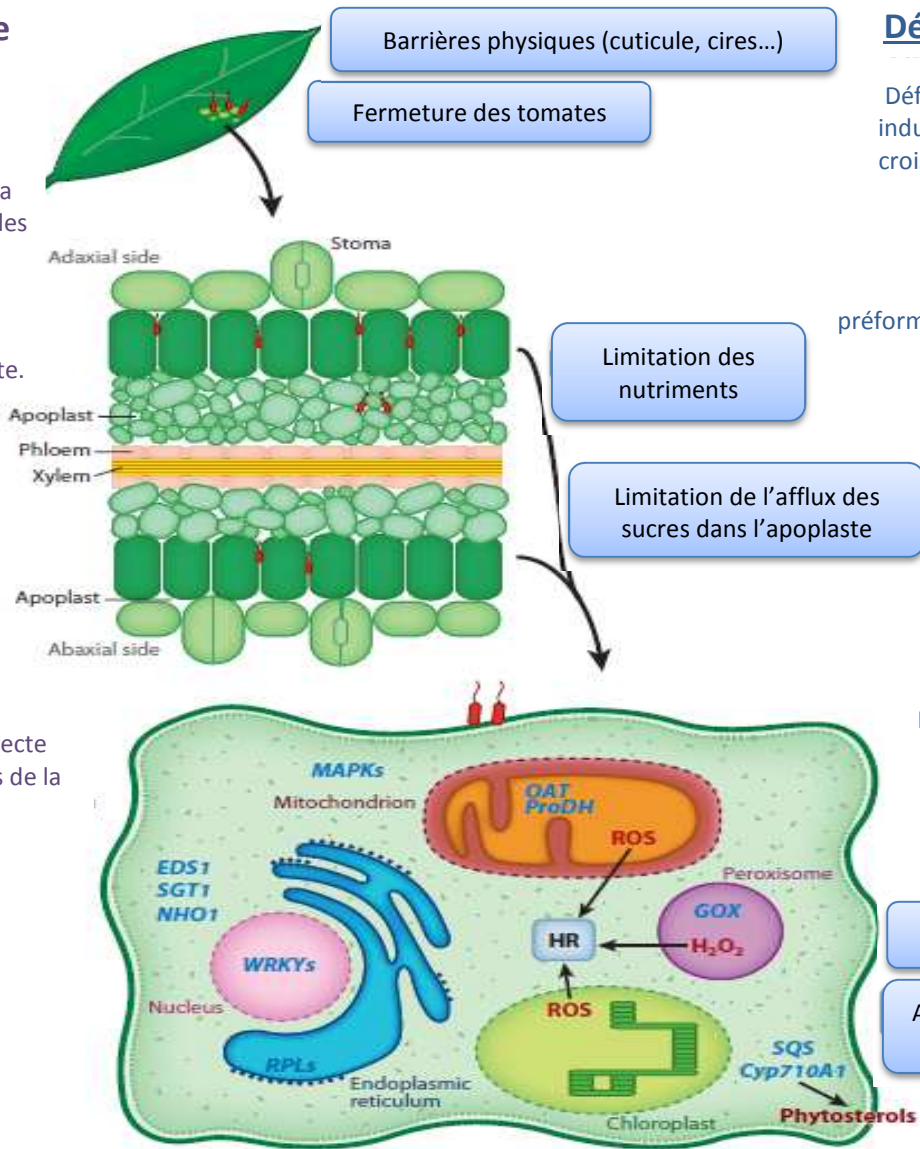
La résistance d'une plante se caractérise par sa capacité naturelle à stopper ou limiter le développement d'un agent phytopathogène. C'est en 1948 que Flor [44] à en premier lieu étudié simultanément la génétique de l'agent pathogène et celle de sa plante hôte. Peu de temps après, Van Der Plank [45], en 1963 a formalisé les interactions plante/microorganisme avec la description des différents types de résistance. Il émet le concept que, d'une manière générale, la plupart des plantes sont résistantes à la plupart des microorganismes phytopathogènes (interaction incompatible [45]). Ainsi, seuls quelques agents pathogènes sont capables d'infecter et de provoquer une maladie sur une plante (interaction compatible [46]). Dans ce cas d'interaction compatible et, afin de faire face efficacement aux infections des agents pathogènes, les plantes ont développé un système immunitaire dynamique composé de différentes couches du système immunitaire, illustré notamment par le système en zig-zag de [3] décrit précédemment. Plusieurs types de résistance ont été définis en fonction des caractéristiques intrinsèques de celle-ci qui, bien souvent, se recoupent. Ainsi, une résistance sera « monogénique » ou « polygénique » en fonction du nombre de gènes de résistance et/ou de QTLs (Quantitatif Trait Loci) impliqués dans la résistance. Une résistance sera qualifiée de « qualitative » ou « quantitative » en fonction de l'intensité de la résistance de la plante (totale ou partielle). Une résistance sera « hôte » (= spécifique) ou « non hôte » (= non spécifique) en fonction de sa spécificité d'hôte ainsi que de la nature des interactions plantes-microorganismes.

Pathogène

Le pathogène entre par les ouvertures naturelles de la plante ou par les blessures.

Multiplication dans l'apoplaste.

Interaction directe avec les parois de la cellule.



Défenses des plantes

Défenses préformées et induites pour contenir la croissance et l'entrée du pathogène.

Défenses induites et préformées pour contenir la croissance et la multiplication du pathogène.

Induction des défenses pour contenir la croissance et la multiplication du pathogène.

Formation des papilles

Apposition de lignine et de callose

Figure 5. Différents niveaux de la résistance non-hôte des plantes face aux agents pathogènes. Lorsque les bactéries arrivent sur la surface foliaire, elles entrent dans l'apoplasme du mésophylle via les stomates ou des blessures. Après avoir eu accès au fluide apoplastique, les bactéries manipulent les cellules végétales afin qu'elles libèrent plus de nutriments permettant aux bactéries de se multiplier et éventuellement de causer de la maladie. Cependant, à cause de la résistance non hôte, tous les pathogènes ne peuvent accéder aux nutriments fournis par la plante. Le premier niveau de résistance des plantes se situe à la surface des feuilles et dans l'apoplaste, impliquant des barrières structurales préformées (cire, cuticules...) et induites (composés antibactériens). Les défenses inductibles sont mise en place lors de la perception des PAMPs et à un stade plus avancé de l'interaction lors de la reconnaissance des effecteurs bactériens. L'interaction directe entre le pathogène et les cellules de la plante initie la réaction hypersensible (HR) et/ou d'autres voies de défenses, conduisant à l'arrêt de la croissance bactérienne. D'après [47].

1.2.1. Résistance non-hôte ou résistance non-spécifique

Comme vu précédemment, la plupart des plantes sont résistantes à la plupart des agents pathogènes [48]. Dans ce cas précis, on parle de résistance non-hôte. Bien souvent, les résistances non-hôtes sont gouvernées par une large gamme de mécanismes régulés par de multiples gènes [49]. La résistance non-hôte est mise en œuvre à plusieurs niveaux lors de l'infection par un microorganisme [50] (**Figure 5**).

Le **premier niveau** de contrôle empêche le pathogène de pénétrer dans la plante grâce aux défenses préexistantes (constitutives) de la plante [51]. Ce niveau de contrôle se situe à l'interface entre l'hôte et son environnement, c'est-à-dire sur la surface des organes cibles (feuilles, racines, tiges, etc.). Ces défenses sont composées à la fois de barrières physiques (cire, cuticule, épiderme, stomates, parois cellulaires, etc.) et de barrières chimiques (composés antimicrobiens inhibant le développement des pathogènes telles que les phytoanticipines) [52]. Le **second niveau** de contrôle se déroule une fois que l'agent pathogène a pénétré dans la région apoplastique afin d'y extraire les nutriments issus du métabolisme carboné [53]. Cette étape implique elle aussi des défenses préexistantes couplées à des défenses induites telles que l'apposition de callose, lignine et subérine ou la synthèse *de novo* de composés chimiques (phytoalexines) [54-56]. Le **troisième niveau** de contrôle se situe au niveau cellulaire et implique uniquement des défenses inductibles déclenchées spécifiquement par le cytosol, le noyau, la membrane plasmique ou la paroi végétale. S'ajoutent aux défenses préformées et inductibles, la perception de PAMPs (« Pathogen Associated Molecular Patterns »), renommés MAMPs (« Microbe Associated Molecular Patterns ») [57], d'effecteurs et d'autres molécules de réponses qui seront plus amplement détaillées [15, 58]. L'additivité des défenses naturelles de la plante font de cette résistance un obstacle de taille à l'infection et la colonisation de la plante par l'agent pathogène [51].

1.2.2. Résistance hôte

Lorsque le pathogène a réussi à s'adapter et est capable de surmonter les barrières imposées par la résistance non-hôte, il se retrouve alors confronté à la résistance hôte. La résistance hôte est composée de la résistance cultivar-race spécifique, qui n'est efficace que vis-à-vis de certaines souches du parasite, et/ou de la résistance race-non-spécifique qui est efficace vis-à-vis de l'ensemble des souches connues du parasite [59].

1.2.2.1. La résistance hôte race-non spécifique

Ce type de résistance est, dans la plupart des cas, une résistance seulement partielle c'est-à-dire qui ne permet pas de contrôler totalement l'agent pathogène. Cette résistance est la résultante des effets additifs cumulés de plusieurs gènes à effet partiel (nommés également QTLs de résistance) [60], qui peuvent par ailleurs interagir entre eux de façon positive ou négative (effets épistatiques). Ce type de résistance, appelée encore résistance horizontale, est *a priori* plus durable qu'une résistance conférée par un gène majeur [61]. La raison étant principalement qu'un plus grand nombre de mutations sont nécessaires au pathogène pour contourner une résistance polygénique par rapport à une résistance monogénique [62].

De nombreuses études ont permis de démontrer le caractère quantitatif des résistances chez les plantes. Ce type de résistance se traduit par la diminution du nombre de symptômes, ce qui provoque chez l'agent pathogène une perte de performance sur une ou plusieurs composantes de son cycle de développement, allant de l'efficacité d'infection à la sporulation en passant par la période de latence. Cette résistance, qui permet en général de ralentir significativement une épidémie sans la stopper entièrement, peut néanmoins se révéler d'une efficacité presque totale quand plusieurs QTLs sont accumulés dans un même génotype, comme l'illustre le cas de la variété d'orge '17-5-16' vis-à-vis de *Puccinia hordei* [63]. Cependant, la sélection de telles résistances polygéniques est un processus plus long, plus lourd et plus coûteux que la sélection des résistances reposant sur des gènes majeurs dominants.

1.2.2.2. La résistance hôte cultivar-race spécifique

La résistance race-spécifique est souvent conférée par un gène majeur de résistance ou gène *R* [64, 65]. Les gènes impliqués dans ce type de résistance sont impliqués dans une relation dite « gène-à-gène » conceptualisée par Flor en 1971 [44] (**Figure 6**). Le produit d'un gène de résistance interagit avec le produit d'un gène d'avorulence issu du pathogène et déclenche une cascade de signaux, qui conduit à l'activation de réactions de défense de la plante. Cette reconnaissance s'accompagne classiquement d'une réaction hypersensible (HR) qui circonscrit le pathogène à son site primaire d'infection. Ainsi, un gène bactérien reconnu sera appelé gène d'avorulence (*avr*) tandis qu'un gène non reconnu sera nommé gène de virulence (*vir*). Lorsque la réaction incompatible se produit, elle confère à la plante une résistance totale à l'agent pathogène, empêchant celui-ci de se développer [66]. Cette résistance est cependant souvent considérée comme non durable dans la mesure où l'effet du gène *R* peut être neutralisé par la perte de fonction du gène d'avorulence correspondant chez l'agent pathogène par simple(s) mutation(s).

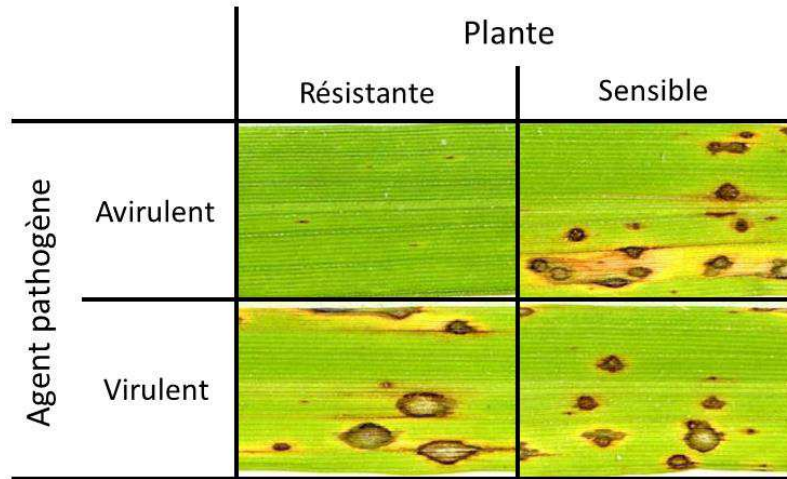


Figure 6. Illustration de l'interaction de type « gène-pour-gène ». Lorsque le gène dominant de résistance (gène *R*) est présent chez la plante hôte et que l'allèle d'avirulence (*Avr*) correspondant est présent chez l'agent pathogène, il y a reconnaissance et mise en place de la réaction hypersensible (HR). L'interaction est dite incompatible. La combinaison des autres allèles ne conduira pas à la mise en place des défenses de la plante et permettra le développement de la maladie. D'après [44]. Ce concept est illustré ici en utilisant le cas de l'interaction *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* sur le riz.

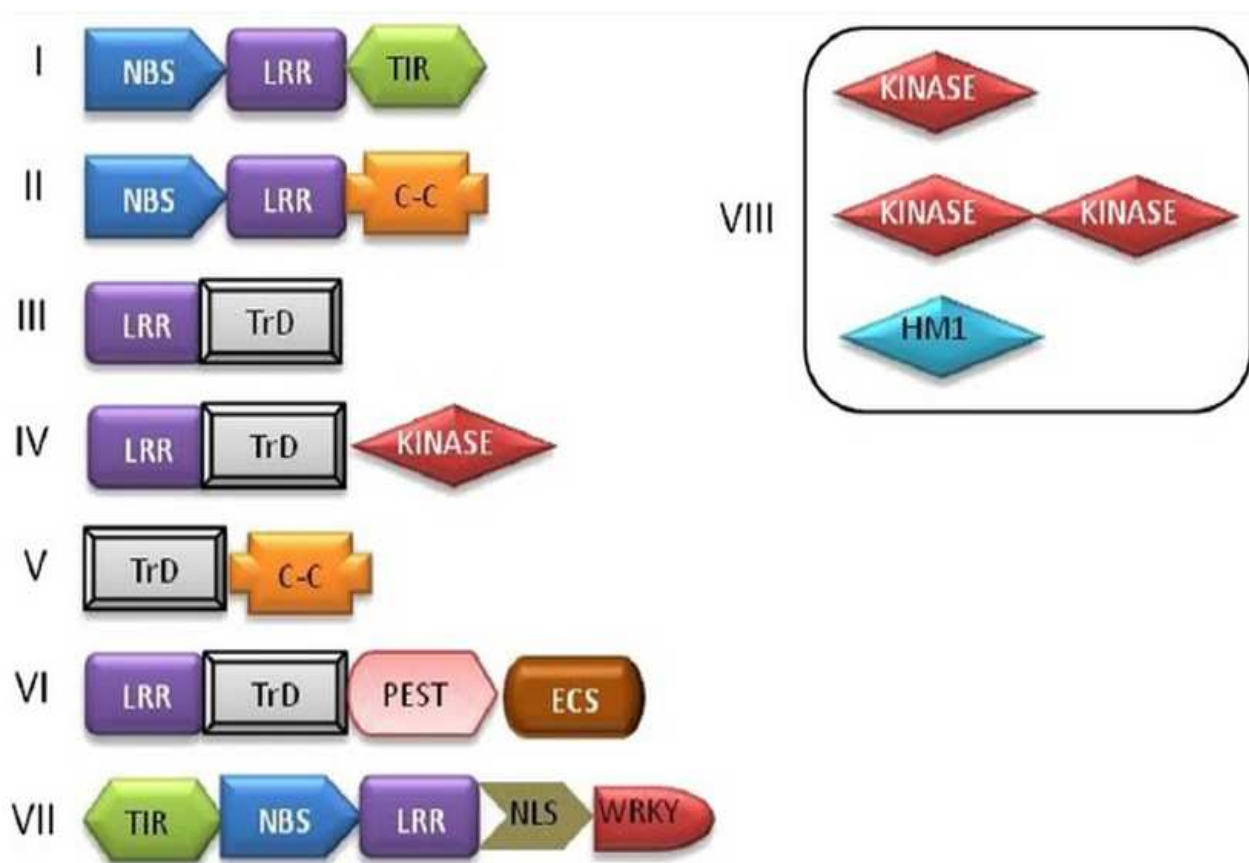
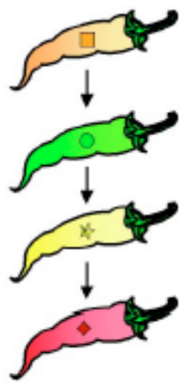


Figure 7. Principales classes de gènes de résistance des plantes basée sur l'arrangement de leur domaine fonctionnelle. Abréviations : LRR : Leucine-Rich Repeats ; NBS : Nucleotide-Binding Site ; TIR : Toll/Interleukin-1-Receptors ; C-C : Coiled Coil ; TrD : Transmembrane domain ; PEST : protein degradation Domain (proline-glycine-serine-threonine) ; ECS : Endocytosis Cell Signaling domain ; NLS : Nuclear Localization Signal ; WRKY : Amino acid domain ; HM1 : *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzym. D'après [67].

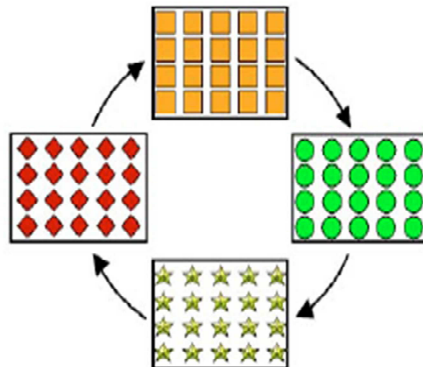
1.1.1.1. Les différentes classes de gènes de résistance

Les agents pathogènes capables de supprimer les défenses basales sont spécifiquement reconnus par des gènes de résistance. Ces gènes *R* sont présents en grand nombre chez les plantes ; plus de 300 gènes de résistance putatifs aux maladies ont été annotés chez *Arabidopsis thaliana* (selon <https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Le domaine « Leucin Reach Repeat » (LRR) est présent dans la majorité des protéines *R* et joue un rôle important pour la reconnaissance spécifique des gènes *avr* (Jones, 2001). Les gènes de résistance sont divisés en huit groupes en fonction de l'organisation de leurs domaines fonctionnels (**Figure 7**) [67].

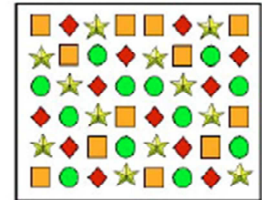
- La première classe de gènes *R* comprend des gènes codant des protéines cytoplasmiques avec un domaine NBS de liaison aux nucléotides impliqués dans la signalisation cellulaire en C-Terminal, un domaine LRR et un domaine homologue au domaine TIR (« Toll-Interleukin-1 Receptor » présent chez les mammifères) en N-Terminal. Un exemple de cette classe est le gène de résistance *RPML* chez *Arabidopsis thaliana* reconnaissant le gène *avrRpm1* de *Pseudomonas syringae* [68] ;
- La seconde classe de gènes de résistance consiste en des protéines cytoplasmiques possédant des motifs NBS et LRR et un motif en super hélice (« Coiled Coil » [CC]) en N-Terminal. Chez le tabac, le gène *N* conférant une résistance au TMV est un représentant de cette famille de gènes de résistance [69] ;
- La troisième classe de gènes de résistance ne présente pas de motif NBS mais un domaine extracytoplasmique riche en leucine (eLRR) attaché à la membrane par un domaine transmembranaire (« Transmembrane Domain » [TrD]). Les domaines eLRR sont connus pour jouer un rôle important chez certaines protéines de défense telles que les protéines inhibant les polygalacturonases (PGILPs) [70] même si elles ne sont pas directement impliquées dans la reconnaissance et l'activation des gènes de défense [71]. Le gène de résistance *Cf-9* précédemment décrit illustre la structure de cette famille de gènes de résistance [37] ;
- La quatrième classe de gènes de résistances est caractérisée par un domaine extracellulaire LRR, un domaine TrD et un domaine extracellulaire de type sérine-thréonine kinase (KIN). Le gène de résistance à *Xanthomonas Xa21* chez le riz est un exemple de cette quatrième classe de gènes de résistance [72] ;
- La cinquième classe de gènes de résistance est caractérisée par un TrD fusionné à un domaine CC comme l'illustre la protéine de résistance RPW8 chez *A. thaliana* [73] ;
- La sixième classe de gènes de résistances est caractérisée par un domaine extracellulaire putatif LRR, un domaine TrD, un domaine PEST (Proline-Glutamine-Sérine-Thréonine) permettant la dégradation des protéines et un motif protéique court (« Endocytosis Cell Signaling » [ECS]) ciblant les protéines pour l'endocytose. Les gènes *Ve1* et *Ve2* chez la tomate sont des exemples de cette classe de gènes de résistance [74], récemment décrit comme étant des récepteurs à PAMPs [75] ;



1. Un seul gène



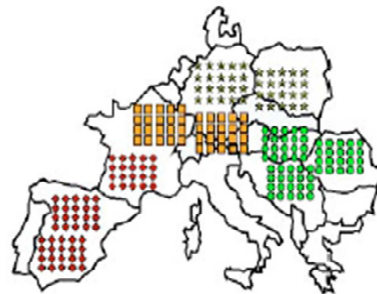
2. Rotation de gènes dans le temps



3. Mélange ou mixture de gènes de résistance



4. Pyramidage de gènes



5. Déploiement régional et épidémiologie du paysage

Figure 8. Stratégie de déploiement des résistances des plantes. (1) Déploiement traditionnel d'un seul gène de résistance (gène *R*) à chaque cycle de culture. (2) Rotation des gènes de résistance dans le temps. Chaque gène *R* est déployé pendant un nombre limité d'année ou sur une surface limitée puis est retiré avant que le gène de virulence correspondant atteigne une forte fréquence dans la population pathogène. (3) Utilisation de cultivars en mélange ou en mixture. (4) Approche de pyramidage de gènes de résistance, tous les gènes *R* sont transférés dans un même cultivar. (5) Déploiement régional et approche épidémiologie du paysage. Différents gènes *R* sont déployés dans différentes régions.

- La septième classe de gène de résistance est de type TIR-NBS-LRR avec, en C-Terminal, un domaine putatif de signal de localisation nucléaire (NLS) et un domaine WRKY de liaison à l'ADN. Le domaine WRKY contient 60 acides aminés et un domaine en « doigt de zinc ». Chez *A. thaliana* le gène de résistance *RRS1-R* conférant une résistance à *R. solanacearum* est un exemple de cette septième classe de gènes de résistance [76] ;
- La huitième classe de gènes de résistance inclut des enzymes de résistance (kinase, kinase en tandem ou toxine réductase) ne contenant ni domaine LRR ni domaine NBS. Ces gènes de résistance n'ont ni domaine de translocation membranaire ni de séquence réceptrice à proprement parler. Par exemple, le gène *Hm1* représentatif de cette chez le maïs fournit une résistance à la rouille des feuilles provoquée par *Cochliobolus carbonum* [77].

1.1.2. Les différentes stratégies de déploiement de la résistance

1.1.2.1. Un seul gène de résistance (**Figure 8.1**)

Bien que la plupart des phytopathologistes ne soient pas favorables au déploiement de ce type de résistance, il existe certaines situations où le déploiement d'un seul gène de résistance prend tout son sens. Une résistance est plus susceptible d'être durable dans un environnement peu propice à l'agent pathogène, par exemple lorsque sa taille de population est faible [78]. Ainsi, dans un environnement où une maladie a une incidence faible, voire modérée, un seul gène de résistance peut être suffisant sur une longue période. Un autre exemple est le cas de l'introduction d'un nouvel agent pathogène dans une zone jusqu'à présent non infestée. Une résistance monogénique permettrait de contrôler l'agent pathogène le temps que les sélectionneurs mobilisent d'autres ressources pour créer une résistance plus durable [79]. Cette stratégie de diversification dans le temps est limitée par le contournement rapide des gènes de résistance, plus rapide que la création de cultivars résistants qui dure en moyenne 10 ans pour les céréales, 25 ans pour la pomme de terre et de 15 à 20 ans pour les arbres fruitiers [80]. Cependant, certaines études ont démontré que la présence seule d'un gène *R* peut fournir une résistance durable.

Un exemple classique est la résistance du chou (*Brassica oleracea*) à *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. Cette résistance, conférée par le gène de résistance *FocBo1* s'est révélée particulièrement efficace et reste effective depuis 1927, date de sa première introduction [81, 82]. La résistance à la rouille de la feuille du blé (*Puccinia triticina*), conditionnée par la présence d'un seul gène de résistance *Lr34*, a permis le contrôle de ce pathogène pendant 30 ans en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Australie [83, 84]. Plus récemment, le gène de résistance *Lr67* a aussi été identifié comme le seul gène contrôlant la rouille de la feuille du blé ainsi que la rouille à bande du blé [85].

1.1.2.2. Rotation de gènes de résistance dans le temps (**Figure 8.2**)

La rotation des gènes de résistance consiste à déployer un gène de résistance jusqu'à l'apparition de génotype(s) virulent(s), puis de déployer un nouveau gène de résistance. S'ensuivra la réutilisation du premier gène de résistance lorsque les variants virulents correspondants auront suffisamment diminué en fréquence [86]. Ce type de stratégie a été adopté contre la pyriculariose du riz (provoquée par *Magnaporthe grisea* [86]) avec l'utilisation d'une variété comportant le gène de résistance *RI* et d'une autre variété comportant le gène *R2*. Cette rotation de gènes s'est aussi révélée efficace contre la maladie de Tungro du riz provoqué par le RTBV (« Rice Tungro Bacilliform Virus » [87]). La réutilisation dans le temps de variétés précédemment contournées s'est révélée efficace dans le cas du nématode à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*). Cependant l'efficacité de cette stratégie reste difficile à évaluer et pose deux problèmes majeurs [88]. Le premier problème, d'ordre technique, est la difficulté à mesurer la virulence avec précision, d'avoir différents génotypes avec les différents gènes de résistances et de coordonner simultanément le changement des cultivars parmi les agriculteurs d'une zone géographique donnée. Le second problème est la probabilité que le variant virulent, une fois le gène de résistance correspondant retiré, ne décline pas en fréquence et perdure dans l'agroécosystème [79].

1.1.2.3. Mélange ou mixture de gènes de résistance (**Figure 8.3**)

Les gènes de résistance peuvent aussi être mélangés au champ comme par exemple par l'utilisation de cultivars multilignées (mélange de lignées utilisées pour améliorer les traits agronomiques) ou de cultivars en mixture (mélanges de cultivars qui varient pour de nombreux caractères, y compris la résistance aux maladies, mais qui sont suffisamment similaires pour être cultivés ensemble) [89]. Il existe dans la littérature internationale des exemples de l'utilisation réussie de gènes de résistance en mixture pour le contrôle des maladies fongiques tels que les agents de la rouille ou encore de l'oïdium sur céréales [90-92]. Cependant, il existe certains exemples pointant l'effet négatif de leur utilisation, tels que l'auto-infection ou l'augmentation de la dispersion du pathogène [92, 93].

1.1.2.4. Pyramidage de gènes (**Figure 8.4**)

L'ensemble de la communauté scientifique s'est accordé à dire que compiler les gènes de résistance, ou pyramider les gènes de résistance, est l'une des meilleures solutions pour la mise en place d'une résistance potentiellement durable. Le dogme jusqu'à présent accepté est que la probabilité qu'un agent pathogène devienne virulent face à un ensemble de gènes de résistance serait le produit des probabilités de muter pour chaque gène, rendant ainsi l'apparition d'un variant virulent peu vraisemblable [94, 95]. L'histoire la plus célèbre du pyramidage de gènes est celle de la rouille des feuilles de blé (*Puccinia graminis*) où le pyramidage de gènes de résistance est resté effective de 1955 à 2005, jusqu'à ce qu'un variant virulent (Ug99) apparaisse, menaçant ainsi la sécurité alimentaire

mondiale [96]. Même si le contrôle de cette maladie s'est révélé efficace pendant un demi-siècle, cet exemple prouve qu'une résistance conférée par un pyramidage de gènes n'est pas durable s'il est exclusif, remettant en cause l'hypothèse de faible probabilité du contournement de ce type de résistance. De plus, dans le cas d'agents pathogènes ayant un fort potentiel évolutif, l'apparition d'un variant extrêmement virulent rend les gènes *R* inutilisables en même temps. Récemment, une étude sur la durabilité de la résistance à la pyriculariose du riz a démontré qu'un pyramidage de quatre QTLs confère une résistance durable [97], à l'inverse du pyramidage de quatre gènes de résistance où le contournement rapide de cette résistance a déjà été observé [98]. Bien que fournissant des performances agronomiques stables, assembler un large nombre de QTLs représente un important investissement en temps, surtout lorsque des marqueurs moléculaires ne sont pas disponibles [97].

1.1.2.5. L'épidémiologie du paysage (**Figure 8.5**)

A l'heure actuelle, peu d'études sont disponibles sur les effets de la structure du paysage sur la dynamique épidémiologique ou sur l'évolution du pathogène. L'approche écologique du paysage défini par Burel et Baudry en 1999 [99], considère le paysage comme un niveau d'organisation et non plus comme une résultante humaine et/ou naturelle. Ce champ de recherche étudie l'influence de l'hétérogénéité spatiale des habitats sur les processus écologiques. L'approche épidémiologique du paysage [100] s'inspire de ces concepts pour expliquer la dynamique d'un agent phytopathogène à l'échelle du paysage (ex. à l'échelle de la région ou de la localité), couplant ainsi écologie du paysage et pathologie végétale. L'épidémiologie du paysage tend donc à étudier les facteurs influençant la dissémination spatiale d'une population entre différents hôtes. Peu d'informations sont disponibles sur les effets du paysage sur les épidémies ou sur l'évolution des agents phytopathogènes [101]. Quelques études ont apporté des suggestions pour le déploiement régional de gènes de résistance contre la rouille des céréales ou contre d'autres pathogènes pouvant migrer à l'échelle du continent (Bowling [89, 102, 103]. Cependant, une résurgence de l'intérêt pour l'épidémiologie du paysage est observée, s'intéressant plus particulièrement à l'effet de la structure du paysage sur la résistance des plantes [79, 104, 105]. De récentes études sur la rouille du blé ont identifié une forte corrélation entre le niveau de résistance quantitative observé et la composition en cultivar du paysage national [106, 107], démontrant l'intérêt de ce type d'approche pour la mise en place d'une stratégie durable de gestion de la résistance.

1.2. Durabilité de la résistance

1.2.1. La notion de durabilité de la résistance

La notion de « durabilité de la résistance » est complexe. Elle a été initialement décrite comme étant la période entre l'introduction d'un cultivar résistant dans un agroécosystème jusqu'à ce que la fréquence de génotypes virulents atteigne un seuil au-delà duquel la résistance est considérée comme « contournée » [2]. Une résistance est durable lorsqu'elle est déployée à grande échelle et qu'elle reste

efficace sur le long terme et ce malgré des conditions de développement favorables à la maladie [78, 108]. Ainsi, la « durabilité de la résistance » a longtemps été évaluée uniquement rétrospectivement. D'autres équipes ont proposé de prédire la durabilité en identifiant des indicateurs de durabilité potentielle [109, 110] en prenant en compte le potentiel évolutif des agents pathogènes [1], couplant ainsi plusieurs disciplines telles que la phytopathologie, la génomique et la génétique des populations. La notion essentiellement descriptive de « résistance durable » glisse ainsi vers une notion d'estimation de la durabilité qu'il serait plus à même de qualifier de « potentiel de durabilité de la résistance ».

1.2.2. Durabilité de la résistance : comment la mesurer ?

Jusqu'à présent, les stratégies de déploiement durable de la résistance n'étaient basées que sur des observations [1]. Les approches traditionnelles de test de la durabilité de la résistance nécessitent des essais sur le long terme ainsi que des moyens techniques conséquents (parcelles expérimentales, disponibilité des génotypes résistants, phénotypage, génotypage en laboratoire, etc.), ne fournissant par conséquent que de rares données expérimentales. Cependant, comme vu précédemment, cette situation est en cours de changement et de plus en plus d'études combinent à la fois des études en champ, voire en serre, avec des études en laboratoire (évolution expérimentale). Adoptant cette stratégie d'étude, Palloix et coll. [43] ont mis en avant l'importance du fond génétique des variétés utilisées. Les auteurs ont démontré que la résistance des variétés portant le gène majeur de résistance *pvr2³* dans un fond génétique sensible est rapidement contournée alors que les cultivars porteurs du gène de résistance *pvr2³* avec un fond génétique partiellement résistant (avec plusieurs QTLs mineurs) [43] restent durablement résistants. Le même type de résultat a été obtenu par Brun et coll. [111] à la suite de 5 années d'expérimentation aux champs du colza (*Brassica napus*) face à l'agent responsable de la nécrose du collet des crucifères (*Leptosphaeria maculans*). La variété de colza 'DarmorMX', combinant une résistance quantitative couplée à une résistance qualitative (conféré par le gène *R Rlm6*), fournit un contrôle efficace de *L. maculans* sur les 5 ans d'expérimentation, alors que le cultivar combinant un fond génétique sensible et le gène *R Rlm6* n'a été efficace que trois ans. Face aux nématodes à kyste de la pomme de terre (*Globodera pallida*), l'efficacité du QTL majeur de résistance (QTL *GpaV_{vrrn}*) dépend aussi du fond génétique de l'hôte : une variété possédant un (ou des) QTL(s) mineur(s), présente une meilleure résistance qu'une variété ne possédant que le QTL *GpaV_{vrrn}* seul [112].

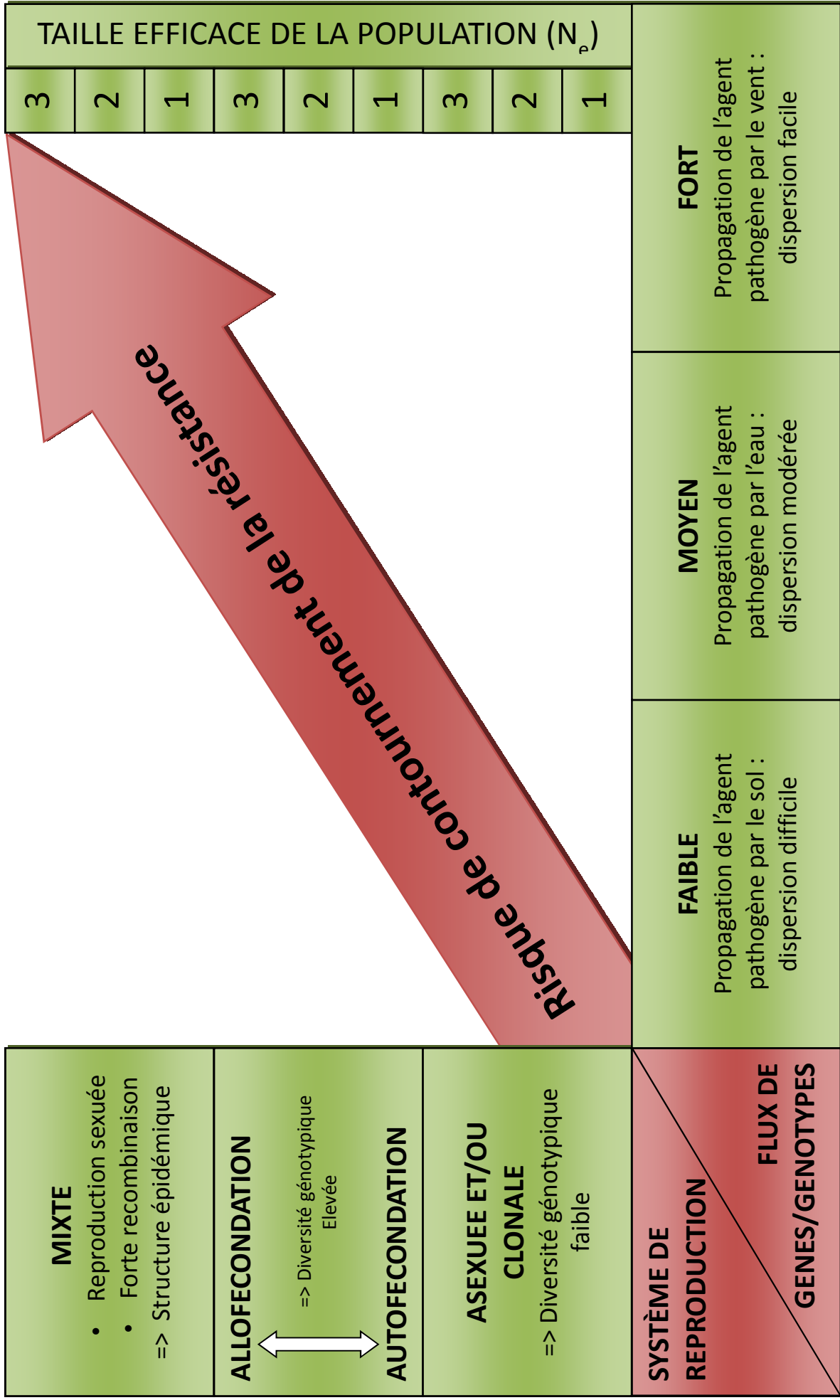


Figure 9. Echelle du risque de contournement de la résistance. Cette échelle est construite en fonction du système de reproduction, du flux de gènes/génotypes et de la taille efficace de la population. La taille efficace de la population est représentée sur une échelle de 1 à 3 où 1 correspond à une faible taille efficace de la population, 2 à une taille efficace de la population N_e moyenne et 3 à une taille efficace de la population importante N_e . Ce modèle suggère que le taux de mutation est constant est que la sélection est imposée à tous les pathogènes. D'après [1].

2. Potentiel évolutif des agents phytopathogènes

2.1. Diversité et structure génétique des microorganismes pathogènes

McDonald et Linde [1] ont émis l'hypothèse que l'estimation de la durabilité de la résistance passe nécessairement par une étude approfondie de la structure génétique des populations de l'agent phytopathogène considéré. Ce type d'approche permet d'avoir un aperçu du potentiel évolutif du pathogène. Les auteurs mettent en avant l'importance des forces évolutives structurant les populations d'agents pathogènes : (i) la mutation, (ii) la sélection imposée par les gènes de résistance des plantes, (iii) la migration ou flux de gènes et de génotypes et (iv) la dérive génétique et (v) le système de reproduction [1].

2.1.1. Forces évolutives générant de la diversité chez les microorganismes pathogènes

En compilant les données agronomiques et bibliographiques sur 34 pathosystèmes, McDonald et Linde [1] ont cherché à faire le lien entre le risque estimé d'évolution de l'agent pathogène et la durabilité observée de gènes de résistance (**Figure 9**). Ils ont ainsi montré que les deux facteurs prépondérants étaient la mutation et la capacité de dispersion (ou flux de gènes). En effet, l'acquisition de matériel génétique étranger par le transfert de gènes ainsi que la mutation vont permettre de générer de la diversité. La recombinaison quant à elle va permettre de redistribuer cette diversité acquise dans une population. Cela aurait comme conséquence de générer de nouvelles combinaisons virulence/avirulence permettant ensuite d'augmenter la diversité haplotypique d'une population pathogène.

2.1.1.1. Mutation

La mutation est une modification de l'information génétique : substitution nucléotidique, délétion ou insertion de séquences, inactivation des gènes, pouvant aboutir parfois à de nouveaux allèles virulents capables de contourner les gènes majeurs de résistance. Elle joue un rôle majeur dans l'évolution des pathogènes, permettant la création de nouveaux allèles et de nouveaux génotypes dans les populations phytopathogènes [113, 114]. Cependant, l'occurrence de mutation d'un allèle avirulent en un allèle virulent ne permet pas de contournement si le nouvel allèle n'est pas rapidement et largement diffusé dans la population pathogène [1]. Une mutation couplée à une pression de sélection peut rapidement entraîner l'apparition d'un variant virulent et causer une perte d'efficacité du gène de résistance. Le taux de mutation d'une séquence d'ADN est généralement bas mais il dépend du locus et surtout du pathogène considéré. Chez les bactéries, la mutation est la source la plus importante de variabilité génétique au niveau de l'individu, estimée à environ 10^{-9} à 10^{-10} mutations par génération pour la plupart des bactéries [115].

2.1.1.2. Sélection exercée par les gènes de résistance

La sélection est un processus directionnel menant à une augmentation ou à une diminution de la fréquence de gènes et de génotypes. Elle permet l'augmentation en fréquence des allèles de résistance des plantes dans un écosystème naturel et l'augmentation de la fréquence des allèles de virulence chez l'agent pathogène correspondant. La sélection se produit en réponse à un facteur environnemental. La conséquence de la sélection naturelle sur la structure génétique et sur l'évolution des organismes est complexe. La sélection naturelle peut, soit diminuer la variabilité génétique des populations en sélectionnant pour ou contre des gènes spécifiques ou une combinaison de gènes (sélection directionnelle), soit augmenter la variabilité génétique des populations en utilisant les mêmes mécanismes (sélection diversifiante). La sélection directionnelle peut se produire lorsqu'un cultivar possédant un gène majeur de résistance est déployé à grande échelle. On parle alors de « boom ». Cela conduit à l'augmentation de la fréquence d'apparition d'un variant virulent ayant perdu le gène d'avirulence correspondant. On parle alors de « bust », aboutissant ainsi au contournement du gène majeur de résistance [116]. La pression de sélection exercée par la plante est ainsi un paramètre important à prendre en compte dans le risque de contournement de la résistance.

2.1.1.3. Flux de gènes et de génotypes

Le flux de gènes définit l'échange d'allèles (gène) ou d'individus (génotypes) entre des populations espacées géographiquement. L'isolement entre les populations limite les échanges de gènes, provoquant soit une divergence par dérive génétique, soit une adaptation locale par sélection. Le flux de gènes est particulièrement important dans les agroécosystèmes car il va permettre le déploiement de nouveaux allèles de virulence. Pour les agents phytopathogènes à reproduction strictement asexuée certains gènes sont transférés en bloc dans les organismes clonaux : c'est ce que l'on nomme le flux de génotypes. Les flux de gènes, ou flux de génotypes, augmentent la taille de la population efficace. Aussi les agents pathogènes présentant un fort flux de gènes/génotypes sont supposés avoir une plus forte diversité génétique que les pathogènes présentant un faible flux de gènes et de génotypes.

2.1.1.4. Taille efficace et dérive génétique

La taille efficace d'une population équivaut au nombre d'individus d'une population idéale pour lequel la dispersion des fréquences alléliques est identique à celle présente dans l'ensemble de la population considérée. La dérive génétique est un processus aléatoire de changement de fréquence allélique dans une population, qui peut mener à de grands changements dans une population sur une courte période. Les effets de la dérive génétique sont maximaux sur des populations de faible taille, par une forte réduction de la taille des populations nommée « bottleneck » ou par effet de fondation, c'est-à-dire lorsqu'une nouvelle population se développe à partir d'un faible nombre d'individus. La

dérive génétique mène généralement à la fixation des allèles et ne jouerait donc pas un rôle primordial dans l'évolution des pathogènes au sein du champ sauf sur les populations de petites taille.

2.1.1.5. Recombinaison

La recombinaison est certainement une force évolutive primordiale dans l'évolution des populations bactériennes. Trois mécanismes sont impliqués dans la recombinaison chez les bactéries : la transduction, la conjugaison et la transformation (Thomas & Nielsen 2005), qui permettent à la bactérie d'intégrer de l'ADN de cellules apparentées ou non. La recombinaison est réalisée par les produits de gène *rec* comme la protéine RecA également impliquée dans la réparation de l'ADN. Une fois l'ADN intégré dans la cellule bactérienne il aura plusieurs devenir : (i) il sera directement dégradé et constituera une source de nutriments et d'énergie, (ii) l'ADN est pris en charge par le système de restriction et sera dégradé s'il est reconnu comme étranger, (iii) l'ADN peut être intégré au sein du génome bactérien par recombinaison homologue et enfin, (iv) l'ADN pourra se répliquer si il est intégré dans un plasmide circulaire [117].

2.2. Contournement de la résistance

Le contournement de la résistance des plantes est une limite majeure à l'efficacité et à la durabilité du contrôle des pathogènes. Eviter d'être reconnu par un gène de résistance représente un enjeu évolutif majeur pour les agents phytopathogènes. Lorsqu'un gène de virulence est reconnu par la plante, l'agent pathogène va contourner cette reconnaissance en mutant le gène d'avirulence (gène reconnu) pour devenir virulent (non reconnu) *via* différents mécanismes moléculaires :

- La mutation ponctuelle dans la séquence du gène d'avirulence. Il existe trois types de mutation appartenant à cette catégorie :
 - o la substitution d'un nucléotide par un autre : c'est une mutation non synonyme qui altère la fonction, la reconnaissance ou la stabilité de la protéine ;
 - o la délétion : mutation caractérisée par la suppression de séquences nucléotidiques ;
 - o l'insertion d'une ou plusieurs séquences nucléotidiques.

Ces modifications ont plusieurs incidences et provoquent un décalage du cadre de lecture et donc la synthèse d'une protéine non fonctionnelle qui ne sera pas reconnue par la protéine *R* correspondante ;

- La perte entière du gène d'avirulence par délétion ;
- L'inactivation du gène d'avirulence par insertion d'éléments transposables ou de motifs répétés en tandem.

La probabilité d'apparition d'un variant virulent dépend du nombre et de la nature des mutations exigées pour passer de l'état avirulent à l'état virulent [62, 118]. Bien souvent, c'est la résistance monogénique qui présente le plus fort risque d'être contournée, bien que le lien entre la nature d'une résistance et sa durabilité n'ait jamais été clairement établi [119, 120]. De nombreuses études ont tenté

d'estimer la vitesse de contournement d'un gène de résistance par différents microorganismes phytopathogènes après déploiement de variétés résistantes. Chez les virus, le contournement de la résistance s'effectue en trois étapes [120]. Brièvement, la première étape consiste en l'apparition d'un mutant pathogène adapté à une plante porteuse d'un facteur de résistance. Durant la deuxième étape, le mutant va entrer en compétition avec les autres populations d'agent pathogène et va s'accumuler dans les plantes infectées en fonction de sa capacité compétitive (« *fitness* »). La troisième étape est la transmission du pathogène à d'autres plantes. De manière générale, plus un mutant est compétitif, plus sa probabilité de transmission à une plante possédant le gène de résistance sera forte. Chez le virus Y de la pomme de terre (« Potato Virus Y » [PVY]), la probabilité d'apparition d'un virus virulent dépend aussi du fond génétique de l'hôte [43]. Plus récemment, les travaux de G. Daverdin [121] ont montré l'intérêt d'une double approche en laboratoire et en plein champ pour l'étude du « coût de *fitness* ». Il a démontré que chez *Leptosphaeria maculans*, tous les mécanismes moléculaires de perte de virulence répertoriés dans la littérature internationale peuvent se retrouver au sein d'isolats issus d'un même champ. Cette étude a aussi montré que certains mécanismes de perte d'avirulence pour contourner le gène de résistance *Rlm7* chez le colza seraient moins avantageux que d'autres [122]. Il propose aussi une nouvelle approche de l'étude de la durabilité de la résistance : étudier la capacité d'un gène d'avirulence à muter en gène de virulence et analyser les mécanismes responsables de telles mutations. Parallèlement, pour le pathosystème riz (*Oryza sativa* L.) vs *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ou *Xoo*), un important « coût de *fitness* » a aussi été observé dans l'acquisition de virulence de *Xoo* confronté à des cultivars contenant le gène de résistance *Xa4* ou le gène *Xa7* [123]. Chez *Magnaporthe grisea*, un pathogène provoquant la pyriculariose du riz, plusieurs études ont montré le contournement rapide (quelques années) de la résistance des cultivars de riz présentant un ou plusieurs gènes de résistance [98, 124]. Cependant, une étude récente a démontré que le pyramidage de 4 QTLs de résistance permet un contrôle efficace de cette maladie [97]. Concernant le pathosystème *Phytophthora infestans* (agent du mildiou de la pomme de terre) vs *Solanum tuberosum* (pomme de terre), le contournement de la résistance du cultivar 'Naturella' (portant le gène de résistance *R2*) a été observé à partir du moment où cette variété a été déployée à l'échelle parcellaire [125]. Le gène majeur de résistance *Vf* chez le pommier (*Malus domestica*) a aussi été contourné par l'ascomycète *Venturia inaequalis*, responsable de la tavelure du pommier. Cependant, pour ce pathogène, l'hypothèse d'un flux de gènes provenant d'un autre verger a été retenue, au profit de l'hypothèse d'un potentiel événement de mutation dans la population indigène [126]. Toutes ces études démontrent que, malgré l'efficacité de la résistance conférée par un gène majeur de résistance, celle-ci peut ne pas être durable dans le temps.

2.3. Coût de virulence/déficit de *fitness*

En l'absence de mutation et de gènes de résistance, les gènes de virulence non nécessaires dans une population pathogène vont constituer une charge génétique inutile, favorisant ainsi les génotypes ayant un panel minimal de gènes de virulence. Si un gène d'avirulence n'est pas sous sélection positive car ayant une autre fonction, son passage à un état virulent ne se produira que si le pathogène doit contourner un gène *R*. La mutation d'un gène d'avirulence va ainsi conférer un avantage sélectif à son porteur. Cependant, la perte de ce gène aura aussi des incidences négatives pour la capacité de survie et de reproduction (ou « coût de *fitness* ») de l'agent pathogène [127]. Deux approches ont été développées pour évaluer ce « coût de *fitness* » [109]. La première approche consiste à déterminer le niveau de conservation d'un gène de virulence au champ dans le cas de l'absence du gène de résistance correspondant. En effet, plus un gène est conservé entre les souches, plus sa mutation entraînera *a priori* une perte de *fitness*. La seconde approche tend à déterminer si l'inactivation d'un gène de virulence entraîne un « coût de *fitness* » [128]. Cette seconde approche, nécessite des études complémentaires en laboratoire ainsi qu'en plein champ. Cette approche a été utilisée par Daverdin et coll. [122] pour étudier le pathosystème *Brassica napus* vs *Lepstosphaeria maculans*. Les auteurs ont, dans un premier temps, mis en place une expérimentation de quatre ans au champ afin d'étudier l'évolution des populations de *L. maculans* face au gène de résistance *Rlm7*. Dans un second temps, ils ont analysé la nature des mutations responsables de la virulence du pathogène face à *Rlm7*. Leach et coll. [109] ont émis le postulat que la qualité d'un gène de résistance est directement dépendante du « coût de *fitness* » qu'il impose au microorganisme phytopathogène.

2.4. Structuration génétique des populations bactériennes

La grande diversité de la structuration des populations bactériennes, variant de strictement clonales à hautement recombinantes, est une manifestation directe de la dynamique évolutive de l'organisme [129]. Cette dynamique est modulée par l'intervention des différentes forces évolutives sus-décrites. Initialement, les populations bactériennes étaient considérées comme exclusivement clonales [130] jusqu'à ce que se développent de nouvelles méthodes, théories et modèles statistiques en génétique des populations qui ont permis de détecter et de décrire des événements fréquents de recombinaison chez certaines bactéries [129]. Trois structures possibles des populations bactériennes ont été mises en évidence par Maynard Smith et coll. [131] et sont présentées dans la **figure 10**.

Une population bactérienne ayant une **structure clonale** se reproduit uniquement par scission binaire de la cellule-mère en deux-cellules filles qui auront un génome identique à celui de la mère, à quelques rares mutations près. Ces mutations vont être transmises verticalement et, au fur et à mesure, l'accumulation progressive de ces mutations entraînera une « divergence clonale » de la descendance [132]. D'un point de vue phylogénétique, ces génomes clonaux partagent une histoire évolutive commune et ont donc des relations phylogénétiques étroites, à l'exception des séquences acquises par mutation. Cette structure clonale est représentée par l'arbre évolutif (**Figure 10.A**) dit en

« bifurcation » où à chaque nœud correspond une mutation. Aucune recombinaison n'a lieu, ni entre les isolats d'une même branche, ni entre les isolats de différentes branches [131]. Cependant, la plupart des bactéries possèdent des mécanismes permettant de faciliter les échanges génétiques. Une population en forte recombinaison aura un faible déséquilibre de liaison dû à la réorganisation allélique. Dans ce cas, chaque souche n'a pas qu'une seule histoire évolutive mais chaque recombinant a potentiellement une descendance, provoquant le maillage évolutif d'une population. Les arbres **Figure 10B et 10C** [129], permettent de visualiser la réticulation des arbres phylogénétiques résultant des événements de recombinaison [133]. Ces événements conduisent à deux types de populations. Le premier type de population a une **structure en maillage** où la recombinaison est absente des branches principales et uniquement présente sur les branches secondaires (**Figure 10.B**). Cette structuration est souvent due à un isolement écologique ou géographique des populations. Le second type de population a une **structure épidémique** (**Figure 10.C**). Dans ce modèle, une population « de fond » est composée d'un grand nombre de génotypes peu fréquents et faiblement apparentés, recombinant fréquemment. Occasionnellement, un mutant avec un fort succès reproductif émerge de cette population de fond, puis augmente rapidement en fréquence pour produire un clone épidémique. Ce clone va ensuite se diversifier par recombinaison ou mutation en un complexe clonal, voire en un nouvel écotype, et s'établira pour une longue période [131]. Cette expansion clonale peut être due à une adaptation locale à une nouvelle niche écologique ou à un nouvel hôte [134].

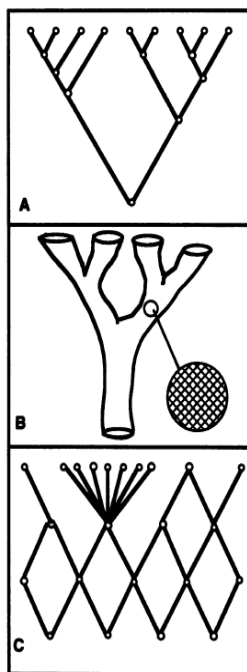


Figure 10. Représentation de la structure des populations bactériennes. Les populations (A et B) consistent en isolats séparés en deux branches secondaires. La **structure de la population bactérienne en (A) est clonale** à tous les niveaux. Cette représentation est un arbre évolutif : aucune recombinaison n'a lieu, ni entre les isolats d'une même branche, ni entre les isolats de branches différentes. C'est une **structure en bifurcation**. (B) La recombinaison n'a pas lieu entre les isolats des branches principales mais plutôt entre isolats au sein des branches secondaires. C'est une structure en maillage. (C) **Structure épidémique** ou la recombinaison est fréquente au sein de tous les membres de cette population. Occasionnellement, un individu avec un fort succès de reproduction émerge et augmente rapidement en fréquence afin de produire un clone épidémique. D'après [131].

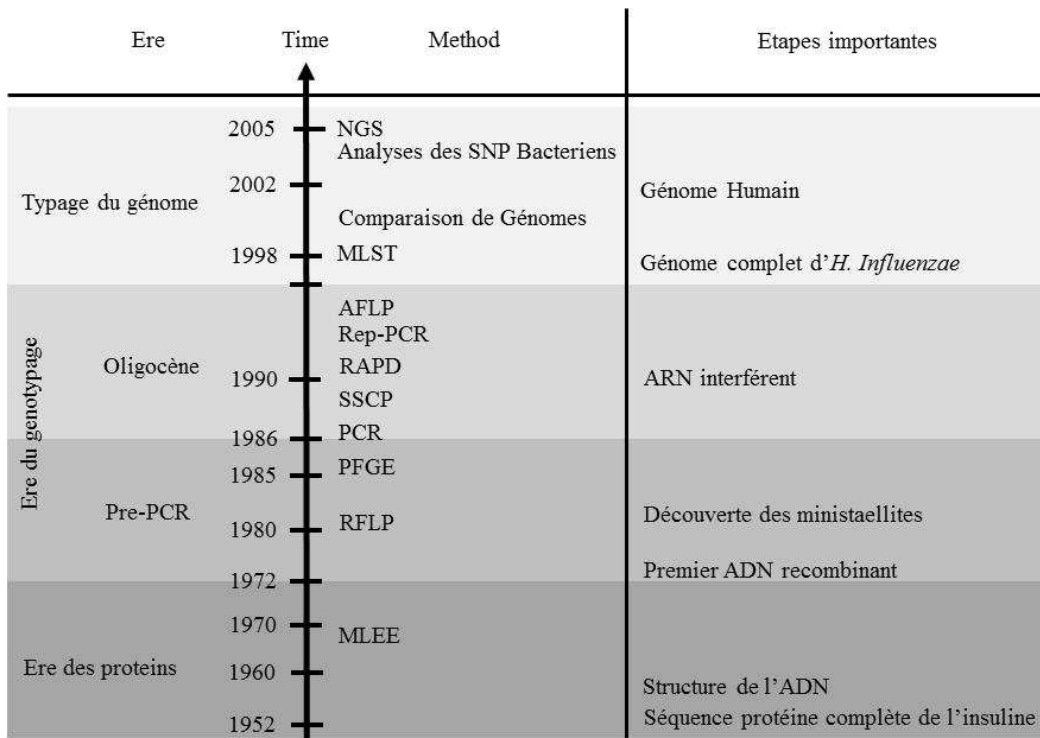


Figure 11. Historique du développement des méthodes moléculaires des cinquante dernières années. D'après [135].

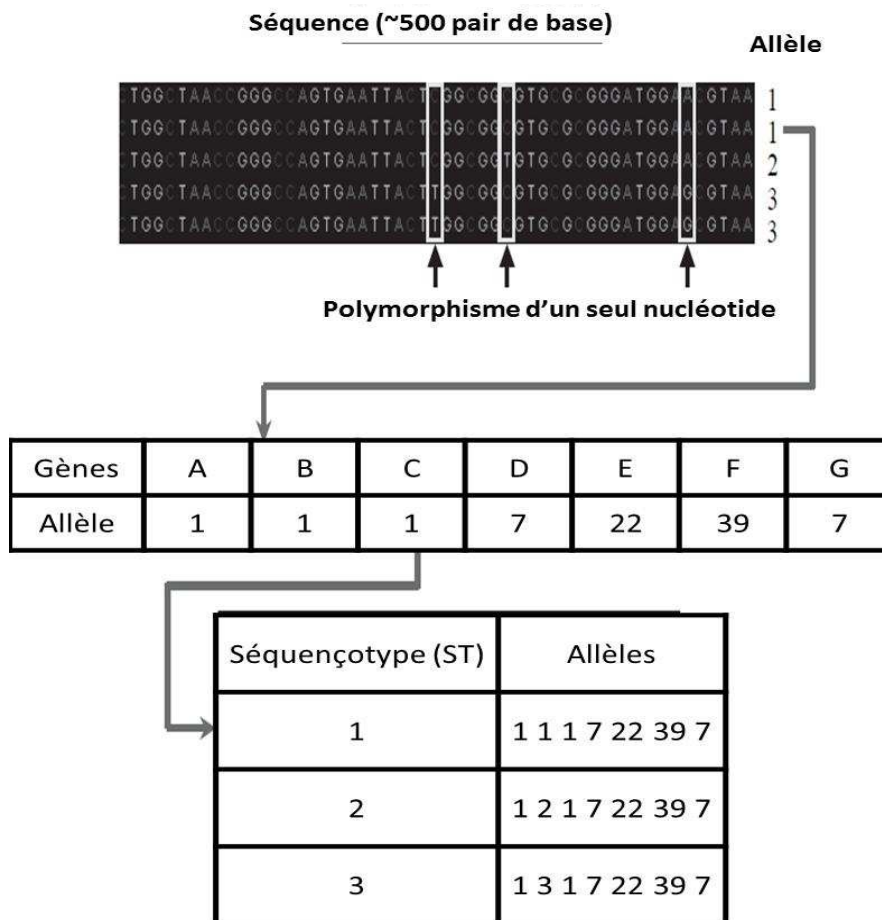


Figure 12. Notation des données MLST et assignation à un séquençotype (ST). Chaque séquence unique est assignée à un allèle distinct et chaque combinaison d'allèles est assignée à un ST distinct (ex. ST1). D'après [135].

2.5. Outils pour l'épidémiologie des populations bactériennes : les marqueurs moléculaires

Les forces évolutives précédemment décrites vont déterminer le risque potentiel qu'un agent phytopathogène contourne la résistance d'une plante hôte [1]. Afin d'estimer la durabilité des résistances variétales, il est donc nécessaire de caractériser la dynamique évolutive des populations d'agents pathogènes pour disséquer les mécanismes d'apparition et de dissémination de variants virulents dans la population hôte. Depuis les années 1980, l'épidémiologie moléculaire est utilisée à cette fin [136], notamment en santé humaine (par exemple sur *Legionella pneumophila* [137] ; *Chlamidophyla psittaci* [138] et *Staphylococcus aureus* [139], afin de retracer l'origine d'épidémies ou la dissémination de variants résistants aux antibiotiques [140]. Développées plus récemment en santé des plantes, les approches d'épidémiologie moléculaire ont jusqu'à présent principalement été menées sur des populations de champignons phytopathogènes [141] afin d'analyser le mode de reproduction (types sexuels, reproduction hétérothallique ou homothallique), les flux de gènes, l'établissement d'épidémie et l'adaptation aux cultures hôtes. Dans le cas des bactéries phytopathogènes, très peu d'études ont été publiées mais elles ont notamment montré leur intérêt pour la surveillance épidémiologique et l'étude de la structuration génétique des populations de *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*), l'agent du chancre asiatique des agrumes [142-144], ainsi que pour *Xylella fastidiosa* [145] ou encore *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) et *P. s.* pv. *maculicola* (*Psm*), respectivement pathogènes de la tomate et des Brassicacées [146].

L'un des principaux objectifs des travaux d'épidémiologie moléculaire est de permettre la mise en place de méthodes de lutte efficaces contre les agents pathogènes, et ce *via* la connaissance des caractéristiques génétiques des populations, à savoir: (i) le niveau de diversité, (ii) la structuration de la diversité dans l'espace (patrons de dissémination et flux de gènes) et dans le temps (dynamique évolutive) et (iii) le mode de reproduction, y compris chez les bactéries monomorphes (clonalité/recombinaison) [142]. Ces objectifs impliquent de développer des marqueurs moléculaires suffisamment discriminants pour pouvoir différencier des souches génétiquement proches, appartenant à une même espèce. Le choix d'un marqueur moléculaire dépend de l'objectif visé, des connaissances préalables à l'étude, du budget disponible, des échelles géographiques et temporelles considérées ainsi que du polymorphisme moléculaire de l'organisme étudié [135]. De nombreux marqueurs ont été développés notamment grâce à l'avènement de la PCR [147] (**Figure 11**) permettant l'amplification et le séquençage rapide de l'ADN à partir de quelques microgrammes d'ADN. Les premières méthodes développées se basaient sur la caractérisation du polymorphisme de l'ADN par empreinte génétique (ou « fingerprinting ») [135]. La méthode d'empreinte génétique est basée sur la présence ou sur l'absence de fragments d'ADN de différentes tailles, reflétant le polymorphisme des génomes bactériens. Cette méthode reste la plus adaptée pour déterminer la relation entre les souches lors d'épidémies. Les techniques d'empreintes génétiques incluent l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism [AFLP]), l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (Restriction Fragment Length

Polymorphism [RFLP]), l'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed-Field Gel Electrophoresis [PFGE]), l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (« Random Amplified Polymorphic DNA [RAPD]), la PCR basée sur les séquences répétées (« Repetitive Sequence-Based PCR »). Ces marqueurs présentent cependant certains inconvénients tels qu'une faible répétabilité et reproductivité pour certains et une faible portabilité entre laboratoire pour les autres [135]. En épidémiologie moléculaire, les méthodologies sont en perpétuelle évolution, permettant le développement constant de nouvelles techniques de typage. Les bactéries possèdent des gènes ou des régions inter-géniques contenant des loci avec des portions d'ADN répétés en tandem qui peuvent varier entre les souches. Les marqueurs se basant sur ces loci sont appelés nombre de séquences répétées en tandem (« Variable Number of Tandem Repeats » [VNTR]). Le typage par analyse multilocus des marqueurs VNTR (« MultiLocus VNTR Analysis » [MLVA]), suscite un intérêt grandissant dans le cadre d'études d'épidémiologie moléculaire chez les bactéries phytopathogènes [148]. Cependant, le séquençage étant de moins en moins coûteux et de plus en plus accessible, une croissance exponentielle de l'utilisation de cette méthode est observée ces dernières années. Le séquençage permet notamment de réaliser des comparaisons phylogénétiques et permet d'avoir des résultats comparables entre différents laboratoires. Cette approche regroupe l'analyse et le typage des séquences multilocus (« Multi Locus Sequence Typing » [MLST]) et « Multi Locus Sequence Analysis » [MLSA]), le séquençage de génome complet ou encore la détection du polymorphisme de séquence d'un seul nucléotide (« Single Nucleotide Polymorphism » [SNP]). Dans la suite de ce manuscrit nous ne nous focaliserons que sur les marqueurs de type VNTR et les marqueurs neutres de type « gènes de ménage » (ou « housekeeping genes »). Le typage MLST/MLSA utilisant les gènes de ménage est en effet très utilisé pour étudier les relations phylogénétiques des souches [149].

2.5.1. L'approche MLSA/MLST

Les variations des séquences nucléotidiques sont très souvent neutres car la plupart des mutations sont délétères et sont rapidement évacuées par sélection purificatrice. Cependant, les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène ou dans l'adaptation à l'environnement peuvent contenir des séquences soumises à la sélection diversifiante pour échapper au système immunitaire de l'hôte [131] ou pour s'adapter à un nouvel environnement. À l'inverse, les gènes de ménage sont généralement sélectivement neutres et accumulent des mutations avec une horloge moléculaire stable au cours du temps. Ces gènes de ménage sont des gènes constitutifs essentiels à la survie de la bactérie pour maintenir les fonctions de base de son métabolisme. La méthode MLST repose sur le séquençage de fragments de plusieurs de ces gènes de ménages [150]. Chaque fragment est assigné à un allèle distinct et chaque combinaison d'allèles est assignée à un séquençotype (« Sequence Type » [ST] ; **Figure 12**) [135]. Les relations entre bactéries sont notées selon la distance de Hamming entre les ST, c'est-à-dire que l'on compte le nombre d'allèles identiques et le nombre d'allèles différents, en pondérant chaque changement par mutation ou recombinaison. Dans ce type d'analyse, une mutation correspond à un

SNP. Les groupes de ST ne différant pas de plus d'un allèle sont appelés « complexe clonaux » ou CC [150, 151].

La méthode MLST a initialement été conçue comme un outil pour les épidémiologistes et microbiologistes cliniques [151] avec la publication en 1998 d'un schéma MLST dédié à l'étude de *Neisseria meningitidis* [150]. Elle a ensuite été utilisée pour typer d'autres bactéries pathogènes de l'homme [149] puis, plus récemment, des bactéries pathogènes des animaux et des plantes [135]. Cette méthode est devenue une méthode de référence et a permis d'unifier la méthode de caractérisation des bactéries et ainsi l'utilisation entre différents laboratoires des données pour des études de biologie évolutive et de génétique des populations [151]. A l'heure actuelle, plus de 75 espèces bactériennes ont été typés et le schéma MLST correspondant est disponible sur la base de donnée PUBMLST (<http://pubmlst.org/>) ou sur PAMDB <http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl>) [152]. L'approche MLSA [153], utilise les séquences de plusieurs gènes de ménage afin de reconstruire l'histoire évolutive des microorganismes par reconstruction phylogénétique ou par généalogie de gènes (approche de coalescence) [154]. Les données MLST/MLSA étaient antérieurement représentées sous forme de dendrogrammes mais ceux-ci ne présentaient aucune information ni sur les patterns évolutifs des souches ni sur l'identité des haplotypes fondateurs [134]. L'approche eBURST divise les données MLST en groupes de ST ou de CC liés entre eux et permet de discerner le modèle de descendance des souches de chaque complexe clonal à partir de l'haplotype fondateur. Le niveau de confiance de l'assignement des haplotypes fondateurs est jaugé par l'utilisation de la technique de bootstrap. Plusieurs études MLSA ont été développées pour des bactéries phytopathogènes, notamment pour *Pseudomonas sp.* [21, 155-158], *Xylella fastidiosa* [159], *Acidovorax avenae* [160], *Xanthomonas sp.* [152, 161, 162], *Clavibacter michigensis* [163, 164] et *Ralstonia solanacearum* [165, 166]. La méthode MLSA a été utilisée pour étudier les relations phylogénétiques entre différentes espèces de *Xanthomonas* attaquant différentes espèces de Solanacées [167]. Chez *Pseudomonas syringae*, cette approche a permis de reconstruire la phylogénie de la souche de référence DC3000 et de souches apparentées ainsi que d'évaluer l'implication de la recombinaison dans la diversité des séquences du *core*-génom [21]. Chez *R. solanacearum*, l'approche MLSA a permis d'évaluer l'impact de la recombinaison dans l'histoire évolutive et d'étudier la dynamique phylogéographique des cinq lignées évolutives majeures de cette bactérie, montrant que trois de ces lignées étaient recombinogènes et en expansion démographique [166]. Cependant, chez certaines bactéries, l'approche MLSA reste limitée par le faible polymorphisme des gènes de ménages, comme l'illustre le cas de *Xanthomonas citri* pv. *citri* [142]. Cet exemple souligne la limite de l'approche MLSA et l'utilité de développer d'autres méthodes de typage plus discriminante pour caractériser certaines bactéries.

2.5.2. L'approche MLVA

2.5.2.1. Caractéristiques des VNTRs

Au début des années 1980, des séquences d'ADN répétées en tandem ont été mises en évidence dans le génome humain, notamment aux alentours du gène de la β -globine (entre les gènes de la δ et de la β -globine [168]; en 5' du gène de la β -globine [169]; dans un intron du gène de la myoglobine, [170]. Ces séquences ont ensuite été repérées chez de nombreux génomes procaryotes. Ces répétitions sont appelées microsatellites lorsque la taille du motif de base est comprise entre 1 et 6 paires de bases (pb) et minisatellites lorsque la taille du motif dépasse 6 pb [171]. Minisatellites et microsatellites sont regroupés sous le terme VNTRs et constituent des zones hypervariables réparties dans le génome [172]. Pour des marqueurs neutres tels que le sont *a priori* les VNTRs, le degré de polymorphisme est proportionnel au taux de mutation [171].

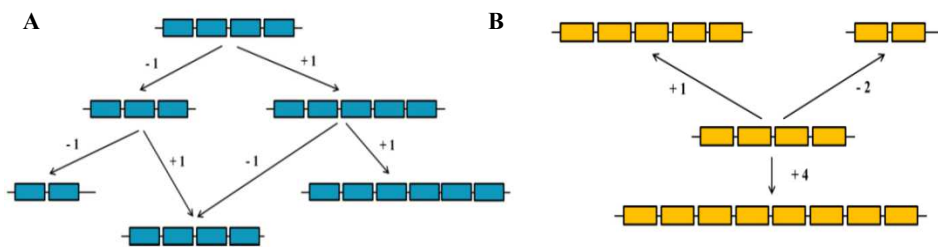


Figure 13. Deux des principaux modèles de mutation. (A) Modèle IAM (« Infinite Allele Model » ou modèle en nombre infini d'allèles), (B) Modèle SMM (« Stepwise Mutation Model » ou modèle pas à pas).

2.5.2.2. Modèles de mutation et homoplasie

L'étendue du polymorphisme des VNTRs suggère que les mutations dans ces régions du génome doivent se produire fréquemment [171], hypothèse soutenue par des observations directes. En effet [173], après analyse par génotypage de 20 000 transferts d'allèles (de parents à enfants) de 28 courtes répétitions en tandem localisées sur le chromosome 19 humain, estiment un taux de mutation des minisatellites de l'ordre de 10^{-3} /locus/gamète/génération. La variation dans le nombre de répétition en tandem est due à un glissement de la polymérase pendant la réplication de l'ADN suivi d'une absence de réparation (« Slipped Strand Mismatching » ou SSM) [174]. Plusieurs théories ont donc été retenues dans le but d'expliquer l'évolution des VNTRs :

- Le modèle IAM (« Infinite Allele Model » ou modèle de mutation en nombre infini d'allèles) repose sur le fait que chaque nouvelle mutation, apparaissant à la fréquence μ , introduit un nouvel allèle qui n'existait pas au préalable dans la population [175] (**Figure 13.A**) ;
- Le modèle SMM (« Stepwise Mutation Model » ou modèle de mutation pas à pas) considère l'apparition de nouveaux allèles par la perte ou le gain d'une unité de répétition [176], à une fréquence μ . Ce type de mutation apparaît par glissement d'un des 2 brins d'ADN lors de la

réplication [171]. C'est le modèle de mutation le plus fréquemment rencontré pour les VNTR bactériens (**Figure 13.B**) ;

- Le modèle TPM (« Two Phases Model » ou modèle de mutation en 2 phases) dérive du modèle SMM avec la probabilité p qu'une mutation modifie la taille d'un allèle d'une unité de répétition, et $(1-p)$ pour une variation de plusieurs unités de répétition ;
- Le modèle KAM (« K-Allele Model » ou modèle de mutation à k-allèles) considère que pour un locus donné à k allèles, la probabilité pour qu'un de ces allèles mute vers un autre des $k-1$ états alléliques vaut $[\mu/k-1]$ [177]. Toutefois, d'après Slatkin [178], il est peu probable que les processus de mutation au niveau des loci VNTRs suivent ce modèle.
- Le modèle GSM (« Generalized Stepwise Mutation model » ou modèle de mutation pas à pas généralisé) apparaît comme le modèle le plus réaliste développé jusqu'à présent. Le nombre de répétitions insérées ou supprimées dans une mutation est traité comme une variable aléatoire basée sur une distribution géométrique de paramètre p [171, 179, 180].

Pour les modèles de mutation vus précédemment, hormis pour le modèle IAM, les allèles peuvent muter pour atteindre un état allélique déjà présent dans une population d'origine conduisant à ce que l'on appelle de « l'homoplasie de taille » [181]. L'homoplasie se produit lorsque différentes copies d'un locus sont à un état allélique identique, bien que non-identiques par fait de descendance, c'est-à-dire qu'ils ne proviennent pas d'un même ancêtre commun [182]. Cette identité d'état allélique est générée par un grand nombre de mutations et est donc liée à la manière dont apparaissent les nouveaux allèles. Ainsi, l'homoplasie est implicitement due au type de modèle de mutation, il est donc impossible de les dissocier. Ce phénomène dépend des facteurs évolutifs des modèles de mutations tels que le taux de mutation, la taille efficace de la population et le temps de divergence entre populations [182]. L'homoplasie est manifestement importante à prendre en compte lors de l'étude des relations phylogénétiques entre les espèces et une question redondante est de savoir si cette homoplasie de taille affecte les études de génétique des populations. En effet, l'homoplasie de taille n'est pas toujours détectable. Le fait que les marqueurs suivent souvent le modèle SMM a permis le développement de nouvelles méthodes statistiques prenant en compte les tailles d'allèles, leur modèle de mutation et le risque potentiel d'homoplasie en introduisant le concept d'homoplasie de taille moléculairement accessible (« Molecularly Accessible Size Homoplasia » [MASH]) [182]. Il apparaît donc nécessaire de choisir des méthodes d'analyse basées sur les modèles de mutation appropriés ainsi que d'utiliser un grand nombre de marqueurs VNTR pour les analyses MLVA.

2.5.3. L'analyse MLVA chez les bactéries phytopathogènes

L'analyse MLVA consiste à déterminer le profil VNTR à différents *loci*. Bien que les analyses de génétique des populations basées sur les microsatellites et les minisatellites se soient fortement développées depuis les années 1990, ce n'est que récemment que l'analyse MLVA a été appliquée aux

bactéries phytopathogènes. Cette approche a été utilisée avec succès chez quelques bactéries phytopathogènes monomorphes ou faiblement polymorphes telles que :

- *Xylella fastidiosa* ; responsable notamment de la chlorose panachée des *Citrus*. Les analyses MLVA ont permis d'étudier l'influence de la plante hôte sur la structuration génétique des populations bactériennes de *X. fastidiosa* [145] ;
- *Xanthomonas citri* pv. *citri* (*Xcc*) ; responsable du chancre asiatique des agrumes. Un premier schéma MLVA a été développé permettant le suivi épidémique de populations bactériennes à une échelle spatio-temporelle réduite [142, 144]. Ces études ont mis en évidence la capacité de cette méthode à décrire la variation génétique de souches provenant d'un même pays ou provenant de pays voisins. Un second schéma MLVA a été développé, plus adapté à la caractérisation de la diversité génétique globale et permettant des études épidémiologiques à l'échelle mondiale [143] ;
- *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoo*) ; responsable des stries bactériennes du riz. L'analyse MLVA de cette bactérie a mis en évidence l'intérêt de la méthode dans le suivi épidémiologique et notamment dans la détermination de l'origine d'une épidémie [183]. Récemment, un schéma MLVA a été développé permettant la surveillance épidémiologique de ce pathogène et de *X. o.* pv. *oryzae* à une échelle globale mais aussi à une échelle spatio-temporelle réduite [184] ;
- *R. solanacearum* ; responsable du flétrissement bactérien [185, 186]. Quatre premiers schémas MLVA ont été développés pour le suivi épidémiologique et l'analyse de la structuration à l'échelle mondiale et régionale des populations bactériennes [187]. Plus récemment, un nouveau schéma MLVA a été développé permettant de retracer l'origine épidémiologique de souches présentes en Angleterre. Grâce à cette approche, les auteurs ont réussi à identifier la source de contamination des cultures de pomme de terre en amont de la Tamise [188] ;
- *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*) ; responsable de la bactériose vasculaire du manioc. Un schéma MLVA de 16 marqueurs a été publié basé sur le séquençage complet du génome de la souche CIO151. Ce schéma s'est révélé utilisable sur d'autres pathovars de *X. axonopodis* [189] ;
- *Erwinia amylovora* ; responsable du feu bactérien des Maloïdés. L'analyse MLVA a permis de déterminer la structure des populations d'*E. amylovora* à différentes échelles spatiales (à l'échelle mondiale, continentale, du pays et du verger) et temporelles (souches issues d'un même verger échantillonnées plusieurs années de suite) [190] ;
- *Xanthomonas arboricola* ; responsable de maladie bactérienne principalement sur des arbres fruitiers (pêcher, peuplier, noyé, prunier,...). Le développement d'un schéma MLVA basé sur *X. a.* pv. *pruni* (*Xap*) est aussi applicable sur les autres pathovars de *X. arboricola* [191].

- *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) ; responsable du flétrissement et du chancre bactérien de la tomate. L'utilisation d'un schéma MLVA de 8 VNTRs a permis aux auteurs de retracer l'origine d'une épidémie en 2010 et d'une autre épidémie en 2012 [192].

2.6. Analyse de la structure des populations

2.6.1. Différenciation génétique

En génétique des populations, une sous-population est généralement considérée comme le plus petit niveau de structure, que l'on nomme aussi « dème ». La structuration de ces populations et sous-populations reflète le nombre d'allèles échangés parmi ces populations et impacte directement la composition génétique de ces individus. Comprendre les flux de gènes et leurs effets est une question centrale en génétique des populations. Les échanges de gènes entre populations homogénéisent les fréquences alléliques entre les populations et déterminent l'effet relatif de la sélection ou de la dérive génétique. Un important flux de gènes empêche l'adaptation locale et va donc entraver le processus de spéciation [193]. Cependant, le flux de gènes génère du polymorphisme dans la population et augmente la taille efficace des populations locales, engendrant des combinaisons de nouveaux gènes sur laquelle la sélection peut potentiellement agir. Afin d'étudier la connexion et le modèle de flux de gènes, et de manière plus générale, d'estimer la structuration des populations, différents indices ont été développés [194, 195]. A l'origine, « l'index de fixation » a été développé par Wright pour estimer l'effet de l' « *inbreeding* » (dépression de vigueur due à l'état homozygote d'une population) au sein d'échantillons. Il définit ainsi cet effet en termes de coefficients de corrélation. Plus tard, il étend ce concept aux populations divisées en sous-populations, conduisant à l'étude de la structuration des populations en utilisant les « statistiques F de Wright », tel que le F_{IS} (qui estime la corrélation des gènes chez les individus au sein de la même sous-population), le F_{IT} (qui estime la corrélation des allèles chez les individus) et le F_{ST} (qui estime la corrélation entre deux allèles choisis aléatoirement dans une sous-population et les allèles choisis aléatoirement dans la population totale) [194, 195]. Plus récemment, un indicateur analogue au F_{ST} a été développé : le « R_{ST} de Slatkin » [178]. Il prend en compte le modèle de mutation SMM des marqueurs. L'avantage du R_{ST} réside aussi dans son pouvoir de discrimination plus élevé que le F_{ST} lorsque les loci suivent le modèle de mutation SMM. Les F_{ST} et R_{ST} sont les indicateurs les plus couramment utilisés pour l'estimation de la structuration des populations [196].

2.6.2. Déséquilibre de liaison et recombinaison

L'objectif premier de tout généticien des populations est de décrire les variations génétiques au sein d'une population naturelle et de déterminer les forces évolutives qui les génèrent. Ces variations sont, bien souvent, la résultante des cinq différentes forces évolutives façonnant les génomes procaryotes. Le déséquilibre de liaison ou DL (« linkage disequilibrium » [LD]), défini comme étant l'association statistique de deux allèles présents à deux *loci* différents dans une

population, est un bon indicateur du niveau de recombinaison d'une population [197], bien que peu sensible dans le cas des bactéries [129]. Plus les allèles sont physiquement proches, plus les allèles sont associés statistiquement. La détection du haut niveau d'équilibre de liaison entre les allèles chez les bactéries étudiées jusqu'à présent ainsi que l'existence de populations clonales [198] ont conduit les scientifiques à penser que la recombinaison entre bactéries était rare dans les populations naturelles et que la mutation ponctuelle était la source majeure de variation chez les bactéries [199]. Les données expérimentales ont démontré qu'en fait la recombinaison était commune chez les bactéries (Maynard [131] et que le niveau observé de DL était parfois dû à une certaine structuration écologique et géographique plutôt qu'à un faible taux de recombinaison.

L'importance de la recombinaison peut être étudiée en déterminant le niveau de congruence entre les arbres phylogénétiques des gènes de ménages. Lorsque la recombinaison est le principal mode de changement allélique, les analyses phylogénétiques sur un seul *locus* vont refléter les relations entre les allèles au *locus* concerné plutôt que la relation phylogénétique entre les isolats possédant cet allèle. On s'attend ainsi à observer des incongruences entre les arbres phylogénétiques pour les gènes étudiés sur les mêmes isolats. Déterminer la nature, la fréquence et l'importance de la recombinaison est essentiel pour la compréhension de l'évolution des bactéries. La recombinaison est due à trois mécanismes : la transformation, la transduction et la conjugaison. Cependant d'autres facteurs comme la dérive génétique, les mutations, la sélection ou encore l'absence de recombinaison régulière peuvent générer du déséquilibre de liaison [131, 200].



Figure 15. Symptômes de flétrissement bactérien causés par *R. solanacearum*. (A) Sur aubergine cultivars sensible 'E8' : (B) sur tomate cultivars sensible 'Farmer' (photo : J. Guinard, CIRAD, Saint Pierre).

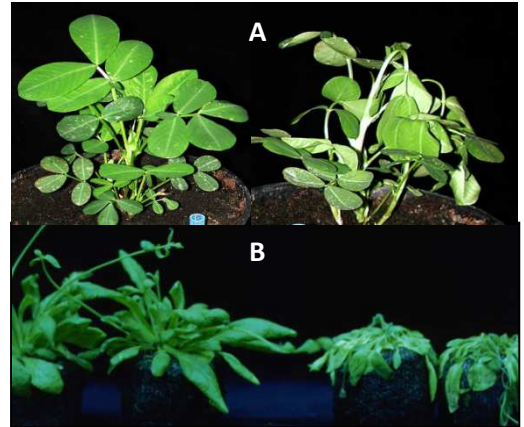


Figure 14. Symptômes de flétrissement bactérien causés par *R. solanacearum* sur des plantes modèles. (A) *Medicago truncatula* et (B) *Arabidopsis thaliana*.



Figure 18. Symptômes de la maladie de Moko sur bananier causé par *R. solanacearum*.



Figure 17. Symptômes de jaunissement des feuilles associés à de la nécrose des nervures sur *Anthurium* dû à *R. solanacearum* (photo : FREDON, Martinique).

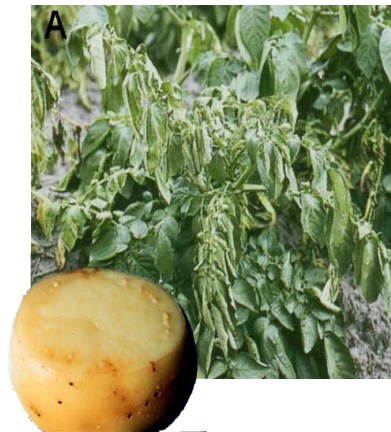


Figure 16. Symptômes de la pourriture brune sur pomme de terre causé par *R. solanacearum*.



Figure 19. Symptôme de flétrissement bactérien sur Concombre (*Cucumis sativus* ; photo : E. Wicker, CIRAD, Martinique).

3. *Ralstonia solanacearum*, l'agent du flétrissement bactérien

3.1. Symptomatologie et distribution géographique

Ralstonia solanacearum est une Beta-Protéobactérie tellurique capable d'infecter plus de 250 espèces hôtes appartenant à 54 familles botaniques différentes, incluant des monocotylédones et des dicotylédones [201]. *R. solanacearum* attaque des cultures alimentaires et ornementales présentant un intérêt économique majeur ; elle est notamment responsable du flétrissement soudain et irréversible de l'appareil végétatif aérien des Solanacées à graines (tomate, aubergine, piment ou tabac ; **Figure 14**), dont les symptômes sont semblables à ceux d'un manque d'eau [185, 202]. Cependant, l'intensité des symptômes et leur vitesse d'apparition dépendent de l'hôte, du potentiel d'inoculum, de la nature de la souche, mais aussi des conditions agro-environnementales. Chez les Solanacées, le premier symptôme visible est le flétrissement et l'épinastie, c'est à dire l'enroulement des feuilles, avec un infléchissement des pétioles vers le bas (**Figure 14.B**). Le flétrissement des feuilles peut parfois être accompagné de tâches nécrotiques. *R. solanacearum* provoque aussi du flétrissement bactérien sur les plantes modèles *Medicago truncatula* et *Arabidopsis thaliana* (**Figure 15.A et 15.B** respectivement). Elle est aussi responsable de la « maladie de Moko » ou « maladie de Bugtok » sur les Musacées (banane-dessert et bananier-plantain ; **Figure 16**) [203, 204] ainsi que de la pourriture brune sur pomme de terre (« Potato Brown Rot » ; **Figure 18**). Elle attaque également les Aracées (*Anthurium*) chez qui elle provoque le jaunissement des feuilles et des spots nécrotiques (**Figure 17**) ou encore les Cucurbitacées chez qui elle provoque le flétrissement foliaire et caulinaire [186, 205] (**Figure 19**).

De par sa gamme d'hôtes et les pertes économiques qu'elle provoque (plus d'1M\$ par an rien que pour les cultures de pomme de terre [206]), *R. solanacearum* a été inscrite sur la liste A2 des agents pathogènes de quarantaine de l'Organisation Européenne et méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) et de l'Union Européenne (UE) depuis 1975, et classée comme un agent du bioterrorisme aux États-Unis [207]. *R. solanacearum* est présente sur les 5 continents (**Figure 20**) d'après les synthèses de l'OEPP et du « Centre for Agricultural Bioscience International » (CABI), essentiellement en zone tropicale et subtropicale (Asie, Afrique et Océan Indien, Amérique centrale et du sud). *R. solanacearum* a été identifié en Asie, principalement en Chine [208, 209], en Inde [210-212], en Malaisie [213, 214] ainsi qu'à Taïwan [215]. *R. solanacearum* est aussi très présente en Afrique, mais seules quelques études se sont intéressées à leur diversité, notamment au Nigeria [216], au Cameroun [217], au Mali [218] et ainsi qu'en Côte d'Ivoire [219], en Ethiopie [220] et au Bénin [221]. En Amérique centrale et du sud, *R. solanacearum* a principalement été caractérisée dans les Caraïbes [166, 205, 222], à Porto Rico [223], au Brésil [224-226], au Guatemala [227], au Paraguay [228] et en Uruguay [229]. Cette maladie a aussi été identifiée en situation endémique dans certains Départements et Régions d'Outre-Mer français (DROM : Antilles, Guyane, Réunion et Mayotte) [202, 205], dans les Collectivités d'Outre-Mer (COM ; Nouvelle Calédonie) [230] ainsi que dans différentes îles du sud-ouest l'océan indien (Noura Yahiaoui et Santatra Ravelomanantsoa, comm. pers. 2015).

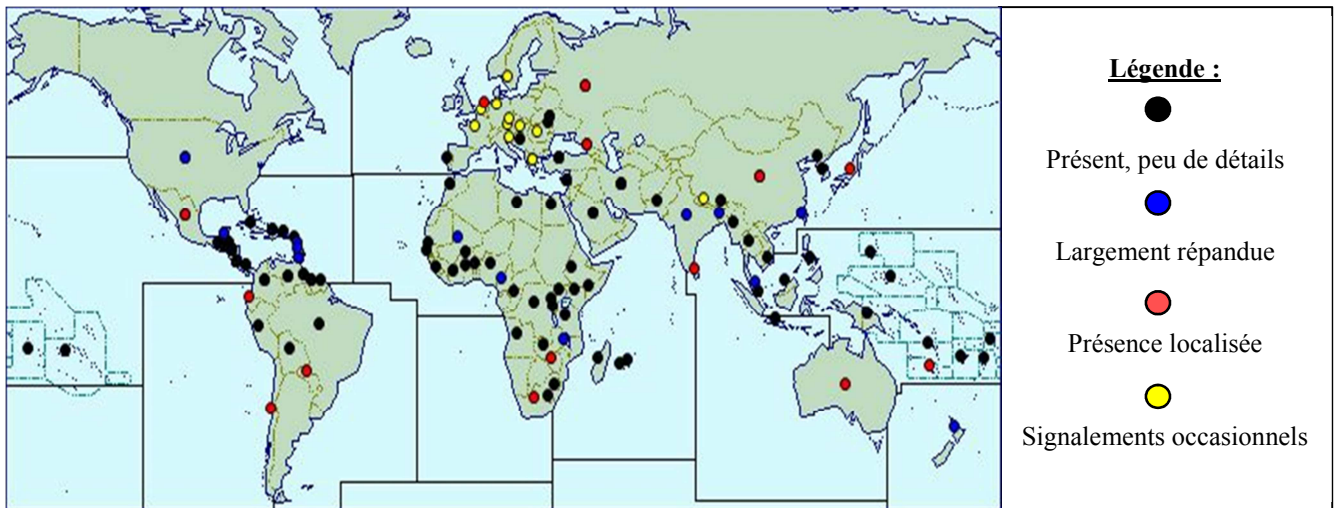


Figure 20. Répartition mondiale de *R. Solanacearum* sur les 5 continents (source: www.cabi.org).



Figure 21. Cycle infectieux de *R. solanacearum*. (1) *R. solanacearum* est capable de vivre dans le sol pour une longue période. Une fois en contact de la plante hôte, (2) la bactérie est capable d'entrer dans les tissus racinaires de la plante et d'envahir le système vasculaire (3). Les symptômes de flétrissement sont associés à une forte multiplication dans les vaisseaux du xylème et à une production abondante d'exopolysaccharides (4). La maladie conduit souvent à la mort de la plante (5) mais cela dépend de plusieurs facteurs tels que l'hôte, les facteurs environnementaux et l'agressivité de la souche. D'après Genin [246].

Certaines souches, plus adaptées aux conditions environnementales froides [231], sont actuellement présentes dans les zones tempérées, notamment en Amérique du Nord [232, 233] et en Europe : en Espagne [234], au Portugal [235], en Italie [236], et plus récemment en Angleterre [188] et en Serbie [163, 237].

3.1.1. Cycle de vie

R. solanacearum se développe sous une forme infectieuse dans une plante-hôte où elle provoque les symptômes précédemment décrits [238]. Elle peut aussi se développer sous une forme d'infection latente, c'est-à-dire qu'elle est capable d'infecter la plante hôte sans provoquer de symptômes, comme cela a été montré sur le géranium (*Pelargonium hortorum*) [239, 240]. *R. solanacearum*, considérée comme une bactérie tellurique, débute le processus de colonisation par l'adhésion de la bactérie à la surface racinaire, attirée par chimiotactisme [241]. *R. solanacearum* pénètre ensuite dans la plante soit par des blessures, soit par des ouvertures naturelles dues à l'émergence de la racine principale ou des racines adventives (d'élongation au niveau de l'apex racinaire) (Kelman [242], 1965). Cependant, les plantes peuvent aussi être infectées par la bactérie lors d'utilisation d'outils contaminés (sécateurs, machettes, etc.). Ensuite, elle colonise le cortex racinaire en passant par les espaces intercellulaires du parenchyme racinaire, produisant des exopectinases pour pouvoir pénétrer dans les tissus du xylème (**Figure 21.3**). Les bactéries progressent alors jusque dans la tige des plantes où elles se multiplient au travers de l'endoderme jusqu'au cylindre central et produisent des expolysaccharides (EPS) [243]. Ces EPS empêchent la circulation d'eau dans la plante et provoquent donc le flétrissement bactérien. C'est à ce stade de l'infection, lorsque la bactérie a envahi les vaisseaux de la plante, que commencent à apparaître les symptômes (**Figure 21.4**), d'abord sur les feuilles jeunes, puis sur toute la plante, qui finit par mourir (**Figure 21.5**). Ces symptômes apparaissent à partir du moment où la concentration bactérienne atteint 10^7 CFU.g de tissu frais⁻¹ [244]. La bactérie retourne alors au sol (**Figure 21.5**) où elle peut survivre plusieurs années en fonction du taux d'humidité du sol et vraisemblablement de la capacité de *R. solanacearum* à dégrader les débris de plantes contaminées et de métaboliser les dérivés aromatiques de la lignine (férulate, acide vanillique, hydroxybenzoates de propyle et protocatechuates) [245, 246]. Ainsi, une fois la plante tuée par l'agent pathogène, elle continue à fournir un environnement favorable pour le développement de *R. solanacearum* dans le sol. *R. solanacearum* peut aussi survivre en colonisant des plantes adventices hôtes ou en colonisant la rhizosphère de plantes non hôtes [247]. *R. solanacearum* est donc hémibiotrophe : elle réalise d'abord une phase de biotrophie pendant laquelle elle se nourrit des cellules végétales, et réalise ensuite une phase nécrotrophe [248].

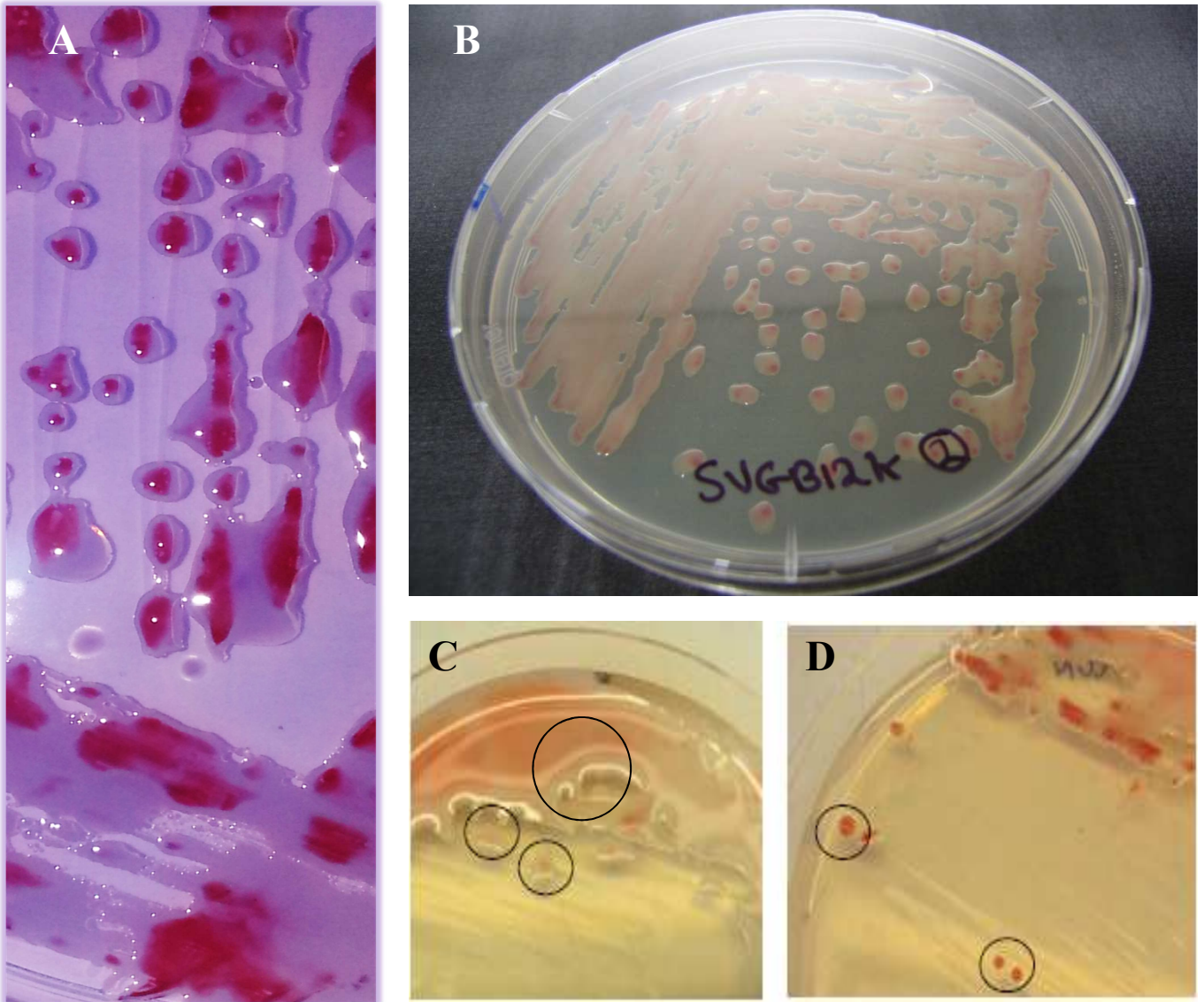


Figure 22. Phénotypes de *R. solanacearum* sur différents milieux de cultures. (A) Colonies de *R. solanacearum* à l'état virulent muqueux sur milieux de culture Sequeira (B et C) et sur milieu de culture Kelman. (D) Colonies à l'état avirulent rugueux sur milieu Kelman (Photos : A. Muhamad, 2009, F. Pensec, 2010 et J.Guinard, 2013).

1.1.1. Modes de conservation et de dissémination

Les propriétés physico-chimiques des sols conditionnent la durée de survie de *R. solanacearum* mais cette bactérie n'est pas un compétiteur suffisamment efficace par rapport à la microflore du sol [249]. La température et l'humidité sont des facteurs-clés intervenant dans la survie de la bactérie ainsi que dans l'expression de la maladie [250, 251]. *R. solanacearum* peut aussi survivre dans l'eau à l'état planctonique, malgré une privation prolongée de nutriments [202]. En conditions expérimentales, il a été démontré que *R. solanacearum* était toujours capable de provoquer du flétrissement bactérien après 132 jours d'incubation de la bactérie dans de l'eau ultrapure [251]. Les plantes adventices sont également propices à la conservation de *R. solanacearum* et peuvent ainsi constituer des réservoirs d'inoculum [247, 250]. Parmi les nombreuses voies de dissémination de *R. solanacearum*, l'homme joue un rôle prépondérant dans sa propagation à l'échelle à la fois mondiale et locale. En effet, il est responsable d'épidémies déclenchées par l'utilisation d'outils contaminés lors d'interventions culturales ou par l'utilisation de matériel végétal abritant des populations de *R. solanacearum* [250, 252]. La dissémination de cette maladie peut également se faire de plante à plante.

En effet, une plante flétrie génère dans le sol une grande quantité d'inoculum qui peut contaminer les plantes environnantes, contamination que l'on qualifie de « proche en proche » [242]. Ce type de contamination de plante à plante a aussi été démontré en parcelle expérimentale récemment [233]. Les eaux de ruissellement et d'irrigation sont aussi une source de dissémination de la maladie à l'échelle de la parcelle et du bassin versant [188, 253].

1.2. Morphologie, physiologie, taxonomie et phylogénie

1.2.1. Caractéristiques morphologies et physiologiques

Sur un milieu semi-sélectif Kelman [186], les colonies de *R. solanacearum* peuvent présenter deux phénotypes : muqueux ou rugueux (**Figure 22**). Les colonies dites « muqueuses » sont ovoïdes, de couleur crème opaque en raison de son abondante sécrétion d'EPS, avec une coloration rose, voire rouge, décentrée (pigmentation due à la dégradation du tétrazolium en formazan) (**Figure 22.B et C**). Les colonies dites « rugueuses » sont rondes, sèches et colorées d'un rouge vif en leur centre [186] (**Figure 22.D**). Le phénotype muqueux conserve sa virulence tandis que le variant rugueux est avirulent. Le passage d'un phénotype muqueux à un phénotype rugueux (et vice-versa), est un phénomène spontané et réversible appelé « variation de phase » due à des mutations dans le locus *phcA* [254]. Cette variation de phase peut être induite par les exsudats racinaires de la plante [254].

1.2.2. Classification en race, biovars et écotypes

R. solanacearum est une bactérie gram-négative appartenant à la classe des Beta-Protéobactéries. Il existe chez *R. solanacearum* une très grande variabilité génotypique et

phénotypique au vu de la large gamme d'hôtes de cette bactérie. Cette bactérie a ainsi été considérée comme un complexe d'espèces [255, 256] et sa taxonomie a été modifiée à maintes reprises. Différents systèmes de classification ont été définis afin de caractériser au mieux la large diversité existante au sein de ce complexe d'espèces.

Les premières classifications comportaient cinq « races » et six « biovars ». La classification en races a été définie selon des caractéristiques de la gamme d'hôtes [257]. Les souches appartenant à la race 1 sont ubiquistes et attaquent un nombre important d'hôtes, parmi lesquels les Solanacées à graines (tomate, aubergine, piment, tabac), certaines adventices et le bananier diploïde (*Ensete ventricosum*). Ces souches sont principalement inféodées aux environnements tropicaux et subtropicaux. Les souches appartenant à la race 2 possèdent un spectre d'hôtes plus étroit que celles de la race 1, provoquant la « maladie de Moko » sur le bananier triploïde et sur *Heliconia*. Ces souches sont restreintes aux environnements tropicaux. Les souches de la race 3 attaquent préférentiellement la tomate et la pomme de terre, ainsi que le géranium, mais sont peu virulentes sur les autres Solanacées. Cette race est surtout caractérisée par son aptitude à provoquer des symptômes à des températures fraîches (18-24°C), et se retrouve principalement dans les régions montagneuses tropicales et dans les zones tempérées. Les souches de la race 4 sont particulièrement virulentes sur le gingembre comestible (*Zingiber officinalis*), et celles inféodées à la race 5 infectent et provoquent la maladie sur murier en Chine. La classification en « biovar » repose sur la capacité à utiliser et/ou oxyder trois hexoses alcools (sorbitol, manitol et dulcitol) et trois disaccharides (lactose, manose et cellobiose ; **Tableau 1**) [201]. Au sein de *R. solanacearum* on distingue également plusieurs écotypes. Un écotype a été défini comme étant un groupe de souches étant écologiquement similaire les unes aux autres et dont la diversité génétique est limitée par une force évolutive cohésive, combinaison de sélection et de dérive génétique [258]. Dans le cas de *R. solanacearum*, un écotype rassemble des souches partageant une même gamme d'hôte et possèdent des traits écologiques proches, notamment l'aptitude à induire une maladie en températures tempérées. L'écotype « Moko » (IIA) regroupe les souches affectant les Musacées (bananier, plantain, *Heliconia*...), alors que l'écotype « Blood Disease Bacterium » (BDB, IV) n'est pathogène que sur bananier. L'écotype « Brown rot » (IIB) regroupe les souches capables d'induire la maladie à des températures fraîches et sont pathogènes de la pomme de terre [259]. L'écotype « émergent » (IIB-4NPB) est hautement pathogène sur Aracées, Solanacées et Cucurbitacée mais non-pathogène sur bananier dessert [205]. L'écotype « Murier » (I, séquévar 12) est inféodé à cet hôte [260]. La classification en écotype est intéressante pour la description de la diversité écologique de *R. solanacearum* mais elle n'a cependant aucune valeur phylogénétique [261]. En effet, certains écotypes sont polyphylétiques, notamment l'écotype « Moko » qui se place dans les clades 2, 4 et 5 [166]. Cependant, ces systèmes de classification représentent mal la variabilité de l'agent pathogène. Le développement des techniques liées au polymorphisme de l'ADN a révolutionné la taxonomie intra-spécifique de *R. solanacearum* et a démontré le faible pouvoir de discrimination de ces techniques rendant les classifications en « biovar » et « race » obsolètes.

Tableau 1 : Capacité des différents Biovars à dégrader les différents alcools et sucres [201].

	Biovars					
	1	2	2T ou N2	3	4	5
Cellobiose	-	+		+	-	+
Lactose	-	+		+	-	+
Maltose	-	+		+	-	+
Mannitol	-	-		+	+	+
Dulcitol	-	-		+	+	-
Sorbitol	-	-		+	+	-
D-tréhalose	+	-	+	+	+	+

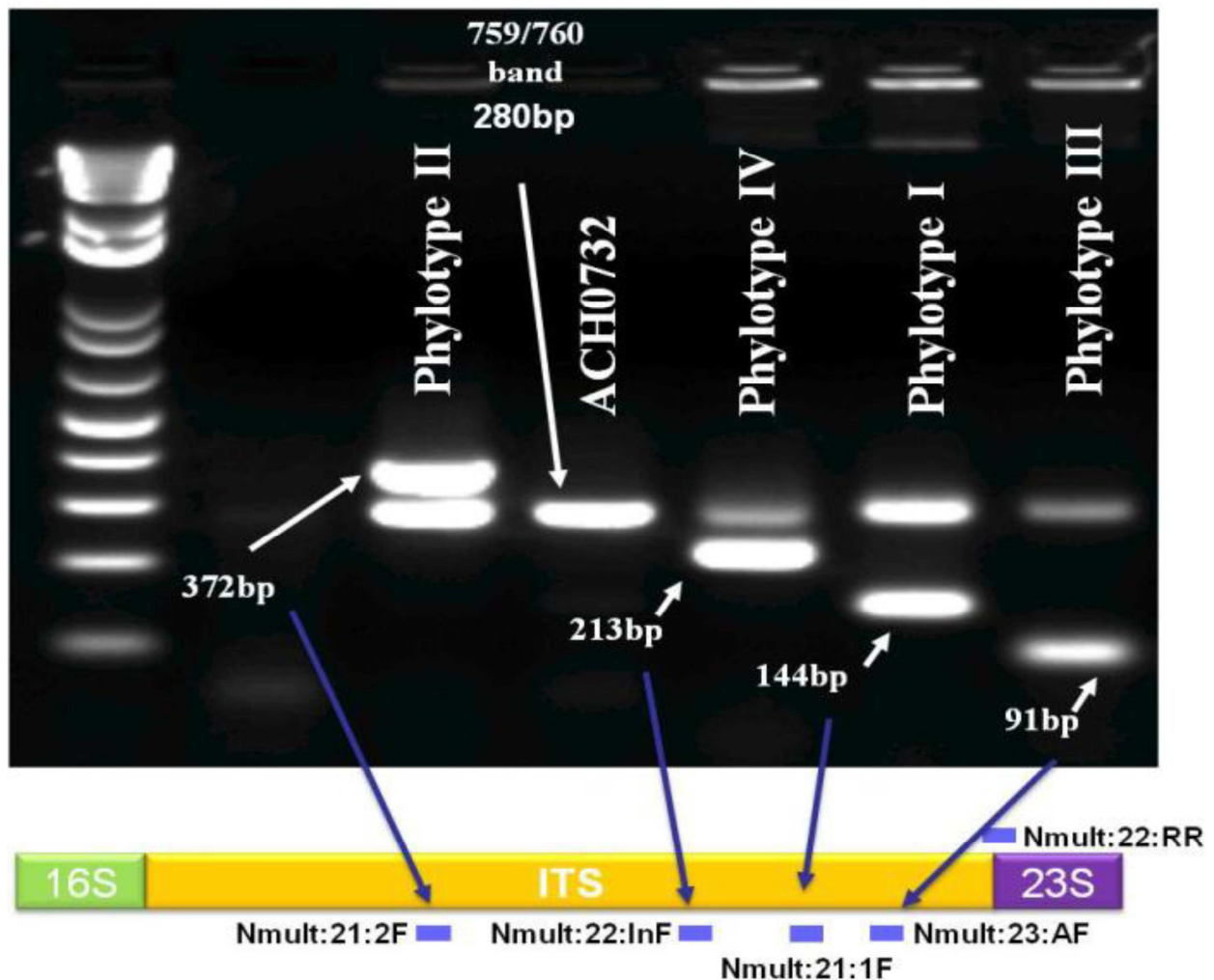


Figure 23. Gel d'électrophorèse type de diagnostic de *R. solanacearum* par PCR multiplex (Pmx-PCR), avec les sites d'hybridation des amorces. Les puits 1 à 7 représentent respectivement le marqueur de poids moléculaire de 100 pb, le témoin négatif (H₂O), le phylotype II, le fragment spécifique au complexe d'espèces *R. solanacearum*, le phylotype IV, le phylotype I et le phylotype III. D'après [256, 265].

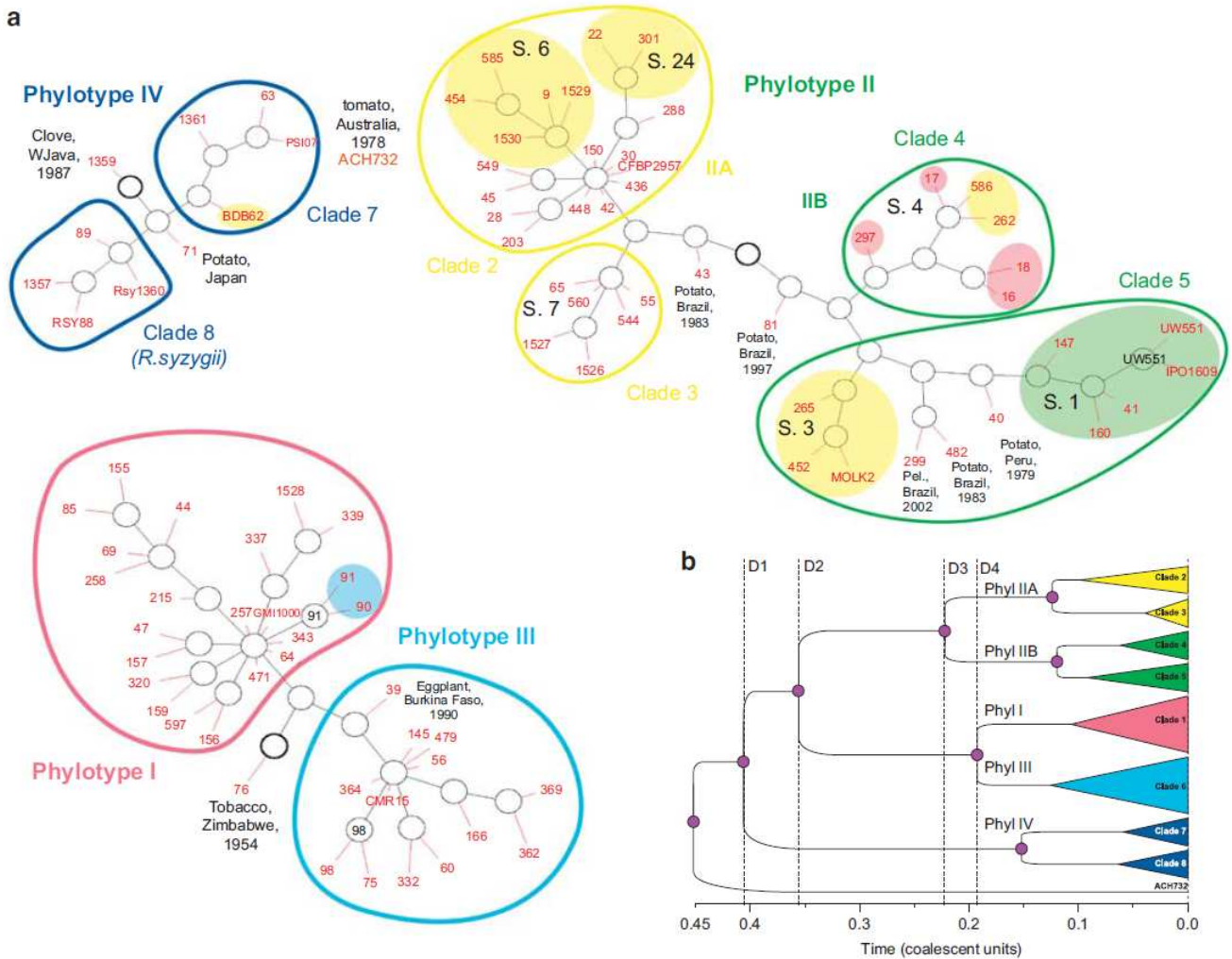


Figure 24. Généalogie des phylotypes et des clades de *Ralstonia solanacearum*. (a) Réseau généré par ClonalFrame. Les nœuds ancestraux pour chaque réseau sont identifiés par un cercle noir foncé et les souches sont écrites en rouge [266]. Les souches utilisées dans cette étude sont identifiés par leur numéro RUN. L’ombrage jaune correspond aux souches capable d’infecter les bananiers et donc inféodées à l’écotype “Moko” (IIA/séquevars 6 and 24, IIB/séquevars 3 et 4) et BDB (IV/séquevar 10). L’ombrage vert indique les souches “Brown rot” (IIB/sequevar 1, anciennement race 3/biovar 2) attaquant préférentiellement la pomme de terre et la tomate et adaptées aux températures fraîches [259]. L’ombrage rouge indique les souches de l’écotype “émergent” pathogènes des Aracées, des Solanacées et des Cucurbitacées mais elles ne sont pas pathogènes des bananes desserts [205]. L’ombrage bleu indique des souches infectant le mûrier (race 5/biovar 5). S. = Séquevars définis d’après le polymorphisme du gène *egl* [256]. Les souches recombinantes, ou intermédiaires évolutifs (1359 et 71 dans le phylotype IV; 43, 81, 299, 482 et 40 dans le phylotype II; 76 et 39 dans les phylotypes I and III) sont identifiés par leur n° RUN, leur hôte et pays d’origine, et année d’isolement. Clove= giroffier, Potato=pomme de terre, Tomato=tomate, Tobacco=tobac, Pel = *Pelargonium* sp. (b) Représentation schématique de l’arbre majoritaire issu de la distribution postérieure des généalogies inférées par ClonalFrame. D1= divergence entre phylotypes IV et I/II/III; D2= divergence entre phylotypes II et I/III; D3= divergence entre IIA et IIB; D4= divergence entre phylotypes I et III. D’après [166].

1.1.1. Classification en phylotypes, clades et séquévars

A l'aide de marqueurs RFLP [262], ont montré l'existence de deux grandes divisions, « *Asiaticum* » (regroupant les biovars 3, 4 et 5) et « *Americanum* » (regroupant les biovars 1, 2 et N2), et de 41 génotypes multilocus (MLG). Les travaux sur le polymorphisme des séquences partielles des régions ITS (Internal Transcript Spacer) entre l'ADNr 16S et 23S, des gènes *egl* et *pgl* ont confirmé l'existence de ces deux divisions et ont également mis en évidence un troisième groupe originaire d'Indonésie [263]. Les analyses par PCR-RFLP sur le gène *hrp* ainsi que le séquençage des gènes *egl*, *hrpB* [264] et *mutS* [256] ont révélé l'existence d'un quatrième groupe originaire d'Afrique, anciennement englobé dans le biovar 1.

Fegan et Prior [267] ont proposé un système de classification hiérarchique en phylotypes aujourd'hui largement acceptée par la communauté scientifique. Ils ont défini un phylotype comme étant un groupe monophylétique révélé lors d'analyse de séquences de la région ITS, du gène *hrpB*, du gène *egl* et du gène *mutS*. Quatre phylotypes distincts ont ainsi été identifiés, correspondant à des souches d'origines géographiques différentes [268]. Une PCR multiplexe (« Phylotype-multiplex-PCR » ou Pmx-PCR) a ainsi été développée pour permettre l'identification rapide des souches suspectées comme appartenant à *R. solanacearum* [268]. Cette Pmx-PCR comprend un couple d'amorces, 759F/760R [265], générant un fragment de 280 pb spécifique à ce complexe d'espèces (séquence partielle du gène *lpxC*, codant pour l'UDP-3-O-acyl N-acetylglucosamine deacetylase). Le phylotype des souches est déterminé à l'aide d'amorces ciblant la région génomique de l'ITS (Internal Transcript Spacer). Chaque phylotype génère un fragment de taille spécifique (**Figure 23**).

Le phylotype I rassemble des souches d'origine asiatique, les souches du phylotype II sont d'origine américaine, le phylotype III regroupe des souches d'origine africaine et les souches du phylotype IV sont d'origine indonésienne. Le phylotype II (américain) est subdivisé en deux groupes dont les dynamiques évolutives sont assez différentes : le phylotype IIA, comprenant des souches à large spectre, et le phylotype IIB, comprenant des souches spécialisées sur bananier (souches dites « moko », séquévar 3) et sur pomme de terre (souches dites « brown rot », séquévar 1). On retrouve dans ce dernier sous-groupe le séquévar 4NPB (Non Pathogène sur Bananier) regroupant des souches émergentes de gamme d'hôtes très larges, et virulentes même sur les tomates résistantes aux phylotypes I et II [269]. Le phylotype IV a la particularité de regrouper des souches de *R. solanacearum* de BDB (« Blood Disease Bacterium ») responsable de la maladie du sang sur bananier (*Musa sp.*), et de *R. syzygii* responsable de la maladie de Sumatra sur giroflier [263, 270]. Par la suite cette classification en phylotypes a été confirmée par des études ciblant des gènes répartis sur le chromosome et sur le mégaplasmide (MLSA/MLST) [165] mais aussi à l'échelle du génome entier par une puce à ADN [271].

Une étude récente basée sur une analyse de séquences multilocus (MLSA) a proposé une classification en cinq lignées évolutives (I, IIA, IIB, III, IV) et en 8 clades [166] (**Figure 24**). Les différents phylotypes se distinguent par des histoires démographiques et des taux de recombinaison

très spécifiques : hautement recombino-gène et en expansion démographique pour les phylotypes I et III ; hautement recombino-gène mais stable démographiquement pour le phylotype IV; recombino-gène et en faible expansion pour le phylotype IIA ; clonal pour le phylotype IIB. Cette étude a également permis de préciser le profil de spéciation entre les phylotypes. Le phylotype IV est considéré comme le groupe le plus ancestral, tandis que le phylotype I et III et le phylotype II ont divergé dans les mêmes périodes. Enfin, la divergence entre les phylotypes I et III d'une part, et IIA et IIB d'autre part, seraient également contemporaines.

Complexe d'espèces		<i>Ralstonia solanacearum</i>																					
Espèce génomique (Remenant 2010, 2011)		<i>R.sequeirae</i>						<i>R.solanacearum</i>						<i>R.haywardii</i>									
Phylotype		I			III			IIA			IIB			IV									
Clade		1			6			2		3	4		5		ND	7		8	ND				
Séquévares basés sur <i>Egl</i>		13	30	44	16	12	19	42	29	6	5	39	7	4A	4NPB	1	3	25	28	8	10	9a	11
14	31	45	20	43			35	41			4SFR	51		2	26								
15	32	46	21	44			36	50			24	27		2									
17	33	47	22	48			37	52															
18	34	48	23	49			38	53															
Biovar		3			4	5	1	2T	1			1	1	2	1	2T		2T	BDB	RSY	2		
Race		1		4	5	2			1		2	3		2									

Tableau 2. Correspondance entre les espèces génomiques, les clades, les phylotypes, les séquévares et les anciennes classification race et biovars. D'après [166, 256, 272-274].

Chacun des phylotypes est subdivisé en séquévares. Les souches regroupées en un même séquévar possèdent moins de 1 % de variation sur la séquence nucléotidique de l'endoglucanase *egl*. A l'heure actuelle, 54 séquévares ont été décrits dont peu correspondent exactement aux clades (séquévar 7 = clade 3). Le seuil de subdivision des séquévares n'a cependant aucune justification phylogénétique et la correspondance entre séquévares et écotypes se révèle de plus en plus ténue avec le grand nombre de séquences disponibles. Cette classification est probablement appelé à disparaître aux profils d'une classification en « Sequence Type » (ST), plus conforme aux pratiques d'épidémiologie en microbiologie médicale ou animale. La correspondance entre phylotypes, clades, séquévares et les anciennes classifications est résumée dans le **Tableau 2**.

1.1.2. Classification en espèce génomique

Récemment, une publication a proposé de reclasser *R. solanacearum* en trois espèces génomiques grâce à une approche de génomique comparative [272]. Les auteurs proposent de conserver les souches assignées au phylotype II sous le nom *R. solanacearum* avec comme souche de référence : K60^T (= ATCC11696^T = LMG2299^T). Les souches appartenant à cette espèce génomique présentent un certain degré de divergence génomique, reflet de la limite de la définition d'espèce basée sur les distances génomiques. Cependant, ces souches arborent des propriétés phénotypiques similaires et peuvent ainsi être considérées comme une seule espèce génomique [275]. Les souches appartenant au phylotype I et III seraient regroupées en une unique espèce génomique appelée *Ralstonia sequeirae* subsp. nov avec comme souche de référence GMI1000^T (=UQRS442^T =JS753^T). Les souches appartenant à ces phylotypes sont dénitrifiantes et sont génétiquement proches [276] malgré une adaptation à des températures différentes. En effet les souches de phylotype III ont initialement été observées dans les régions montagneuses alors que les souches appartenant au phylotype I sont souvent isolées en région tropicale de plaine. Finalement, les souches BDB, *R. syzygii* et les souches de phylotypes IV de *R. solanacearum* formeraient une troisième espèce génomique à part entière regroupées sous le terme *R. haywardii* subsp. nov. Malgré leurs phénotypes et leurs cycles de vies contrastés ces souches sont génétiquement proches et présentent un métabolisme similaire. Cette dernière espèce génomique a ainsi été subdivisée en :

- *R. haywardii* subsp. *solanacearum* subsp. nov (souche de référence UQRS464^T = PSI07^T =LMG27703^T =CFBP7288^T) : elles regroupent les souches de *R. solanacearum* phylotype IV ;
- *R. haywardii* subsp. *celebensis* subsp. nov. (souche de référence R229^T = NCPP3726^T = ICMP10001^T) : elles regroupent les souches BDB provoquant la maladie du sang sur bananier en Indonésie ;
- *R. haywardii* subsp. *syzygii* subsp. nov. (souche de référence R001^T =NCPPB3446^T =LMG10661^T) : elles regroupent les souches de *R. syzygii* transmises par *Hindola spp.* un insecte appartenant aux cercopoïdae, ayant la particularité d'avoir une gamme d'hôte limitée au giroflier. Ces souches provoquent la maladie de Sumatra [277].

Safni et coll. [274] ont démontré la validité de cette classification en 3 espèces génomiques par des analyses phylogénétiques en utilisant les séquences partielles des régions ITS (Internal Transcript Spacer) entre l'ARNr 16S et 23S, les séquences partielles du gène *egl* et l'hybridation ADN-ADN. Cependant, ils ont proposé de rebaptiser *R. sequeirae* subsp. nov. en *R. pseudosolanacearum* subsp. nov., *R. haywardii* subsp. en *R. syzygii* subsp. et *R. haywardii* subsp. *solanacearum* subsp. nov en *R. haywardii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov afin de respecter les règles internationales de taxonomie [278] ainsi que de changer certaines souches de référence [274]. Une étude comparative basée sur le séquençage à haut débit de 29 génomes de *R. solanacearum* et sur l'analyse des profils protéomiques obtenus par spectrométrie de masse [276] est venue confirmer les résultats de ces deux dernières études, à quelques modifications près. En effet, le nom « *R. pseudosolanacearum* » suggère que le

phylotype I et le phylotype III causent différents symptômes comparé aux autres phylotypes, ce qui n'est pas le cas. Les auteurs ont donc proposé de renommer cette espèce en *R. sequeirae* subsp. nov, et de remplacer la souche de référence par GMI1000. Les souches de *R. solanacearum* phylotype IV ne sont pas géographiquement restreintes à l'Indonésie, les auteurs proposent donc de renommer *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. en *R. syzygii* subsp. *haywardii* subsp. nov. [275]. Concernant *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov., les auteurs proposent plutôt d'utiliser R229^T (=NCPBP3726^T =ICMP100001^T) comme souche de référence.

Cette classification en espèce génomique est donc encore controversée. Par ailleurs, il reste à identifier les patterns d'isolement génomique (absence de recombinaison) qui valideraient pleinement ces espèces.

1.2. Structuration et plasticité du génome

À ce jour, les séquences génomiques de 40 souches représentatives des quatre phylotypes de *R. solanacearum* ont été publiées [275, 279-281]. Le séquençage de ces génomes facilite les analyses pan-génomiques permettant de déterminer, entre autres, la conservation des effecteurs de type III chez cet agent pathogène et les contraintes sélectives qu'ils subissent, ou de vérifier si les répertoires de gènes sont partagés chez les souches pathogènes d'un même hôte, comme l'illustre le cas de *Pseudomonas syringae* [58, 282].

Le génome de *R. solanacearum* est organisé en deux réplicons circulaires, chromosome et mégaplasmide, dont les tailles sont respectivement de 3,7 Mb et 2,1 Mb chez la souche de référence GMI1000 [283]. Le chromosome comprend environ 80% des gènes de ménage codant les fonctions du métabolisme primaire de la bactérie. Le mégaplasmide porte, quant à lui, la plupart des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de la bactérie et dans l'adaptation à son environnement [273]. Parmi ces gènes se retrouvent notamment les gènes codant les constituants du système de sécrétion de type III (SST3) et ses protéines effectrices, les gènes codant les constituants des flagelles et les gènes contrôlant la biosynthèse extracellulaire des EPS. Les phylogénies établies d'après les gènes du chromosome sont hautement congruentes avec celles établies sur les gènes du mégaplasmide, indiquant que ces deux réplicons ont partagé une longue coévolution [271, 284]. Cependant, ces deux réplicons présentent des dynamiques évolutives différentielles. En effet, le chromosome semble présenter un flux de gènes moins important que le mégaplasmide qui montre des « hots-spots » de gain et de perte de gènes. Ces résultats concernent certaines classes de gènes, tels que les gènes de transcription, de motilité bactérienne et les gènes codant la biosynthèse et le transport des métabolites secondaires, qui sont sur-représentés chez le mégaplasmide par rapport au chromosome [284].

La grande plasticité génomique de *R. solanacearum* s'illustre par la structure du génome en mosaïque et par la présence de grandes régions à fort biais d'usage de codons et d'îlots génomiques [271-273, 283, 285-288]. Ainsi, il a été estimé que 16% du génome de la souche GMI1000, incluant des gènes clés du pouvoir pathogène, a été acquis au cours de l'évolution par transferts horizontaux

[289]. Cette forte proportion serait liée à la compétence développée par cette bactérie, permettant la transformation naturelle des souches de *R. solanacearum* [290]. Coupat et coll. [291] ont démontré que 80% des souches de *R. solanacearum* sont capables de transformation naturelle et que des fragments d'ADN de 30 à 90 kb peuvent être transférés entre les souches. La capacité d'échanger des gènes de virulence par transferts horizontaux pourrait ainsi jouer un rôle majeur dans l'évolution rapide de la pathogénicité des souches de *R. solanacearum* [292]. Une analyse de génomique comparative de 8 souches représentatives des quatre phylotypes de *R. solanacearum* montre que le *core*-génomme comprend environ 2850 gènes (représentant entre 50,6 et 61,6% de contenu en gène) alors que le génome variable compte 3100 gènes [272]. Récemment, en utilisant les données génomiques de 19 souches (dont 8 néo-séquencés) appartenant principalement au phylotype II, Ailloud et coll. [275] ont montré que pour ces souches le *core*-génomme de *R. solanacearum* comprenait 1940 gènes représentant entre 33,9 et 38,6% du contenu total en gène du génome. Ces études montrent l'une des limites de ce type d'approche : la taille du *core*-génomme est dépendante du nombre de souches que l'on étudie, de leur proximité phylogénétique, et de leur habitat d'origine. Ces *core*-gènes sont en faible proportion comparés à d'autres bactéries ayant un génome de même taille comme par exemple *P. syringae* qui compte environ 3400 *core*-gènes représentant 62 à 100% du génome des souches étudiées [282]. Ce constat illustre une nouvelle fois l'importance de la diversité génétique du complexe d'espèces *R. solanacearum* [293].

1.3. Les déterminants du pouvoir pathogène de *R. solanacearum*

Le pouvoir pathogène est défini par l'ensemble des gènes, ainsi que leurs régulations, nécessaires à la colonisation, la survie, la multiplication, et le développement de la maladie chez l'hôte. Deux composantes structurent le pouvoir pathogène des bactéries :

- La virulence : elle correspond à la capacité d'un agent pathogène à provoquer une maladie sur un hôte donné ;
- L'agressivité : c'est la mesure quantitative du degré d'attaque de la plante par l'agent pathogène.

Différents facteurs sont impliqués dans le pouvoir pathogène chez les bactéries phytopathogènes. Ces facteurs peuvent être regroupés en cinq catégories : les gènes impliqués dans la mobilité et l'attachement bactérien, les EPS (Exopolysaccharides), les enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaires, le système de régulation de type *quorum sensing* et finalement les gènes codant les effecteurs injectés dans la cellule végétale par le système de sécrétion de type III.

1.3.1. Les déterminants de la mobilité et de l'attachement

L'attachement de *R. solanacearum* à la surface des cellules végétales est une étape essentielle dans la pathogénèse. Chez GMI1000, la souche modèle de *R. solanacearum*, il existe un grand nombre

de gènes codant les facteurs de l'attachement ou codant les structures extracellulaires intervenant dans la mobilité de la bactérie. Dans les premières phases de l'infection, la bactérie adhère aux cellules externes des plantes hôtes et non hôtes grâce à ses flagelles polaires [294]. Dans le milieu externe à la plante, la motilité de *R. solanacearum* est rendue possible par un flagelle (*flg*) nécessaire à l'orientation de la bactérie vers les racines et leur invasion, dont l'expression est contrôlée par une protéine tétramérique FlhDC [295]. Une fois que la bactérie a pénétré dans la plante, elle devient non motile. *R. solanacearum* produit aussi un *pilus* de type IV (Tfp), un déterminant de la motilité dit « twitching motility » [296]. Chez GMI1000, plus de 20 gènes organisés en quatre opérons ont été identifiés comme candidats pour la synthèse et la fonction du Tfp. Le Tfp est composé d'une simple protéine, PilA, assemblée en un filament polaire. En plus du Tfp, *R. solanacearum* possède un *cluster* de gènes FliP/Tad codant pour des protéines nécessaires à la biosynthèse des *pili* qui permettent l'adhésion de la bactérie aux surfaces cellulaires et à la formation d'un biofilm tenace [297]. Le Tfp intervenant dans la mobilité contribue à la pathogénicité de *R. solanacearum* [296, 298].



Figure 25. Test de l'eau. Les exopolysaccharides produits par *R. solanacearum* dans le xylème et mis en évidence par trempage d'une tige infectée dans l'eau. (Photo : T. Momol and S.M. Olson, University of Florida).

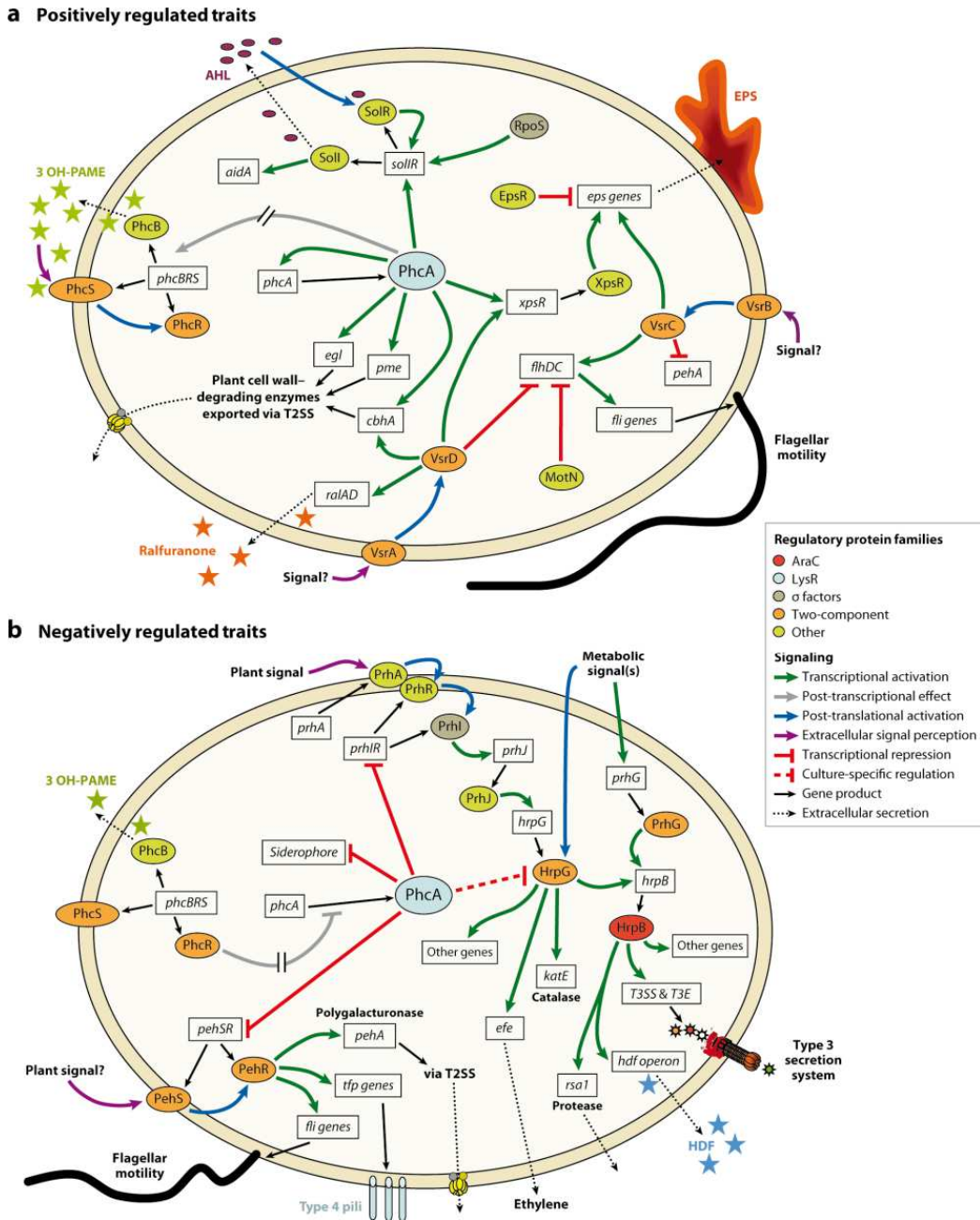
1.3.2. Les exopolysaccharides et les biofilms

Les EPS sont des facteurs majeurs de virulence de *R. solanacearum* (Denny et Baek, 1991). En effet, un mutant incapable de synthétiser EPS I, un polymère hétérogène de monosaccharides N-acétylés, est presque avirulent et présente une diminution importante de la colonisation du xylème par rapport à la souche sauvage [299, 300]. Malgré la complexité de la diversité génétique de *R. solanacearum*, la structure des EPS est tellement bien conservée entre les souches qu'un même anticorps anti-EPS peut reconnaître tous les membres de la famille des EPS [301]. Ces derniers sont produits en abondance lors de culture cellulaire ou lorsque la bactérie se développe dans les vaisseaux du xylème de la plante hôte [302]. Il a été démontré que les EPS provoquent directement le flétrissement par occlusion du xylème et par restriction hydrique de la plante colonisée [303] (**Figure 25**).

Ils contribuent à la survie de *R. solanacearum* à la dessiccation ou à l'antibiose dans le sol en l'absence de plantes hôtes à coloniser. Finalement, les EPS protègent *R. solanacearum* des composés antimicrobiens produits par les défenses de la plante en masquant ses propres composés de surface qui pourraient être reconnus par la plante-hôte [244, 303-305]. Cependant, les EPS n'ont pas seulement un rôle dans la suppression des défenses, ils jouent aussi un rôle dans l'induction des défenses de la plante. Une étude récente sur un mutant ne produisant pas d'EPS (*eps-*) a montré qu'ils élicitent l'expression des gènes de défense, la production de ROS et déclenchent la signalisation par l'acide salicylique (SA) chez les plantes résistantes [306]. Les biofilms formés par *R. solanacearum* au contact des différents facteurs biotiques et abiotiques dans son environnement jouent un rôle important dans l'interaction avec l'hôte (Morris et Monier, 2003). Il a été mis en évidence que *R. solanacearum* forme des biofilms à la surface racinaire des jeunes plantes [241]. Il semblerait que, à l'intérieur de la plante hôte, les biofilms aideraient *R. solanacearum* à rester ancré aux parois des vaisseaux du xylème et filtreraient efficacement les nutriments issus de la sève brute [307].

1.1.1. Les enzymes extracellulaires (PCWDE)

Les enzymes de dégradation de la paroi cellulaire (« Plant Cell Wall Degradation Enzymes » [PCWDE]) contribuent significativement à la capacité de *R. solanacearum* à engendrer du flétrissement. Les PCWDE ainsi que d'autres protéines sont sécrétées via le système de sécrétion de type 2 (SST2). Chez *R. solanacearum*, 6 exoenzymes ont été identifiées : deux enzymes cellulolytiques (une β -1,4-endoglucanase [Egl] et une exoglucanase [cbhA]), et quatre enzymes pectinolytiques (une endopolygalacturonase [PehA ou PglA], deux exopolygalacturonases [PehB et PehC] et une pectine methyl-esthérase [Pme]) [299, 308, 309]. Cependant, le rôle de ces enzymes dans la pathogénicité de *R. solanacearum* semble limité. En effet, lorsque les gènes codant les enzymes pectinolytiques sont mutés un par un, aucune différence de pathogénicité significative n'a été identifiée comparé à la souche sauvage GMI1000 [308, 310, 311]. Seules les souches mutées dans les gènes codant deux enzymes cellulolytiques (*Egl* et/ou *cbhA*) [310] ou une souche mutée dans les six gènes codant les PCWDE induisent un flétrissement plus lent des plants de tomate inoculées comparé à la souche sauvage GMI1000 [311]. Les auteurs de cette dernière étude ont démontré que le mutant dans le T2SS est moins virulent que le sextuple mutant dans les PCWDE, suggérant que d'autres protéines sécrétées contribueraient substantiellement à la capacité de *R. solanacearum* à coloniser les plants de tomate [312].



Genin S, Denny TP. 2012. Annu. Rev. Phytopathol. 50:67–89

Figure 26. Principales voies de régulation de la virulence chez *R. solanacearum*. Ce modèle est organisé autour des gènes et des traits (a) positivement contrôlés et (b) négativement contrôlés par le régulateur de transcription *phcA*. Le réseau de contrôle primairement le système de sécrétion de type III et d'autres gènes associés à la virulence sont décrit en (b). Le signal métabolique ou nutritionnel influençant l'expression des gènes *hrp* sont inconnus à l'heure actuelle. Les lignes grises interrompues représentent des régulations supposées indirectes. Les lignes finissant par une croix représentent la répression des gènes alors que les flèches indiquent une activation. Abréviations: EPS: exopolysaccharide, HDF : facteur de diffusion dépendant de *hrpB* (3-hydroxy-oxindole), T2SS: système de sécrétion de type II. D'après [293].

1.1.2. Le système de régulation dépendant de type *quorum sensing*

L'expression des facteurs de virulence chez *R. solanacearum* est contrôlée par un réseau de régulation complexe qui diffère en fonction du stade de l'infection que l'on appelle « quorum-sensing » (**Figure 26**). Au stade précoce de l'infection, la présence de la plante est détectée par un récepteur extra-membranaire *prhA* responsable d'une cascade de transduction du signal intégrant *prhR*, *prhI*, *prhJ*, et deux régulateurs *hrpG* et *hrpB* [294, 313-316]. *HrpG* co-régule l'expression de deux voies de signalisation. La première voie de signalisation contrôle les gènes impliqués dans l'adaptation et la survie *in planta* de la bactérie, suggérant l'implication de *hrpG* dans la régulation d'un panel de gènes impliqués dans la transition entre les milieux environnementaux et la plante-hôte [317]. La deuxième signalisation est dépendante de *hrpB*, un régulateur majeur de l'expression des gènes *hrp* qui codent le SST3 [296, 302, 318]. Durant ce stade de l'infection, le SST2 et le SST3 sont co-régulés et le gène *pehC* est positivement régulé [319].

Au stade tardif de l'infection, l'un des acteurs centraux de ce réseau de régulation est *phcA* (*phc* pour « phenotype conversion »), un régulateur de transcription appartenant à la famille LysR. Ce régulateur coordonne la biosynthèse des EPS, la production des PCWDE *Pme* et *egl*, et réprime d'autres gènes de virulence tels que les gènes *hrp*, ainsi que ceux liés à la motilité et à la production de polygalacturonase [302, 318, 320, 321]. En effet, un mutant de *phcA* ne produit ni EPS, ni pectine méthyl-esterase, ni *egl* mais est devenu hyper motile [322]. Le niveau d'activité de *phcA* est auto-régulé en réponse à la densité cellulaire par un premier mécanisme de « *quorum sensing* » impliquant une molécule volatile signal, le 3-hydroxy palmitic acid ester (3-OH PAME), produit par *phcB* au sein du xylème [323]. Lorsque *R. solanacearum* est présent en forte concentration dans un milieu de culture, *phcA* n'est pas exprimé et la production du *pilus* *Hrp* est réprimé [324]. En effet, *R. solanacearum* perçoit la forte densité cellulaire et un milieu extracellulaire riche, ce qui indique une quantité suffisante de nutriment. En réponse, la bactérie va réprimer son SST3 impliqué dans l'acquisition de nutriments à partir des cellules végétales car il n'est plus nécessaire. *phcA* est responsable d'un deuxième « *quorum sensing* » en régulant positivement la production de AHL, lui-même impliqué dans un système de régulation médié par le régulateur *SolI-SolR* dont le but est d'activer l'expression d'autres gènes de virulences [302, 323].

La mutation spontanée de *phcA* provoque une conversion phénotypique chez *R. solanacearum* d'un phénotype muqueux en rugueux [254, 325, 326]. Cette conversion phénotypique implique la perte d'un ou de plusieurs composant(s) des EPS [300] ainsi que la forte réduction de l'activité endoglucanase, mais provoque aussi l'augmentation de la production de polygalacturonase [302, 325]. De plus, il a été démontré que la motilité bactérienne est réduite chez le mutant rugueux (Kelman [325, 327] ainsi que sa capacité à provoquer du flétrissement bactérien. Cette conversion phénotypique serait due à des réarrangements génétiques variés (insertions de séquences, délétions, substitutions) au sein du locus *phcA* [254, 325, 328].

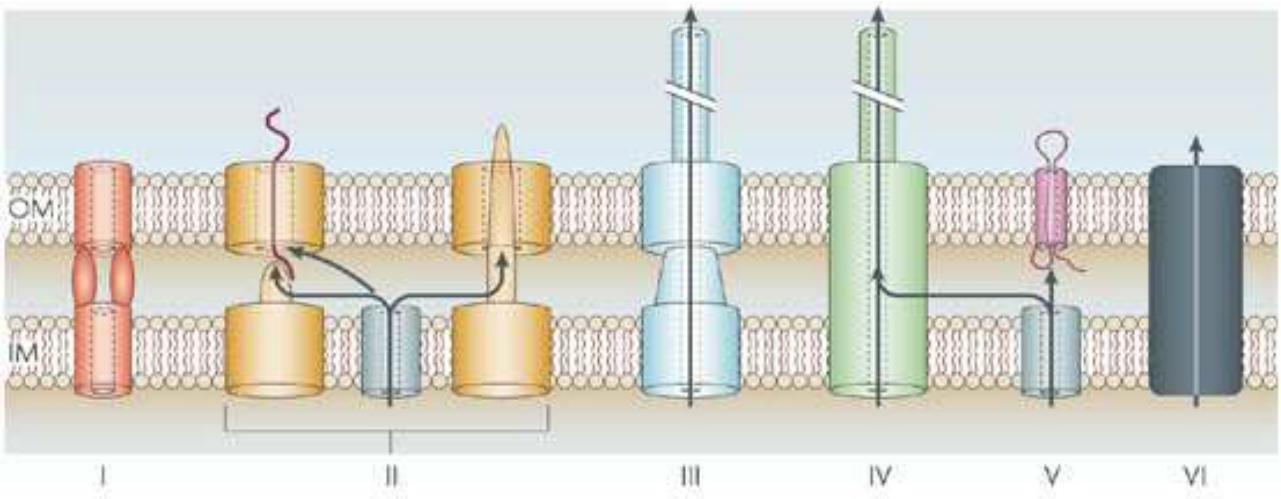


Figure 27. Représentation schématique des six systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram négatifs. D'après [329].

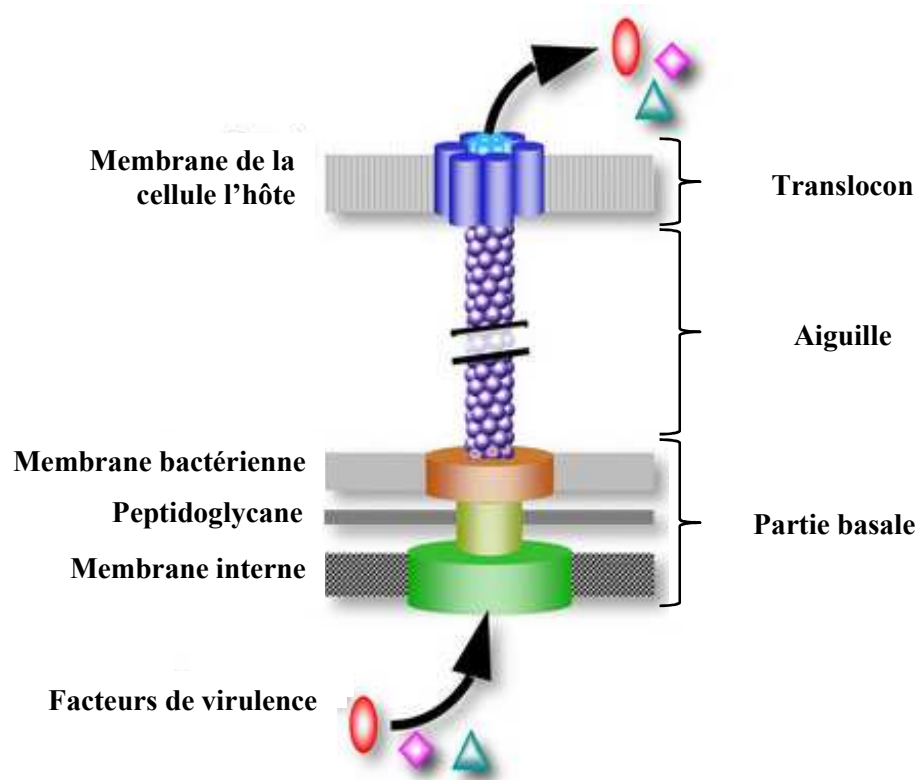


Figure 28. Représentation du système de sécrétion de type III chez *R. solanacearum*. Le système de sécrétion de type III est composé de trois parties. Une **partie basale** traverse la double membrane bactérienne. Une deuxième **partie extracellulaire** forme un canal extracellulaire qui va perforer la paroi de l'hôte, aussi nommé « l'aiguille » permettant la translocation des effecteurs dans le cytosol de la cellule cible. Finalement, une troisième **partie formée de protéines translocatrices** vont s'associer à la membrane de la cellule cible. D'après [330-332].

1.1.3. Les différents systèmes de sécrétion

Chez *R. solanacearum*, six systèmes de sécrétion différents sont impliqués dans la sécrétion de déterminants de la virulence [246, 333-335] (**Figure 27**) :

- (i) Le type I (SST1) permet la sécrétion des effecteurs directement dans l'espace intercellulaire ;
- (ii) Le type II (SST2) permet l'émission d'effecteurs en deux temps : ils sont d'abord transportés dans le périplasme de la bactérie puis sécrétés à travers la membrane externe dans l'espace intercellulaire ;
- (iii) Le type III (SST3) est une seringue moléculaire qui permet la translocation des effecteurs du cytosol bactérien directement dans le cytoplasme de la cellule hôte ou dans l'espace intercellulaire. Ce système de sécrétion fera l'objet d'un paragraphe détaillé ultérieurement ;
- (iv) Le type IV (SST4) correspond au même type de système de sécrétion que le SST3. Il est nécessaire dans le transport de diverses molécules dans la cellule hôte telles que des complexes ADN/protéine, des toxines multi-protéiques ou des protéines seules. Ce système de sécrétion présente des similarités avec la queue contractile des bactériophages [336].
- (v) Le type V (SST5) est un mécanisme simple en deux temps. La translocation via ce système nécessite soit un autotransporteur, soit un domaine de translocation indépendant de la molécule transloquée.
- (vi) Le type VI (SST6) découvert plus récemment, est un système de translocation des protéines contact-dépendant et est nécessaire pour la virulence. Il ressemble aux systèmes de perforation des bactériophages et possède la capacité de transférer des effecteurs antagonistes aux bactéries environnantes [337, 338].

1.1.3.1. Le Système de Sécrétion de Type 3 (SST3) et ses effecteurs

1.1.3.1.1. Le SST3

L'injection des effecteurs dans la cellule végétale et conduisant à l'ETS est dépendante du SST3, un déterminant majeur du pouvoir pathogène [330]. Le SST3 est présent chez de nombreux agents pathogènes d'animaux (*Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Escherichia coli*) mais aussi chez de nombreux agents phytopathogènes (*Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Ralstonia solanacearum*). Il s'agit d'une seringue moléculaire permettant d'injecter directement un ensemble de protéines, dites effecteurs de type III (ou ET3), dans le cytoplasme des cellules-hôtes (**Figure 28**). Il fournit un avantage sélectif (ou « *fitness* ») à l'agent pathogène lorsque le gène de résistance correspondant est absent de la plante-hôte. Sans leur SST3, ces bactéries seraient incapables de se multiplier *in planta*, d'induire la maladie lors d'une interaction compatible, ou d'induire une réaction hypersensible lors d'une interaction incompatible [339].

Chez *R. solanacearum*, le SST3 joue un rôle crucial dans la pathogénicité car une souche mutée dans son SST3 est incapable de provoquer la maladie [245]. Chez la souche de référence GMI1000, le SST3 est codé par un *cluster* de gènes *hrp* (« hypersensitive response and pathogenicity ») [340, 341], situé dans un îlot de pathogénicité de 23kb sur le mégaplasmide et comportant plus d'une vingtaine de gènes [342]. Une partie de ce *cluster* code la structure de l'aiguille, une autre pour des effecteurs conservés et une dernière pour des effecteurs variables. Les gènes *hrp* sont divisés en quatre groupes : (i) les *core*-gènes avec 6-10 gènes non conservés et 9 gènes *hrc* (« *hrp conserved* ») conservés entre les bactéries pathogènes des animaux et des plantes, (ii) deux à quatre régulateurs transcriptionnels, (iii) les gènes codant des protéines extracellulaires (pilines, translocateurs et harpines) et (iv) deux à quatre gènes codant des régulateurs de sécrétion [343]. La transcription de la majeure partie des gènes du SST3 et des ET3 est régulée par le gène *hrpB*, un activateur de transcription [303], lui-même régulé par un système à deux composantes appelé *hrpG* [344]. Cependant, les gènes *hrp* ne sont pas essentiels lors du processus d'invasion car un mutant dans le système *hrp* est toujours capable d'envahir les tissus vasculaires de la tomate, bien que sa concentration *in planta* reste relativement faible comparé à la souche de référence GMI1000 [344]. Cette croissance *in planta* réduite de la souche mutante est très certainement une conséquence de la faible disponibilité en nutriments et de l'effet des mécanismes de défense de la plante. Cela suggère aussi que le système de sécrétion peut supprimer les défenses de la plante-hôte. Cependant, les ET3 sont produits dans le cytoplasme bactérien où ils doivent être stabilisés et dépliés ou repliés afin de pouvoir ensuite être injectés ou transloqués dans la cellule-hôte [345]. Une étude récente sur la caractérisation d'une protéine chaperonne *hpaP* a identifié son implication dans la répression ou l'activation de certains effecteurs (*ripAA* et *ripPI*) et la production de la piline *HrpY* [346], démontrant ainsi la complexité de la régulation du SST3. Alors que les premières études de sécrétion *in vitro* indiquaient que le SST3 n'était actif que dans les phases précoces de la pathogénèse, une récente étude utilisant un gène rapporteur luminescent a démontré que le SST3 était en fait actif tout au long de la pathogénèse [347].

1.1.3.1.2. Les effecteurs de type III (ET3)

- Rôles

Chaque agent pathogène possède un panel particulier d'effecteurs conduisant à une spécificité dans son pouvoir pathogène et son spectre d'hôtes [21, 348]. Ces effecteurs ont des natures, des cibles moléculaires et des fonctions variées [349]. Les effecteurs ont pour principales fonctions [24, 333] :

- (i) L'activation de défense de l'hôte suite à la reconnaissance par une protéine R ;
- (ii) L'inhibition de l'activation des réactions de défense de l'hôte induites par d'autres effecteurs d'avirulence ;
- (iii) L'inhibition des mécanismes de défense de base de l'hôte ;

- (iv) L'induction d'une augmentation du pH et du contenu nutritif de l'apoplasme de la plante facilitant ainsi la multiplication bactérienne ;
- (v) Le mimétisme moléculaire, c'est-à-dire la production des analogues d'hormones des plantes par les effecteurs.

- Structure et fonctions

Les ET3 sont constitués d'un « domaine *hrp* » dans leur région promotrice [315], d'une partie modulaire en position N-Terminale responsable de la sécrétion et de la translocation de l'effecteur et en position C-Terminale d'une partie responsable de l'interaction de l'effecteur avec la cible végétale [350].

Cependant, les connaissances des fonctions de chaque effecteur sont partielles. Pour beaucoup d'entre eux, leur rôle, fonction, localisation et mode d'action dans les différents hôtes restent inconnus [280, 339, 351, 352], probablement dus à la redondance fonctionnelle des effecteurs [353, 354]. La complexité de la compréhension du rôle des effecteurs vient notamment du fait qu'ils peuvent interagir pour induire un phénotype ou être fonctionnellement redondants, la mutation d'un seul effecteur ne provoque généralement aucun phénotype sur plante [355]. A titre d'exemple, un criblage de plusieurs mutants de la souche Pss190 de *R. solanacearum* ayant perdu leur virulence sur tomate a permis de décrire de nouveaux facteurs de virulence. Cependant, les auteurs n'ont identifié aucun ET3 spécifiquement impliqué dans la virulence sur tomate et sur *Arabidopsis* [349], confirmant le fait que la mutation d'un seul effecteur n'a pas un effet important sur la virulence de la bactérie [315].

De nombreux ET3 ont été identifiés chez les bactéries et leur nom dépend de l'agent pathogène dont ils sont issus : Pop (« *Pseudomonas* outer protein ») chez *R. solanacearum* (faisant partie du genre *Pseudomonas* à l'époque de cette identification) [356], modifié ensuite en Rip (« *Ralstonia* injected protein ») [280], ou encore Xop (« *Xanthomonas* outer protein ») chez *Xanthomonas* sp. [357]. Certains ET3 de *R. solanacearum* ont été identifiés comme homologues des ET3 de *X. campestris* et *P. syringae*, tels que les familles AvrBs3, AvrPphD, AvrPphE, AvrPphF, HopG1, HopR1 et HopH1 [358]. Les souches du complexe d'espèces *R. solanacearum* partageraient ainsi certaines familles d'ET3 avec d'autres agents phytopathogènes suggérant un rôle majeur de ces familles d'effecteurs chez les bactéries phytopathogènes [359].

- Les différentes familles d'effecteurs et leurs membres

R. solanacearum possède plusieurs familles d'ET3 dont les plus étudiées sont les familles *ripG* (GALA, 8 membres), *ripA* (AWR, 6 membres), *ripS* (SKWP, 6 membres), *ripH* (HLK, 4 membres) et *ripP* (Pop, 3 membres).

Les effecteurs appartenant à la famille GALA sont impliqués dans la pathogénicité et présentent des redondances fonctionnelles : seul un septuple mutant GALA est affecté dans son pouvoir pathogène sur *A. thaliana* et sur la tomate [353, 360, 361]. Cette étude nous indique que la

contribution d'un seul effecteur GALA à la pathogénicité varie en fonction de l'hôte. Par exemple, le gène *GALA7* est essentiel à la pathogénicité de GMI1000 sur *Medicago truncatula*, bien que sa cible *in planta* reste inconnue [353]. Les effecteurs appartenant à cette famille présentent une « F-box » et un domaine LRR. Les effecteurs GALA sembleraient former un complexe de type SCF ubiquitine-ligase responsable de l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome des cibles végétales [362]. Cette famille multigénique serait apparue suite à plusieurs duplications de gènes dans la souche ancestrale puis ces gènes se seraient diversifiés au cours de l'évolution de *R. solanacearum* [361].

Les effecteurs ripP1 et ripP2 (anciennement PopP1 et PopP2 pour « *Pseudomonas* outer protein 2 » PopP2) font partie de la superfamille de cystéine-protéase YopJ/AvrRxv [34, 358]. Cette superfamille, décrite initialement chez *Yersinia pestis* [363], *Y. pseudotuberculosis* [364] et *Salmonella typhimurium* [365], est évolutivement très diverse et est l'une des familles majeures chez les bactéries associées aux plantes [366]. *RipP1* (*popP1*) code une cystéine protéase reconnue directement ou indirectement par les gènes de résistance de la plante et conduiraient à de la résistance chez des variétés de tabac (*N. glutinosa*) et de pétunia cv. St40 [367]. Cet effecteur aurait été acquis par transfert horizontal [367]. Il a été démontré que *ripP2* (*popP2*) faciliterait la multiplication bactérienne chez trois plantes-hôtes : l'aubergine, la tomate et le haricot [368]. Cet effecteur semble être un gène issu d'un bactériophage car il est entouré d'un *cluster* de gènes correspondant à un prophage qui a été incorporé au génome de GMI1000. Ceci expliquerait la faible distribution de *ripP2* au sein de l'espèce *R. solanacearum* [271, 369]. L'effecteur *ripP2* est un cas particulier car c'est un facteur d'avirulence chez *A. thaliana* [34, 76, 370] et il a, de ce fait, été beaucoup étudié. RipP2 déclenche une réaction de défense chez les cultivars d'*A. thaliana* contenant le gène de résistance RRS1-R, comme décrit ci-après.

D'autres ET3 de *R. solanacearum* ont été décrits comme étant impliqués dans l'avirulence. Bien que sa fonction moléculaire n'ait pas encore été caractérisée, ripAA (*avrA*), considéré comme un déterminant majeur d'avirulence, induit la résistance de plusieurs espèces de tabac telles que *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana* et *N. glutinosa* [358, 371, 372]. De plus, un mutant de GMI1000 dans *ripAA* perd son agressivité sur *Medicago truncatula* et un mutant *ripAA* de la souche Molk2 (phylotype IIB4) voit son agressivité fortement diminué sur le bananier [276]. *ripA2* et *ripA5* (*AWR2* et *AWR5*) conduisent à de la résistance chez plusieurs plantes telles que *A. thaliana* et *N. tabacum* [354]. Parallèlement, *ripAA* et *ripP1* ont été identifiés comme limitant la gamme d'hôte. Seul un double-mutant de ces deux gènes permet de restaurer la virulence sur tabac [358, 373]. L'effecteur *ripX* (*PopA*) s'associerait spontanément à la membrane des cellules de tabac pour former des ponts conducteurs d'ions qui sembleraient faciliter la translocation des protéines bactériennes dans le cytoplasme des cellules végétales [374]. Une étude récente d'expression transitoire chez la souche RS1000 a montré que Rip36, présentant 100% d'homologie à *ripAX2* chez GMI1000, est un facteur d'avirulence qui induit une HR chez *S. torvum* cv. Torubamubiga. C'est en fait son motif protéase

HELIIH zinc-dépendantes qui est nécessaire pour la reconnaissance de l'effecteur par la plante [375]. En combinant une approche de puce à ADN et de phénotypage des profils d'interactions entre Solanacées et *R. solanacearum*, Pensec et coll. [376] ont identifié 7 gènes associés à l'avorulence sur tomate et aubergine (*ripP2*, *ripAU*, *ripG3*, *ripP1*, *ripAX2*, *ripN*, *ripAS*) dont 3 le sont hautement (*ripP2*, *ripP1* et *ripAS*).

Récemment, un nouvel effecteur sécrété a été caractérisé dans la souche GMI1000 : *ripTPS*, qui présente de l'homologie à une tréalose-6-phosphatase synthase, une classe d'enzyme ubiquiste chez les procaryotes et les eucaryotes [377]. Ce type d'enzyme est une molécule-clef qui régule l'assimilation des sucres et du carbone mais qui, une fois supprimée, n'altère pas la virulence de *R. solanacearum* sur plantes. Cependant, cet effecteur semble éliciter spécifiquement une HR sur *N. tabacum* via son domaine C-Terminal [377]. La reconnaissance de cet effecteur par le système immunitaire de la plante suggère un rôle dans le processus infectieux de l'hôte par *R. solanacearum*.

Certaines souches de *R. solanacearum* possèdent des gènes d'effecteurs de type *ripTAL* (*Transcription Activator-Like*) ayant une structure homologue aux effecteurs TALs de *Xanthomonas* [280, 378, 379]. En règle générale, les TALs sont composés d'un domaine N-Terminal servant de signal pour la translocation, d'un domaine central avec 1,5 à 33,5 motifs répétés en tandem, et finalement en C-Terminal d'un domaine de liaison nucléaire et d'un domaine d'activation de la transcription en C-Terminal [27]. Les TALs de *Xanthomonas* agissent comme les activateurs transcriptionnels eucaryotes grâce à leurs domaines structuraux centraux, s'attachant aux promoteurs des gènes-cibles [27]. La caractérisation récente des effecteurs *ripTAL* a montré que leur cible est nucléaire et qu'ils peuvent fonctionner comme activateurs transcriptionnels dans les cellules végétales [378, 379]. Cependant, il reste encore à identifier les promoteurs-cible des *ripTAL*.

Le fait que les ET3 partagent de nombreuses similarités avec les protéines végétales suggère que ces effecteurs agirait directement comme agonistes ou antagonistes des composants cellulaires des plantes [245]. Les études citées précédemment mettent en évidence que l'issue de l'interaction entre *R. solanacearum* et ses plantes-hôtes dépend à la fois des répertoires de protéines de défense spécifiques des hôtes et des répertoires d'effecteurs spécifiques des souches [279].

1.1.3.1.3. Répertoire d'ET3

La coévolution entre les agents pathogènes et les plantes a généré des répertoires larges et polymorphes d'effecteurs bactériens et, par conséquent, de nombreuses protéines végétales de défense [248]. Le séquençage du génome complet de la souche de référence GMI1000, son assemblage et son annotation a permis d'identifier le répertoire de gènes codant les effecteurs [283, 380, 381]. Depuis lors, différentes méthodes ont été développées pour définir le répertoire d'effecteurs chez *R. solanacearum*:

- (i) La recherche d'orthologues aux ET3 déjà identifiés ;
- (ii) La recherche de promoteurs *hrp*-dépendants et l'identification de ET3 par étude de la régulation des gènes [314, 315, 382] ;
- (iii) La recherche de motifs protéiques atypiques indiquant une fonction potentielle chez les cellules-hôtes eucaryotes [360] ;
- (iv) La recherche de signaux de l'export du SST3 situés dans la partie N-terminale des effecteurs transloqués connus [350, 383].

Avec le développement de la génomique comparative, il est dorénavant possible de comparer la distribution de ces gènes (i.e. les répertoires de gènes) entre des souches d'espèces ou de pathovars différents (groupes d'agents pathogènes partageant un même profil de gamme d'hôtes spécifique).

- Dynamique des répertoires des ET3

Des études portant sur la dynamique des répertoires des ET3 de *R. solanacearum* (résumé dans [293]) montrent que les répertoires seraient caractérisés par:

- (i) Un grand nombre de core-ET3 conservés dans toutes les souches séquencées à ce jour. Ce nombre peut atteindre approximativement 31 lorsque l'on compare le répertoire de représentant de chaque phylotype, voire 60 pour des souches appartenant à un même phylotype ;
- (ii) Une diversification importante entre espèces car les répertoires inter-phylotypes ont une variation de 25% de leur contenu ;
- (iii) Une haute spécificité au complexe d'espèces *R. solanacearum* (presque la moitié des ET3 ne sont pas décrits chez d'autres espèces ou genres) ;
- (iv) L'existence de plusieurs familles multigéniques : chaque souche possède plusieurs ET3 appartenant à cinq familles principales, chacune comprenant trois à 8 membres.

- Répertoire complet

R. solanacearum possède un répertoire d'effecteurs exceptionnellement diversifié pouvant comprendre jusqu'à 80 effecteurs par souche, alors que les autres bactéries phytopathogènes telles que *Xanthomonas spp.* et *P. syringae* ne comptent qu'environ 30 à 40 effecteurs. Une étude réalisée sur 11 souches de *R. solanacearum* estime à environ 110 le nombre de gènes d'ET3 différent dans le complexe d'espèces *R. solanacearum*, avec 48 à 75 ET3 potentiels pour chaque souche [280]. Lors de cette étude, 16 nouveaux ET3 candidats ont été identifiés (i.e. dont l'expression et la sécrétion par le SST3 n'ont pas encore été validées expérimentalement) mais la plupart d'entre eux n'affiche aucune homologie avec d'autres familles de protéines sauf pour Hyp5, Hyp6 et Hyp7 qui ont des homologues chez *Acidovorax spp.* ou *Xanthomonas spp.* [280]. Chez la souche de référence GMI1000, 74 protéines ont été identifiées comme étant des ET3 putatifs dont 28 ont été confirmées comme étant des

protéines sécrétées [314]. Plus récemment, un *pan*-effectome de 113 ET3 a été identifié sur un groupe de 19 souches composé majoritairement d'isolats appartenant majoritairement au phylotype IIA et IIB [275]. Les données d'hybridation sur puce à ADN de 17 souches de *R. solanacearum* ont montré que la majeure partie des ET3 se situent sur la partie conservée du génome et que 25 effecteurs sur les 34 ET3 testés présentent une variabilité de distribution au sein de ces souches [271].

- Core-effectome

Certains effecteurs sont présents dans toutes les souches (effecteurs communs, également désignés sous le terme « *core*-effectome »), tandis que d'autres sont plus spécifiques de certaines souches ou groupes de souches (effecteurs variables) [155, 384]. Les effecteurs conservés, au-delà d'être impliqués dans les fonctions telles que la nutrition et la suppression des réponses des mécanismes de défense basale ou encore le développement des symptômes, seraient vraisemblablement ancestraux et seraient cruciaux pour les interactions entre *R. solanacearum* et ses hôtes [280]. Quant aux effecteurs variables, ils seraient plutôt associés à des mécanismes spécifiques dont la suppression des réactions hypersensibles ou la spécificité d'hôtes [358].

Récemment, une étude de génomique comparative a permis d'établir un « *core*-effectome » de 22 ET3 (famille de gènes *Rip*) présents parmi 10 souches du complexe d'espèces *R. solanacearum*. Cette étude montre aussi que 9 ET3 sont sous sélection diversifiante et que 5 d'entre eux appartiennent au « *core*-effectome » [280]. Cependant, Ailloud et coll. [275] n'ont détecté que 14 *core*-effecteurs sur 19 souches analysées. Un *core*-effectome de 14 effecteurs a aussi été identifié sur une *core*-collection de souches de *R. solanacearum* (CoreRs2) [385] représentative des phylotypes I, IIA, IIB et III [376]. En analysant les données génomiques d'une collection ciblée de *R. solanacearum* (phylotype IIB), Clarke et coll. ont identifié un *core*-effectome de 31 effecteurs [281]. Ces résultats reflètent ainsi l'abondance des *core*-ET3 chez *R. solanacearum*, particulièrement au sein de chaque phylotype, qui apparaît nettement supérieure à *P. syringae*, possédant un « *core*-effectome » de seulement 5 ET3 parmi 19 souches étudiées [282] et à *X. oryzae*, avec 14 effecteurs conservés sur 45 souches analysées et à *X. axonopodis* avec 8 effecteurs conservés sur 132 souches analysées [386]. L'abondance des *core*-ET3 semble équivalente à *X. citri* pv. *citri* qui possède 26 effecteurs communs sur 55 souches testées [387]. Des analyses de phylogénie de *R. solanacearum* montrent des cas d'incongruence avec les espèces de l'arbre phylogénétique, ce qui laisse supposer une évolution rapide ou l'acquisition de gènes par transferts horizontaux [280].

- Répertoire d'effecteurs et phénotypes

La comparaison des contenus en effecteurs (25 ET3) de souches présentant des profils de virulence différentiels sur la *core*-collection TEP (Tomate, Aubergine, Poivron) n'a pas permis de mettre en évidence de corrélations entre les répertoires d'effecteurs de souches de *R. solanacearum* et leur phénotype sur Solanacées [376]. Ce résultat a aussi été obtenu pour *X. citri* pv. *citri* où le

répertoire d'effecteurs entier n'explique pas la spécificité d'hôte entre les différents pathotypes [387]. A l'inverse, pour *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), une corrélation entre des souches génétiquement différentes et la capacité à coloniser certains hôtes a été démontrée [384, 388]. Cependant, le fait de caractériser des répertoires d'effecteurs amène à se poser plusieurs questions sur le nombre d'effecteurs nécessaires pour inhiber les voies de signalisation de la PTI, activées par la présence du pathogène, ainsi que sur le nombre minimal d'effecteurs nécessaire pour induire la maladie (ETS). Une étude menée sur la déconstruction du répertoire d'effecteurs de *P. syringae* suppose que plusieurs combinaisons possibles d'effecteurs peuvent constituer le set minimum d'effecteurs nécessaire dans le contournement des défenses de la plante et l'induction des symptômes, d'où la difficulté à déterminer le set d'effecteurs indispensables pour une souche donnée [58, 355]. Du fait de la duplication des gènes de résistance et de la redondance fonctionnelle d'effecteurs, les répertoires d'effecteurs sont collectivement essentiels mais individuellement non indispensables [355, 361]. Ainsi, identifier des groupes d'effecteurs redondants peut potentiellement révéler des processus contribuant aux défenses antimicrobiennes et fournissant des clés pour les protéines cibles des plantes et/ou impliquées dans la reconnaissance des effecteurs [248].

1.2. Stratégies de lutte contre *R. solanacearum*

1.2.1. Les différents types de lutte contre le flétrissement bactérien

Différents moyens de lutte sont disponibles pour contrôler l'infection des plantes par *R. solanacearum*. La **lutte réglementaire** vise à éviter l'importation et la dissémination d'un agent phytopathogène dans une zone où il en est exempt. Pour *R. solanacearum*, la norme OEPP PM 9/3 (OEPP/EPPO, 2004) préconise différentes stratégies pour prévenir sa dissémination, telles que la détection, le confinement et l'éradication de la bactérie lorsqu'elle est détectée dans du matériel végétal ou dans une parcelle. La **lutte prophylactique** a comme objectif premier la mise en place d'un ensemble d'actions préventives visant à éviter l'introduction de la bactérie dans un agrosystème. Elle permet aussi de réduire le potentiel d'inoculum et la capacité d'infection des bactéries. Cette lutte passe par exemple par le contrôle des hôtes alternatifs (souvent les adventices), par l'utilisation de plants certifiés et contrôlés au champ et en laboratoire [108], ou par l'utilisation d'outils non contaminés par le pathogène [389]. La **lutte culturale** correspond à un ensemble de techniques qui consistent à raisonner les rotations culturales en diversifiant les espèces cultivées sur une même parcelle. Par exemple, en Martinique, il est recommandé d'éviter les successions Solanacées-Cucurbitacées car ces deux familles sont très sensibles à *R. solanacearum* [390]. L'utilisation de rotation assainissantes, notamment à base d'*Allium fistulosum* (ciboule), *Raphanus sativus* (radis) et *Crotalaria spectabilis* (*Crotalaria*) a significativement fait chuter le potentiel infectieux de *R. solanacearum* [391]. Ces cultures suppressives semblent donc être prometteuses, moyennant l'adaptation des itinéraires culturaux. Les **luttés physique et chimique** sont très peu employées en raison de leur coût élevé et de leur dangerosité environnementale. Ce type de stratégie n'a pas été

prouvé comme efficace pour éradiquer *R. solanacearum* [238, 392]. La désinfection du sol a été étudiée comme moyen de contrôle du flétrissement bactérien mais la fumigation s'est révélée avoir peu, voire pas d'effet sur la maladie, ce qui serait certainement dû à la localisation de cette bactérie dans les couches profondes du sol ou de sa localisation *in planta*, dans le xylème, la protégeant de tout type de traitement [393]. De plus, les quelques études réalisées avec cette technique montrent que l'efficacité est dépendante de la nature des sols et donc qu'elle n'est pas universellement applicable [394]. L'eau étant une voie de dissémination de la bactérie, il est cependant possible de désinfecter les eaux d'irrigation avec de l'acide paracétique ou du dioxyde de chlore [108]. L'utilisation des traitements à base d'huile essentielle de *Palmarosa* (*Cymbopogon martinii*) et de thymol a donné des résultats intéressants en conditions semi-contrôlées [395] mais le prix de ces huiles essentielles a rendu cette stratégie économiquement non viable à l'échelle agricole [396, 397]. Cependant la conjonction des traitements au thymol, à l'acibenzolar-S-méthyl et l'utilisation de variétés partiellement résistantes a donné de bon résultats en Floride [398] et semble une piste à approfondir. La **lutte biologique** utilise quant à elle des bactéries antagonistes ou des souches avirulentes de *R. solanacearum*, comme *Burkholderia sp.* ou *Bacillus sp.*, également connus pour inhiber la croissance de *R. solanacearum*. La souche mutante de *R. solanacearum hrp⁻*, ne possédant plus de SST3 fonctionnel, a été développée car elle peut potentiellement concurrencer les souches virulentes pour l'espace et les nutriments [399]. Cependant, des études menées sur l'utilisation de cette bactérie en protection des plants de tomate et de pomme de terre montrent que cette souche est moins compétitive que les souches sauvages et est donc moins efficace pour réduire le flétrissement bactérien au champ [238, 394].

1.2.2. La lutte génétique et la résistance à *R. solanacearum*

Malgré de nombreux efforts pour diversifier les stratégies de lutte intégrée contre le flétrissement bactérien, la lutte génétique reste la méthode la plus prometteuse (Hayward [250], 1991). Le développement de sources de résistance universelles et durables a cependant rencontré de nombreuses difficultés liées à la nature essentiellement quantitative et partielle des résistances connues, avec une forte interaction entre le génotype et l'environnement, mais aussi à la forte plasticité phénotypique et génotypique de la bactérie [400, 401]. L'instabilité de cette résistance peut être expliquée par :

- 1) Des connaissances insuffisantes des mécanismes impliqués dans les différents phénotypes de résistance (résistance totale, infections latentes). Une plante colonisée par *R. solanacearum* sans développer de symptômes peut être responsable de la multiplication et de la dispersion de la bactérie ;
- 2) Des connaissances insuffisantes des caractéristiques génétiques des souches utilisées dans les programmes de sélection variétale ;
- 3) Des interactions non connues entre les facteurs génétiques impliqués dans la résistance de l'hôte et la pathogénicité de la bactérie [385].

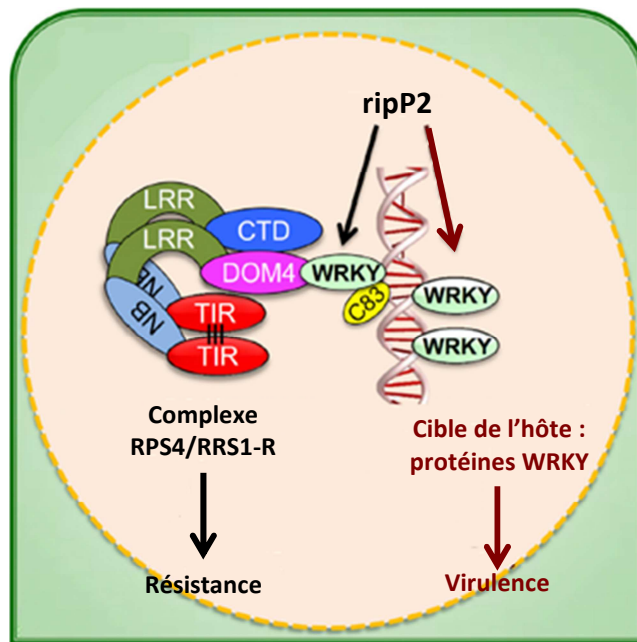


Figure 29. Schéma représentatif de l'action de ripP2 dans la cellule végétale. Lorsque la protéine RipP2 est délivrée dans la cellule, elle s'associe physiquement avec les facteurs de transcription (TF) de la cellule végétale contenant un domaine WRKY dont elle acétyle la lysine (K). Lorsque ce TF est RRS1, son acétylation va désolidariser la protéine de l'ADN qui ira se lier à une autre protéine RPS4. Le complexe formé par ces deux molécules va déclencher les réactions de défense par l'activation d'un récepteur NB-LRR. D'après [407].

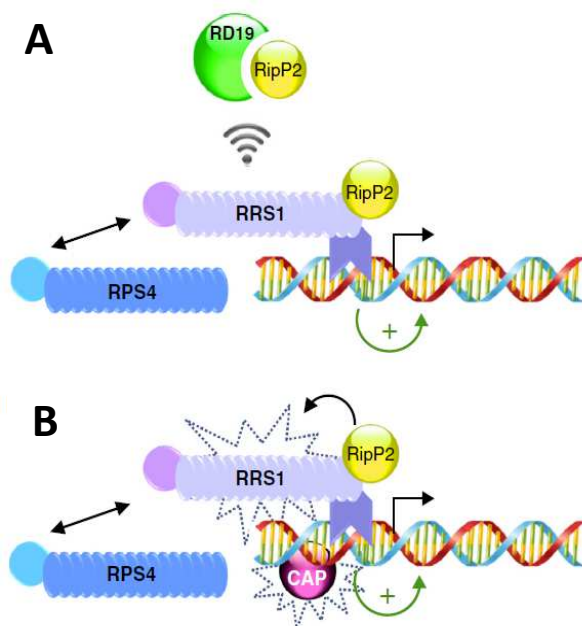


Figure 30. Modèle d'interaction entre ripP2 et RRS-1. (A) RipP2 cible RD19, une cystéine protéase contenue dans la vacuole des cellules d'*Arabidopsis*. Lors de la présence de ripP2, RD19 est partiellement relocalisé dans le noyau de la cellule. L'association nucléaire entre RD19 et ripP2 peut reconnaître RRS1, probablement en coopération avec RPS4, permettant la réponse immunitaire de l'hôte. (B) RipP2 peut déclencher l'activation des réponses immunitaires à travers l'activité enzymatique RPS4/RRS1. La reconnaissance déclenche un changement de conformation du récepteur qui initie le signal de résistance. RipP2 cible aussi certaines protéines associées à la chromatine (CAP) qui peuvent être considérés comme des co-activateurs transcriptionnels modulant l'accès de RRS1 à ses cibles. D'après [352].

1.2.3. Sources et mécanismes de résistance à *R. solanacearum*

1.2.3.1. Chez *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana est devenue une plante modèle de par sa petite taille, son cycle graine à graine court (deux mois) mais surtout grâce à son petit génome de 125 Mb, le plus petit génome du règne végétal, entièrement séquencé et annoté [402]. Cette plante présente aussi l'avantage de n'avoir aucun intérêt économique, ce qui facilite la diffusion des informations entre laboratoires.

Différentes souches de *R. solanacearum* sont capables de provoquer du flétrissement bactérien sur *A. thaliana* [403]. Chez l'accession **Col-0**, un mécanisme polygénique combinant trois QTLs fournit une résistance à la souche 14.23 [404]. Parmi ces *loci*, un récepteur de type LRR-RLK (« Receptor Like Kinase ») nommé ERECTA a été identifié et est impliqué dans le développement des organes aériens, suggérant un lien étroit entre la résistance et le développement des organes [404].

Le gène de résistance *RRS1-R* identifié chez la lignée **Nd-1** confère une résistance à large spectre à plusieurs souches des phylotypes I, IIA et IIB de *R. solanacearum* [76, 403]. Une fois délivrée dans les cellules d'*A. thaliana*, ripP2 est transloqué dans le noyau des cellules végétales de la plante hôte. Grâce à son activité enzymatique, ripP2 va acétyler la lysine (K) du domaine WRKY de différents facteurs de transcription (TFs pour « transcription factor ») de la plante parmi lesquelles *RRS1-R* (« Resistance to *Ralstonia solanacearum* 1 - R »)[34, 405]. *RRS1-R* est composé d'un domaine de type « Toll-Interleukin1-Receptor Nucleotide-Binding Leucine-Rich-Repat » (TIR-NBS-LRR) présent chez de nombreuses protéines de résistance, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN de type « WRKYGQK » en C-Terminal [76, 406]. Dans ce motif, les lysines 1 et 2 (WRK¹YGQK²) sont des résidus critiques car leurs mutations respectives en glutamine et en arginine provoquent une perte de reconnaissance de ripP2 [407]. L'acétylation de *RRS1-R* va provoquer une rupture de sa liaison à l'ADN et va ensuite s'associer à RPS4 (« Resistant to *Pseudomonas syringae* 4 ») via leur domaine de liaison TIR [408]. *RRS1* et RPS4 forment un système de « gènes-de-garde » pour détecter les modifications des protéines-hôtes ciblées par l'activité acétyltransférase de ripP2 [409] et ainsi déclencher la résistance de la plante [34]. L'accumulation de *RRS1* médiée par ripP2 apparaît comme une stratégie de *R. solanacearum* pour stabiliser un régulateur négatif du système immunitaire de la plante afin de favoriser l'invasion du pathogène (**figure 29**).

L'immunité due à *RRS1* nécessite une protéine supplémentaire : une cystéine protéase nommé RD19 (« Responsive to Dehydration 19 »). Lors de la présence de ripP2, RD19 est partiellement relocalisée dans le noyau des cellules végétales où elle s'associe spécifiquement à ripP2 pour former un complexe nucléaire nécessaire pour l'activation de la résistance de la plante médiée par *RRS1* [370] (**figure 30.A**). RD19 et *RRS1* semblent constituer un substrat potentiel de ripP2, bien que leurs acétylations restent encore à démontrer. L'immunité issue de la coopération RPS4/*RRS1* semble être encore plus complexe que ce que l'on pensait car certaines protéines associées aux chromatines ou CAP (« Chromatine Associated Proteins ») semblent avoir été identifiées comme des substrats potentiels de ripP2 (Deslandes, données non publiées ; **figure 30.B**).

Ces protéines CAP semblent être impliquées dans le remodelage de la chromatine, agissant en tant que co-activateurs transcriptionnels qui aideraient RRS1 à se lier à ses gènes-cibles [352]. Une étude récente a montré que le transfert du couple RRS1/RPS4 de *A. thaliana* dans la tomate par transgénèse fournissait une résistance à la tomate contre *R. solanacearum* [410]. Le transfert de la résistance entre différentes familles botaniques (Brassicacées/Solanacées) ne fonctionne que si les deux gènes sont transférés en même temps. Cette étude propose une nouvelle stratégie de création de variété résistante à une large gamme d'agent pathogènes [410].

Chez l'accession **Kil-0**, après inoculation avec *R. solanacearum*, les plants d'*A. thaliana* ne présentent aucun symptôme de flétrissement malgré une forte concentration bactérienne *in planta* [411]. Cette étude est l'une des seules à démontrer que la tolérance n'est pas toujours un trait polygénique et qu'un gène de résistance peut être commun pour la tolérance et la résistance d'*A. thaliana* [411]. Van der Linden [411] et collaborateurs, ont cependant montré que *R. solanacearum* risque de persister en champ après le déploiement de variétés transgéniques possédant RRS1. Par conséquent, malgré des résultats encourageants de transfert de résistance *via* le couple de gènes RRS1/RPS4 [410], l'utilisation de la source de résistance au flétrissement bactérien médiée par RRS1 reste sujette à caution.

Comme vu précédemment, les PAMPs sont relativement conservés entre les espèces bactériennes. L'une des stratégies de résistance est d'utiliser les récepteurs à ces PAMPs, les PRRs. En introgressant le récepteur EFR (« EF-Tu Receptor ») d'*A. thaliana* dans la tomate, Lacombe et coll. (2010) [412] ont observé une diminution drastique du flétrissement bactérien chez la tomate transgénique contenant EFR [412], soulignant l'intérêt de ce type d'approche en sélection variétale.

1.2.3.2. Chez *Medicago truncatula*

Medicago truncatula est devenu un modèle clef pour étudier la biologie végétale des fruits et des légumes, principalement dû à la taille relativement restreinte de son génome (500Mb). C'est une plante diploïde autogame (s'autofécondant), hautement synténique avec d'autres plantes utilisées en culture légumière et possédant un temps graine-à-graine réduit [413, 414]. De nombreuses études ont ainsi été réalisées sur le modèle d'interaction *Medicago truncatula* vs *R. solanacearum* [414-416].

Chez la légumineuse *M. truncatula*, l'étude de familles de lignées recombinantes (RILs pour « Recombinant Imbreed Lines ») issues du croisement 'A17' (sensible) x 'F83005.5' (résistante) a permis l'identification de 3 QTLs de résistance à la souche GMI1000 [417]. La cartographie fine du QTL majeur de résistance *MtQRRS1* (« *Medicago truncatula* Quantitative Resistance to *Ralstonia solanacearum* 1 ») localisé sur le chromosome 5 de *M. truncatula* a permis l'identification d'un *cluster* de 64 kb contenant 7 gènes putatifs de résistance parmi 15 candidats initiaux. Ces 7 gènes putatifs de résistance possèdent un motif NB-ARC, LRR ou TIR, caractéristique des gènes associés à la résistance des plantes [416]. Un gène a été identifié avec un domaine NB-ARC et un domaine LRR (Medtr5g037690.1). Il présente du polymorphisme entre la lignée sensible 'A17' et la lignée résistante

'F83005.5' (absence du domaine LRR dans cette dernière lignée) [416]. Les 6 autres gènes possèdent chacun un domaine TIR. Cette étude a aussi démontré que les mécanismes moléculaires de la résistance peuvent être tissu-spécifiques, et dans ce cas de l'interaction *M. truncatula* vs *R. solanacearum*, la résistance s'exprime au niveau de l'hypocotyle.

1.2.3.3. Chez les Solanacées à graines

1.2.3.3.1. Chez la tomate

Chez la tomate, la résistance au flétrissement bactérien est de type polygénique et à effet partiel : plusieurs QTLs ont été localisés sur différents chromosomes de la tomate. Chez le cultivar 'Hawaii 7996', identifié comme résistant au flétrissement bactérien [418-421], le QTL majeur contrôlant des souches de différents phylotypes se trouve sur le chromosome 6, tandis que d'autres QTLs phylotypes-spécifiques se trouvent sur les chromosomes 3, 4 et 12 [420-423]. Récemment, Wang et coll. (2013) [424] ont identifié deux QTLs majeurs de résistance à *R. solanacearum*, *Bwr-2* et *Bwr-12*, en utilisant le croisement 'Hawai 7996' x 'West Virginia 700'. Le QTL *Bwr-12* est spécifique à la résistance au phylotype I alors que le QTL *Bwr-6* est associé à la résistance aux souches appartenant aux phylotypes I et II. Le QTL *Bwr-6* est en fait décomposé en quatre QTLs co-localisés sur le chromosome 6 (*Bwr-6a*, *Bwr-6b*, *Bwr-6c* et *Bwr-6d*). La présence des deux QTLs a un effet additif et fournit une meilleure résistance des plantes à *R. solanacearum*.

1.2.3.3.2. Chez l'aubergine

Chez l'aubergine, plusieurs travaux étudiant la génétique de la résistance ont été publiés, mais sans cartographier le ou les QTL(s) en question, et sans information pertinente sur le statut phylogénétique des souches de *R. solanacearum* contrôlées. Les travaux de thèse d'A. Lebeau [425], ont permis d'identifier un gène majeur (*ERs1* pour « Eggplant Resistance to *R. solanacearum* 1 ») dans une population de lignées recombinantes (RILs) issue du croisement entre l'accession résistante AG91-25 (E6) et l'accession sensible MM738 (E8). Ce gène est majeur et dominant et contrôle totalement trois souches de phylotype I dont la souche guyanaise séquencée GMI1000 [283, 426]. Cette résistance est en revanche contournée par plusieurs souches de phylotype I : une souche taïwanaise (PSS4) [426], plusieurs souches ivoiriennes (RUN 1916, RUN1740, RUN1743, RUN1533 et RUN1744) [427], ainsi qu'une souche guyanaise (RUN1985) [428]. Par ailleurs, la carte génétique de référence de l'aubergine a été construite sur une population issue du croisement MM195 (*S. aethiopicum*) x MM738 (*S. melongena*) [429].

Un autre gène putatif de résistance à *R. solanacearum*, nommé *RE-bw* pour « REsistance to Bacterial Wilt » [430], a été récemment caractérisé à partir d'une lignée d'aubergine (*S. melongena*) codée (E-31) [431]. Ce gène possède un domaine NBS-ARC caractéristique de la plupart des gènes de résistance des plantes et un domaine WRKY en C-Terminal [432]. En sur-exprimant le gène *RE-bw*, les auteurs ont observé une augmentation de l'épaisseur de la paroi cellulaire végétale associée à une

importante accumulation de lignine, limitant le développement de *R. solanacearum*. Une augmentation de l'activité des enzymes « scavenger » des formes réactives de l'oxygène (ROS pour « Reactive Oxygen Species ») a aussi été mise en avant après inoculation de *R. solanacearum* [433]. Les enzymes « scavenger » permettent de protéger les cellules végétales des dommages oxydatifs occasionnés par les ROS produits par la plante en réponse à l'attaque d'un agent pathogène [434]. De plus, après inoculation de *R. solanacearum*, les plantes sur-exprimant *RE-bw* montrent une augmentation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation de l'acide salicylique (SA), suggérant une augmentation de la concentration cellulaire du SA [430]. Les auteurs ont ainsi conclu que le gène de résistance *RE-bw* était impliqué dans la réponse immunitaire de l'aubergine à *R. solanacearum* [430]. Parallèlement, après construction d'un mutant de l'effecteur ripP2 et inoculation sur la variété résistante, Xiao et coll. ont constaté une perte de résistance d'E-21, supposant ainsi une interaction potentielle de ripP2 avec RE-bw [430].

1.2.3.3.3. Typologie de l'interaction Solanacées vs *R. solanacearum*

Au cours de sa thèse, A. Lebeau [425] a formalisé les différents profils d'interaction entre phylotypes de *R. solanacearum* et Solanacées à graines, en inoculant 13 souches de phylotype I, II et III (CORE-RS2) sur une *core*-collection de 30 accessions d'aubergine, tomate et piment (CORETEP, 10 cultivars par espèce), choisies selon leurs caractéristiques de résistance et/ou leurs origines géographiques. Les plus hauts niveaux de résistance ont été observés chez l'aubergine, avec plusieurs cas de résistance totale (aucun flétrissement ni aucune colonisation), tandis que la tomate est plutôt caractérisée par de la résistance partielle, et le piment par de nombreux phénotypes de « tolérance » (colonisation bactérienne sans symptômes).

Un total de 6 pathoprofils (A à F ; **Tableau 3**), que l'on peut définir comme des profils d'interaction inter-espèces, ont été identifiés, mais ne sont pas corrélés à la position phylogénétique des souches [425]. Les souches de phylotype I se placent dans les 6 pathoprofils, dont le pathoprofil F est virulent et très agressif sur toutes les lignées sauf sur les lignées d'aubergine E2, E4 et E5 [435]. Les souches du phylotype III se placent dans les pathoprofils B, C, E ; celles du phylotype IIA appartiennent uniquement au pathoprofil C et les souches du phylotypes IIA se placent dans les pathoprofils E et F. Les données d'interaction pour le phylotype IV ne sont pas disponibles à l'heure actuelle. Enfin, des pathotypes intra-espèces ont aussi été définis : cinq pathotypes chez la tomate, six chez l'aubergine et trois chez le piment. Ce criblage a également permis d'identifier un certain nombre de couples souche*variété présentant des interactions incompatibles (ou résistance totale), ce qui suggère l'existence d'interactions gène-pour-gène entre *R. solanacearum* et l'aubergine, plus particulièrement avec les accessions E1, E4 et E6

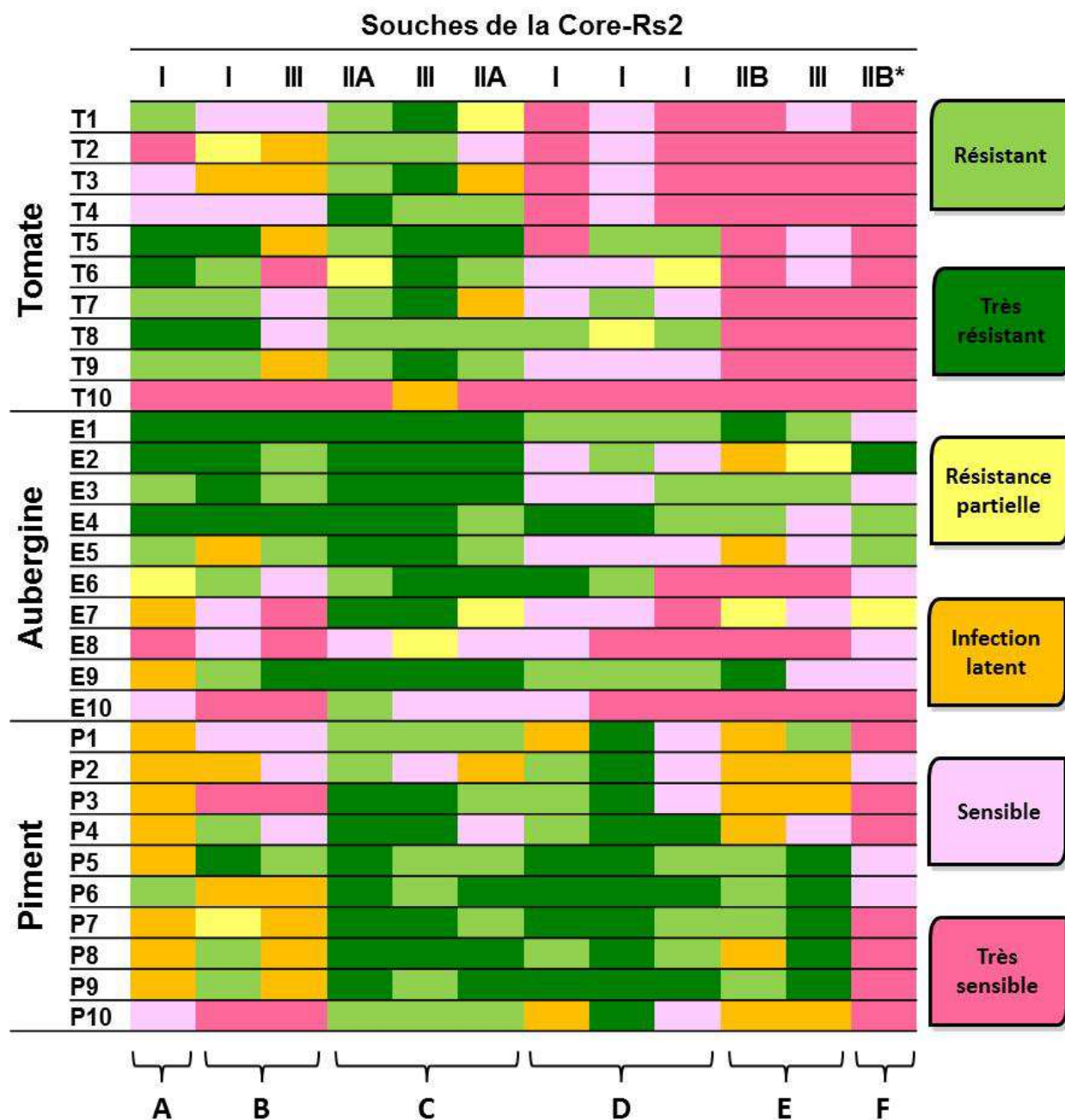


Tableau 3. Tableau représentatif des interactions entre la core-collection de tomate, aubergine et piment (core-TEP) et la core-collection de souches mondiales (core-Rs2). Les lettres de A à F représentent les 6 pathoprofiles définis par Lebeau et coll. (2012), que l'on peut définir comme des profils d'interaction inter-espèces, ont été identifiés, mais ne sont pas corrélés à la position phylogénétique des souches [385]. Les souches de phylotype I se placent dans les 6 pathoprofiles, dont le pathoprofil F est virulent et très agressif sur toutes les lignées sauf sur les lignées d'aubergine E2, E4 et E5 [219]. Les souches du phylotype III se placent dans les pathoprofiles B, C, E ; celles du phylotype IIA appartiennent uniquement au pathoprofil C et les souches du phylotypes IIA se placent dans les pathoprofiles E et F. Les données d'interaction pour le phylotype IV ne sont pas disponibles à l'heure actuelle. Des pathotypes intra-espèces ont aussi été définis : cinq pathotypes chez la tomate, six chez l'aubergine et trois chez le piment. D'après Lebeau [425, 427].

PROBLEMATIQUE DE LA THÈSE

Le flétrissement bactérien est une phyto bactériose d'origine tellurique causée par *Ralstonia solanacearum* [185]. Cette bactérie est répertoriée comme le 2^e agent phytopathogène le plus destructeur au monde [436]. La lutte génétique contre cette maladie apparaît comme la stratégie la plus viable économiquement et environnementalement. La mise en place de stratégies de lutte raisonnée contre le flétrissement bactérien nécessite de gérer au mieux les sources de résistances actuellement disponibles. La gestion durable de ces résistances requiert des études préalables tant sur la biologie de *R. solanacearum* que sur les déterminismes génétiques de la résistance de ses plantes hôtes. Dans l'équipe 2 « Diversité et utilisation durable des ressources génétiques en milieu tropical » de l'UMR PVBMT, le niveau et la spécificité des résistances ont déjà été caractérisés pour certaines accessions de Solanacées [425]. Ces travaux ont mis en évidence la présence d'un gène majeur de résistance *Ers1* associé à un QTL mineur de résistance chez la variété d'aubergine AG91-25 aussi appelé E6 [426]. Ce gène *ERs1*, ainsi que le gène *RE-bw* [430], sont les deux seuls cas de gènes de résistance à *R. solanacearum* chez une plante d'importance agronomique. *ERs1* contrôle totalement trois souches de phylotype I mais est également contourné par plusieurs autres souches de phylotype I, IIA, IIB et III ([425, 427] ; S. Salgon communication personnelle 2014). Dans l'optique de mettre en place des stratégies durables de résistance, il apparaît maintenant indispensable d'estimer la durabilité de la résistance conférée par *ERs1*. Pour cela, la compréhension des processus évolutifs et moléculaires agissant sur la génétique de la bactérie est primordiale afin d'éviter la dissémination d'un variant virulent. A l'heure actuelle, seules quelques études au champ portant sur l'évolution moléculaire des gènes d'avirulence en milieu naturel et sous pression de sélection ont été réalisées [121, 437-439] mais aucune étude ne concerne des bactéries phytopathogènes telluriques à notre connaissance. La durabilité de la résistance peut être étudiée en utilisant différents estimateurs de cette durabilité, qui ont trait aux différentes composantes du potentiel évolutif de l'agent pathogène [1]. Les paramètres influençant le plus ce potentiel évolutif sont le taux de mutation et les flux de gènes, mesure indirecte du potentiel de dispersion, contribuant significativement au risque observé de contournement [1].

Les effecteurs de type III (ET3), acteurs clés de l'interaction hôte/pathogène, contribuent pour certains d'entre eux à la *fitness* bactérienne et représentent aussi des cibles privilégiées pour estimer la durabilité de résistance des plantes [333, 339]. Il a été clairement établi que, plus le coût d'un avantage sélectif associé au contournement d'une résistance est élevé, plus cette résistance est durable (Leach [109]). Chez *R. solanacearum*, certains effecteurs sont associés à la *fitness* et/ou à l'avirulence sur différents hôtes [368, 376]. Estimer la conservation et le taux de sélection sur ces effecteurs d'avirulence peut permettre d'anticiper le contournement de la résistance : un effecteur très conservé sera très probablement essentiel à la survie de la bactérie. Récemment, utilisant une approche de type « top down » (*sensu* [440]), Pensec et coll. [376] ont tenté d'identifier un répertoire d'ET3 associé à l'avirulence et/ou à la virulence sur Solanacées. La première étape de cette approche « top down » a

consisté à confronter les données de virulence de la *core-Rs2* [385, 425] avec les données d'hybridation sur puce à ADN de cette même collection de souches [286]. Pour la deuxième étape de cette approche, 25 gènes associés à l'aviorulence ou à la virulence ont été sélectionnés pour être amplifiés par PCR chez 48 souches, dont 35 sont des souches régionales (Ile de la Réunion). En fonction de leurs répertoires en ET3, les souches ont été classées en 6 groupes et 11 souches représentatives de ces groupes ont été inoculées sur 2 cultivars de tomate et sur 3 cultivars d'aubergine pour tester la virulence de ces souches. Cette approche a permis d'identifier 2 gènes fortement associés à la virulence (*ripA5_2* et *ripV2*) et 7 gènes bactériens hautement associés à l'aviorulence (*ripP1*, *ripP2*, *ripAX2*, *ripN*, *ripG3*, *ripAU* et *ripG5*) [376]. Cette étude est une première étape nécessaire à la décomposition des bases moléculaires de l'interaction entre *R. solanacearum* et les Solanacées, et notamment l'aubergine.

Nous proposons ainsi dans le cadre de ce travail de thèse d'appréhender la durabilité de la résistance conférée par le gène *ErsI* à travers une approche de génétique des populations d'une part et de génomique fonctionnelle et évolutive d'autre part.

La première approche, dite populationnelle, aura pour objectif l'étude et le suivi évolutif d'une population naturelle de *R. solanacearum* sous pression de sélection exercée par la variété résistante E6 (possédant *ErsI*) et d'évaluer son influence sur la diversité et la structure génétique de la population parcellaire de *R. solanacearum*. Un premier cycle de culture de tomate sensible a été implanté dans la parcelle du Vallon. A l'issue de ce cycle de culture, 5 cycles successifs d'aubergines sensibles (E8) et résistantes (E6) ont été implantés (3 microparcelles de chaque cultivar par cycle). L'incidence de la maladie a été suivie tout au long de ces différents cycles de cultures. Pour chaque cycle de culture d'aubergine des bactéries ont été extraites de la rhizosphère et de la tige des aubergines. Le schéma MLVA-phylogène I spécifique de N'Guessan et coll. [187] étant trop peu discriminant pour des bactéries génétiquement proches, il a fallu dans un premier temps développer un nouveau schéma MLVA. Ce premier travail a fait l'objet d'une publication scientifique soumise à BMC Microbiology. Ce nouvel outil de typage nous a permis d'effectuer de plus amples analyses de génétique des populations sur nos populations parcellaire. Les gènes de résistance imposant une pression de sélection aux agents phytopathogènes, nous nous attendons à un contournement rapide de la résistance conférée par *ERsI* au champ. Nous avons cependant isolé quelques souches d'infection latente d'E6. Ainsi la plupart des analyses ont été réalisées sur des souches provenant de la variété sensible E8. A travers cette approche, nous avons tenté de répondre aux questions de recherche suivantes :

- (i) Les successions culturales de la variété résistante E6 vont-elles entraîner un contournement de résistance ?
- (ii) Le fond génétique de l'espèce végétale a-t-il un effet sur la structuration des populations bactériennes ?
- (iii) Les successions culturales d'aubergine ont-elle un effet sur l'incidence et la sévérité de maladie ?
- (iv) Les populations bactériennes issues des différents cycles de culture et des différentes microparcelles sont structurées spatialement et/ou temporellement ?
- (v) Existe-il un effet filtre de la plante sur les populations bactériennes ?

La seconde approche, dite de génomique comparative et de génomique fonctionnelle, étudiera l'implication de 10 ET3 candidats (*ripP1*, *ripP2*, *ripAX2*, *ripN*, *ripG3*, *ripAU*, *ripE1*, *ripAJ*, *ripAS* et *ripAZ1*) dans l'interaction entre l'aubergine résistante E6 et *R. solanacearum*. Ces 10 effecteurs sont associés à l'aviorulence sur aubergine selon Pensec et coll. [376]. La PCR et le séquençage des différents effecteurs nous a permis de connaître la distribution (présence/absence) et le polymorphisme de ces gènes dans une collection mondiale de 91 souches. En collaboration avec l'équipe de S. Genin du LIPM (INRA) de Toulouse, les mutants de chacun des effecteurs de GMI1000 ont été phénotypés sur E6 et E8 par inoculation racinaire. Les clones agro-infectieux contenant chacun des effecteurs seuls ont aussi été inoculés sur feuille d'aubergine (E6 et E8). A l'issue de ces tests phénotypiques, les allèles les plus associés à l'aviorulence sur aubergine résistante ont ensuite été clonés à VirginiaTech, dans le laboratoire de B. Vinatzer. Parallèlement, un set restreint de souches dont la virulence est connue sur E6 a été entièrement séquençé (9 génomes) afin de comparer sans *a priori* les répertoires d'effecteurs et éventuellement de les associer à leur profils de virulence E6. Ainsi, dans cette deuxième partie de thèse les questions de recherches auxquelles nous tenterons de répondre seront :

- (i) Quel est le pattern de distribution et la variabilité des 10 ET3 dans une large collection de souches ?
- (ii) Quel est le lien entre les répertoires d'ET3 et le phénotype de ces souches sur aubergine ?
- (iii) Est-ce que la virulence et l'aviorulence sont expliquées par la présence, l'absence ou la variabilité allélique d'un/plusieurs effecteur(s) ?
- (iv) Ces effecteurs bactériens ont une fonction d'aviorulence sur aubergine résistante? Si oui, lesquels ?
- (v) De quelle nature est l'interaction entre le gène de résistance *ERs1* et le(s) effecteur(s) bactérien(s) ayant une fonction d'aviorulence sur E6?

CHAPITRE 2 :
DYNAMIQUE ÉVOLUTIVE D'UNE
POPULATION PARCELLAIRE DE
***R. SOLANACEARUM* SOUS**
PRESSIONS DE SÉLECTION

PARTIE 2.1

Mise au point d'un schéma MLVA permettant le suivi microévolutif d'une population parcellaire de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I

1. Problématique

Le flétrissement bactérien, causé par *Ralstonia solanacearum*, est considéré comme l'une des maladies les plus nuisibles au niveau mondial [436]. Le phylotype I est hautement recombino-gène, réparti mondialement [250], en expansion démographique [166] et possède une large gamme d'hôtes [252, 390]. Ainsi, une attention particulière doit y être portée. Ces caractéristiques indiquent que le phylotype I possède un fort potentiel évolutif *sensu* [1] et qu'il est un bon modèle pour étudier la dynamique évolutive des interactions plantes-bactéries.

Bien que les mécanismes moléculaires de l'interaction entre *R. solanacearum* et ses plantes hôtes – ou non hôtes – ont été largement étudiées [272, 273, 283, 285, 286], les relations épidémiologiques et la génétique des populations de cette bactérie restent mal connues et seulement quelques études s'y sont intéressées [166, 435]. Jusqu'à présent, seules deux études ont analysé la structure génétique de ces populations à l'échelle locale : en Inde, en utilisant des marqueurs RAPD (« Random Amplified Polymorphism DNA ») [441] et à Trinidad, en utilisant des marqueurs de type Rep-PCR (« Repetitive-Polymerisation Chain Reaction ») [442]. Cependant, la faible répétabilité et portabilité inter-laboratoires de ces marqueurs ne permettent pas une comparaison fiable des résultats obtenus. Ces dernières années, l'utilisation de méthodes de typage basées sur des motifs répétés en tandem (VNTR pour « Variable Number of Tandem Repeats ») est de plus en plus fréquente en épidémiologie moléculaire. En effet, ils présentent l'avantage d'être polymorphes sur des bactéries génétiquement monomorphes, portables entre laboratoires, répétables et faciles à développer. Ainsi, deux schémas MLVA (« Multi-Locus VNTR Analysis ») ont été développés jusqu'à présent pour typer des populations de *R. solanacearum* [187, 188] dont un seul se focalisant sur le phylotype I [187].

Ce dernier schéma MLVA de 13 marqueurs microsatellites (MLVA-13) [187] a permis d'étudier la structuration génétique de populations régionales de *R. solanacearum* en Côte d'Ivoire. Cependant, en utilisant ce schéma sur une collection parcellaire de *R. solanacearum*, un seul locus présentait du polymorphisme. Nous n'avons donc pas pu conduire des analyses fines de génétique des populations et avons ainsi développé un nouveau schéma MLVA (ci-après nommé MLVA-8) afin de pouvoir différencier des souches de *R. solanacearum* de phylotype I génétiquement proches. L'objectif de cette étude est (i) d'identifier de nouveaux locus VNTR présentant une forte diversité allélique au sein des phylotypes I et III, (ii) d'évaluer leur pouvoir de discrimination à la fois sur des collections échantillonnées à une même localisation mais à différentes dates ainsi que sur des collections

échantillonnées à une échelle réduite (quelques litres de sol) et (iii) de vérifier leur utilité pour des études de microévolution et de différenciation de ces populations.

2. Méthodologie

La recherche de *loci* VNTR a été réalisée à partir des génomes séquencés et annotés de deux souches de phylotype I (GMI1000 [283] et Y45 [443]) et d'une souche de phylotype III (CMR15 [273]). Des répétitions en tandem (TR) ayant une taille comprise entre 5 et 9 paires de base (pb) et répétées au moins 7 à 9 fois dans le génome d'origine ont été sélectionnées. Parmi les 24 TRs détectées, seulement 7 se sont révélées polymorphes sur une sous-collection de 24 souches, (16 souches locale de *R. solanacearum* et 8 souches mondiales). Un 8^{ème} locus a été intégré dans notre schéma car il présentait du polymorphisme sur la collection parcellaire de souches. Les 8 marqueurs ont été multiplexés en deux *mixes* de 4 marqueurs chacun et les conditions de PCR ont été optimisées. La spécificité du nouveau schéma MLVA-8 a ensuite été testée sur trois souches du genre *Ralstonia* (*R. pickettii*, *R. mannitolylitica* et *R. insidiosa*). La spécificité phylotypique et la cohérence phylogénétique de ce nouveau schéma ont ensuite été estimées sur 55 souches additionnelles de phylotypes I (37 souches), IIA (5 souches), IIB (3 souches), III (6 souches) et IV (4 souches).

Différentes collections ont été utilisées pour la suite des analyses : 4 collections locales (collections « Vallon 1999 », « Vallon 2009 », « Vallon 2012 » et « Pirogue 2007 ») et une collection mondiale de souches (34 souches de phylotype I dont 18 provenant de Côte d'Ivoire [187]). Le pouvoir de discrimination du schéma MLVA-8 a été évalué et comparé au schéma MLVA-13 et à la technique de typage *egl/mutS* en calculant l'indice de discrimination de Hunter et Gaston (HGDI) [444]. Sur cette collection multi-échelle de souches, la congruence entre le MLVA-8 et le MLVA-13 [187] a aussi été étudié par un test de Mantel [445]. Finalement, l'apport du schéma pour des études de micro-évolution et de structuration spatio-temporelle a été évaluée en analysant la diversité génétique (H de Nei) [446] le *clustering* génétique ou DAPC (pour « Discriminant Analyses of Principal Component »), les réseaux d'haplotypes et le déséquilibre de liaison (DL).

3. Résultats et discussion

Le MLVA-13 [187] a en premier lieu été utilisé pour typer une collection locale de souche (n=319). Cependant, un seul marqueur VNTR (CMmp0985) s'est révélé polymorphe sur cette collection. Trois haplotypes ont été identifiés, ce qui ne permettait pas de réaliser des études fines de génétique des populations. Nous avons donc développé un nouveau schéma MLVA (MLVA-8) comprenant 7 nouveaux VNTRs ainsi que le marqueur CMmp0985 [187].

Ce schéma s'est révélé spécifique au complexe d'espèces *R. solanacearum* car il n'amplifie aucune des trois souches du genre *Ralstonia*. Par ailleurs, toutes les souches de phylotype I et la majorité des souches du phylotype III ont été amplifiées, alors que les phylotypes IIA, IIB et IV ne l'ont été que faiblement. Ces résultats confirment la proximité génétique des phylotypes I et III et

renforcent l'hypothèse d'une séparation de *R. solanacearum* en trois espèces génomiques [272, 274, 275]. Les *loci* du schéma MLVA-8 se sont révélés hautement polymorphes, ce qui a permis de détecter 89 haplotypes parmi les 580 souches étudiées, dont 43 haplotypes qui ont été détectés au sein d'une collection parcellaire de 319 souches (« Le Vallon 2012 »). Sur cette collection globale de 580 de souches, entre 1 et 14 allèles par *locus* ont été détectés.

L'analyse de la discrimination a montré que le schéma MLVA-8 était plus discriminant que le schéma MLVA-13, non seulement aux échelles mondiale et régionale mais aussi à l'échelle locale (collections « Pirogue » et « Vallon ») où il a permis de détecter jusqu'à 10 fois plus de diversité génétique. Sur ces deux dernières collections, le MLVA-8 a permis de différencier génétiquement des souches issues d'un même point de prélèvement.

L'analyse de la structuration par test de Mantel sur une collection mondiale de souches montre que le schéma MLVA-8 est cohérent avec le schéma MLVA-13. En effet, les 34 souches composant cette collection sont regroupées au sein des mêmes *clusters*. Par ailleurs, cette analyse démontre la spécificité des souches africaines de phylotype I par rapport aux souches asiatiques ainsi que l'originalité des souches martiniquaises. Notre schéma ne détecte pas de profil allélique commun entre ces souches et celles de La Réunion, démontrant la cohérence phylogéographique de notre schéma. Nos résultats soulignent aussi la proximité phylogénétique des souches ivoiriennes et réunionnaises.

4. Conclusion

Cette étude fournit un outil moléculaire capable de caractériser la diversité génétique de *R. solanacearum* de phylotype I. Nos marqueurs permettent de différencier des souches génétiquement proches issues d'une même parcelle. Cette technique de typage est hautement résolutive et est essentielle pour déterminer la structuration génétique d'un pathogène à l'échelle d'un pays ou d'un champs, ce que les techniques conventionnelles de typage ne parviennent pas à démontrer. Jusqu'à présent, ce type d'étude de la structuration génétique de populations de *R. solanacearum* a déjà été réalisé à l'échelle d'un pays et d'une région mais n'a pas encore été réalisé à l'échelle de la parcelle. Cette approche locale pourrait conduire à la compréhension des mécanismes d'adaptation, par exemple en réponse à une forte pression de sélection. En effet, le *pattern* d'évolution de *R. solanacearum* face à une variété résistante est encore inconnu à l'heure actuelle.

5. Publication

L'ensemble de ce travail a donné lieu à une publication scientifique soumise à une revue internationale de rang A avec comité de lecture : BMC Microbiology. L'article scientifique s'intitule « **A new multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I populations** ». **J. Guinard**, A. Latreille, F. Guérin, S. Poussier and E. Wicker (2015). Les tableaux et figures supplémentaires sont présentés en Annexe 1.

1 **A new multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA)**
2 **scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia***
3 ***solanacearum* phylotype I populations**

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13 5 Guinard Jérémy^{a,b}, Latreille Anne^{bc}, Guérin Fabien^a, Poussier Stéphane^a and Wicker
14 Emmanuel^{b*}
15
16
17
18
19
20

21 8 ^a Université de la Réunion, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu
22 Tropical (PVBMT), 15 avenue René Cassin, BP7151, F-97715 Saint Denis Cedex 9, Réunion,
23
24 9 France.
25
26 10

27
28
29 11 ^b CIRAD, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT),
30 Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Réunion, France
31
32 12
33
34

35 13 ^c current adress : INRA, URFM - UR629 Unité de Recherche Écologie des Forêts
36 Méditerranéennes, Site Agroparc, Domaine Saint Paul, F-84914 AVIGNON Cedex 9
37
38 14
39
40
41
42
43
44

45 16 ***Corresponding author:** Emmanuel Wicker

46
47 17 CIRAD, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Reunion,
48 France. Phone: (+262) 262 49 92 42; Fax: (+262) 262 49 92 93;
49
50 18
51

52 19 Email address: wicker@cirad.fr
53
54
55
56 20
57
58
59
60
61
62
63
64
65

21 **Abstract:**

22 **Background**

23 Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is considered as one of the most harmful
24 plant disease in the world. Special careful should be paid to phylotype I due to its large host
25 range, its worldwide distribution, and its high evolutionary potential. Molecular epidemiology
26 and population genetics of this bacterium are still poorly understood. Until now, the genetic
27 structure of *R. solanacearum* has been analyzed at the worldwide and regional scales;
28 emerging questions regarding evolutionary forces to play in *R. solanacearum* adaptation to
29 host require now genetic markers able to monitor *R. solanacearum* field populations. In this
30 study, we aimed at evaluating the multi-locus variable number of tandem repeat analysis
31 (MLVA) approach to discriminate genetically closely related phylotype I strains and for
32 population evolutionary studies.

33 **Results**

34 A previous *R. solanacearum* phylotype I-specific MLVA scheme (MLVA-13) was developed
35 and allowed authors to study the genetic structure of Ivorian strains. When we used this
36 MLVA scheme to type field collections of strains (“Le Vallon 2012” collection), only one
37 locus was polymorphic and we were not able to perform population genetics analyses.
38 Therefore, we developed a new MLVA (MLVA-8) scheme allowing us to genotype 580
39 phylotype I strains of *R. solanacearum* extracted from different susceptible and resistant host
40 and from different habitats (stem, soil and rhizosphere). Based on specificity, polymorphism
41 and success in amplification, we selected eight fast evolving VNTR markers over 24 tested.
42 Our MLVA-8 showed higher discriminatory power than the MLVA-13 when applied on
43 collections sampled from the same location at different dates, and from different locations at
44 very small scales (from a single soil bulk to different plant localizations).

45

46 **Conclusion**

1
2 47 We developed a new MLVA scheme (MLVA-8) specific to phylotype I strains, more
3
4 48 discriminant than the previously developed MLVA-13 scheme, thus providing a valuable tool
5
6
7 49 for fine tune monitoring and microevolution study of *R. solanacearum* phylotype I
8
9
10 50 populations.

11 51

12
13
14 52 **Key words**

15
16 53 *Ralstonia solanacearum*, phylotype I, Multilocus VNTR Analysis, specificity, discrimination
17
18
19 54 power, microevolution, population biology
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

55 1) Introduction

1
2
3 56 Intensification of agriculture during the XXth century led to global change in cropping
4
5 57 practices and intensification of rapid and large-scale exchanges. Thus, it increased risks for
6
7 58 food security by contributing to significant changes in plant pathogen populations such as
8
9
10 59 emerging and/or reemergence of pathogens and selection of virulent pathogen populations [1].
11
12 60 Among the different strategies to control plant pathogens agents, the deployment of resistant
13
14 61 varieties appears to be the most promising solution [2]. The implementation of efficient and
15
16 62 durable disease management strategies requires deciphering the ecological and genetic
17
18 63 mechanisms that lead to the adaptation of a pathogen population to a new host or to a new
19
20 64 resistant cultivar [3]. Investigating in deep these mechanisms at the field scale requires the use
21
22 65 of efficient *ad hoc* molecular markers.

26
27 66 For now, several markers have been developed through the use of deoxyribonucleic acid
28
29 67 (DNA) fingerprinting methods (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP),
30
31 68 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Random Amplified Polymorphic DNA
32
33 69 (RAPD)) and housekeeping gene sequencing (Multi Locus Sequence Typing (MLST) and
34
35 70 Multilocus Sequence Analysis (MLSA)) but Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)
36
37 71 markers, with their fast molecular clock [4], remain the most suitable tools for molecular
38
39 72 epidemiology studies [5]. VNTR are tandem repeat of sequences ranging from 5 to 100 base
40
41 73 pairs (bp) whose use for genotyping have grown extensively popular due to their portability
42
43 74 between different laboratories, their reproducibility and their high level of polymorphism on
44
45 75 monomorphic bacteria [6]. VNTR analysis has been widely used in the medical field, notably
46
47 76 to monitor epidemics of bacteria with little genetic diversity such as *Bacillus anthracis* [7],
48
49 77 *Yersinia pestis* [8] [9], *Mycobacterium tuberculosis* [10] [11], *Burkholderia pseudomallei* [12,
50
51 78 13] or methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [14] and to assess their evolutionary
52
53
54
55
56
57
58
59 79 history at different times and space scales [15] [16]. Although there is a growing interest in
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

80 the use of Multi-Locus VNTR Analysis (MLVA) in plant-associated bacteria, only few
81 studies have been published focusing on their population biology. These few studies aimed to
82 trace sources of water contamination (*Ralstonia solanacearum* [17]), to study the population
83 structure of pathogens related to host (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) and
84 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) [18], *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (*Xam*)
85 [19] and *R. solanacearum* [20]), to reconstruct the emergence history (*Xanthomonas citri* pv.
86 *citri* (*Xcc*) [21-23]), to analyze the structure and evolution of pathogen population (*Xcc* [24],
87 *Erwinia amylovora* [25]) and for global surveillance (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and
88 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [26]). Moreover, studies investigating population structure
89 at small geographical scale have seldom been realized for plant associated bacteria, as well as
90 for plant associated microbes (oomycetes and fungi) [22, 27-29].

91 Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, a soil-borne proteobacterium, is one of the
92 most economically important bacterial plant diseases worldwide [30] mainly due to its wide
93 geographical distribution and its large host range reaching more than 450 host species
94 belonging to 54 botanical families [31]. *R. solanacearum* is rather a primitive vascular plant
95 pathogen [32] and is considered as a species complex [33] [34] composed of four phlotypes,
96 classification highly correlated to their geographical origin [33]. These phlotypes display
97 specific evolutionary dynamics, as estimated by their recombination rate and demographic
98 histories [35]. Based on housekeeping gene sequence analysis, phylotype I population
99 structure presents molecular signatures of a recent and rapid demographic expansion [35],
100 suggesting a high dissemination capacity. Moreover, phylotype I is highly recombinogenic
101 [35, 36], worldwide distributed [31], affects the highest number of host [37] [38] and contains
102 the six pathoprofiles (virulence pattern on a core-collection of tomato, eggplant and pepper; as
103 defined by [39]) [40]. Altogether, it clearly indicates that phylotype I strains have a high
104 evolutionary potential *sensu* Mc Donald & Linde [41], therefore making this phylotype an

105 interesting model for studying the evolutionary dynamics of plant-bacterium interactions.
1
2 106 Whereas the molecular basis of its interactions with plants and the variability of its genome
3
4
5 107 have been widely investigated [42-48], the population genetics and dynamics of this
6
7 108 fascinating plant pathogen remains poorly understood and considered. Until now, only two
8
9 109 studies addressed population genetic structure issues at the local scale in India by using
10
11 110 RAPD polymerase chain reaction (PCR) [49] and in Trinidad island by using repetitive
12
13 111 sequence-based PCR (REP-PCR) [50]. Unfortunately, the low repeatability and
14
15 112 reproducibility of RAPD markers renders these results difficult to interpret, and REP-PCR
16
17 113 portability between laboratories remain problematic [6]. To date two MLVA schemes have
18
19 114 already been developed to decipher *R. solanacearum* population genetics at different scales
20
21 115 [20] or to investigate source of water contamination [17]. The N'Guessan's MLVA-phylogroup
22
23 116 1 specific scheme [20] (13 loci, hereafter abbreviated MLVA-13) gave promising results in
24
25 117 discriminating populations within scales ranging from cropping area to continents [51]. The
26
27 118 second MLVA scheme (MLVA-5) aimed to characterize phylotype II sequevar 1 strains
28
29 119 attacking potato tubers [17]. In the present study, we first evaluate the MLVA-13 scheme for
30
31 120 its discriminatory power on strains from the same field. As this scheme was poorly
32
33 121 polymorphic at the field scale, we thus developed a new MLVA phylotype I-specific scheme,
34
35 122 and tested its ability for conducting population genetics and microevolution studies at the field
36
37 123 scale. More specifically, our objectives were (i) to identify new VNTR loci displaying a
38
39 124 potentially higher allele diversity within phylotype I and III genomes, (ii) to evaluate their
40
41 125 discriminatory power on collections sampled from the same location at different dates, and
42
43 126 from collections of different locations but sampled at very small scales (single bulk soil and
44
45 127 different plant localizations) and finally (iii) to verify their suitability for assessing population
46
47 128 differentiation and population evolution.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59 129
60
61
62
63
64
65

130 **Materials and Methods**

131 *Bacterial strains*

132 A total of 543 strains extracted from bacterial wilt-symptomatic and asymptomatic plants, and
133 *R. solanacearum*-infested soil were used in this study (Table 1 and additional file 1). To
134 assess the phylotype-specificity and the phylogenetic coherence of our markers, 55 additional
135 strains composed of phylotype I strains (37), IIA strains (5) and IIB strains (3), III (6) and IV
136 (4) were also genotyped, as representatives of the worldwide diversity of *R. solanacearum*
137 (Additional file 2). The species-specificity of MLVA markers was tested on DNA from
138 *Ralstonia pickettii* (LMG5942^T), *Ralstonia mannitolylitica* (LMG6866^T) and *Ralstonia*
139 *insidiosa* (LMG21421^T) (Additional file 2). *R. solanacearum* collections from the field “Le
140 Vallon” (CIRAD Research Station “Ligne Paradis”, Saint Pierre, Reunion Island [latitude
141 21.320806°S, longitude 55.484525°E]) were isolated either from stem base, rhizosphere or
142 soil. Collection “Vallon 1999” was composed of 96 phylotype I strains, collection “Vallon
143 2009” was composed of 90 phylotype I strains and “Vallon 2012” was composed of 319
144 phylotype I strains (Table 1). The 38 phylotype I strains of the collection “Pirogue 2007”
145 (Habitation Pirogue, Morne Capot, Le Lorrain, Martinique (French West Indies), latitude
146 14.803049°N, longitude 61.104434°W) were extracted from five grams of soil sampled in a
147 three-liter bulk at one location point (Table 1 and Additional file 1).

148 Strains from “Vallon 1999” collection were previously described by Poussier [52]. Plant
149 bacterial isolates were extracted from a 5 cm segment of stem following the protocol
150 previously described [40]. For bacterial extraction from rhizosphere, complete root systems
151 were soaked in 200 to 500 mL of Van-Elsas & Smalla buffer (VES) [53] and shaken
152 overnight at 120 rotations per minute (rpm) at 28°C. For bacterial extraction from soil, 20 g of
153 fresh soil (0-20 cm top layer) were soaked in 100 mL of VES buffer, rotated for 30 min at 100
154 rpm, then left to settle for 5 min. One mL-aliquots were sampled and diluted serially down to

155 10^{-4} . Afterwards, macerates (50 μL) were streaked either on Imazaki medium (rhizosphere
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
156 and soil) [54] or on modified Sequeira medium [55]. Plates were then incubated 28°C for 2 to
157 3 days. Isolates presenting the typical morphology of *R. solanacearum* – mucoid, “bird’s eye”
158 shaped beige colonies with formazan coloration – were finally plated on Kelman’s
159 triphenyltetrazolium chloride (TZC) medium [56]. Finally, bacteria were stored on
160 microbeads (Microbank[®] ProLab Diagnostic, Neston, Wirral, United Kingdom) or in 20%
161 glycerol at -80°C .

163 *Molecular typing and DNA extraction*

164 Molecular identification to the *R. solanacearum* species complex and determination of the
165 phylotype were performed using multiplex PCR (mxPCR) on bacterial suspensions ($\sim 10^8$
166 cells.mL^{-1} in HPLC water) as previously described [57] [58]. PCR products were then
167 migrated on 2% electrophoresis agarose and visualized in UV light after ethidium bromide
168 coloration (5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). For isolates identified as *R. solanacearum*, bacterial suspensions
169 ($\sim 5.10^8$ to 1.10^9 CFU.mL^{-1}) were washed with 1 mL of NaCl 0.5 M and centrifuged at
170 12000g. Then pellets were subjected to the Wizard[®] Genomic DNA purification lysis buffer
171 (Promega, Fitchburg, Wisconsin, United States of America), and DNA was extracted
172 following the protocol provided by the manufacturer. DNA concentration and quality were
173 checked using a NanoDrop [®] ND-8000 device (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington,
174 USA). For genotyping, DNA was diluted at 2 $\text{ng.}\mu\text{L}^{-1}$ in HPLC water and stored at -30°C .

176 *Sequence-based molecular typing (egl and mutS)*

177 Multilocus sequence typing based on partial sequence of DNA mismatch repair (*mutS*) or
178 virulence associated endoglucanase (*egl*) has been a reference technique in molecular
179 diagnostic of *R. solanacearum* [40, 57, 59, 60]. *Egl* sequevars and *mutS* sequence-types were

180 determined using respectively Endo-F/Endo-R and mutS-RsF.1570/mutSRsR1926 primer
181 pair. PCR conditions, sequencing procedure, were performed as previously described [40].
182 Sequences were assembled with Geneious v 6.0.3 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand)
183 and aligned with the algorithm ClustalW [61] implemented in MEGA5 [62], then trimmed as
184 earlier explained [35]. *Egl*-based sequevars and STs (eST), and *mutS*-based STs (mST) were
185 assigned using *egl* and *mutS* reference sequences [35] within DnaSP using the “generate
186 haplotype list” command [63].

188 *Genotyping with the MLVA-13 scheme [20]*

189 The N’Guessan *et al* phylotype I-specific MLVA scheme [20] (13 loci), named MLVA-13
190 was first used to assess the genetic diversity of 319 phylotype I strains from field collections
191 (Collection “Vallon 2012”) and from a worldwide collection of strains (n=34) (Additional file
192 2). Multiplexed primer mixes and PCR conditions were performed as previously described
193 [20]. Capillary electrophoreses were performed in an ABI PRISM 3130XL sequencer, and
194 electrophoregrams generated were analysed with GeneMapper v 4.0 (Applied BioSystems,
195 Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

197 *Development of a new MLVA scheme (MLVA-8)*

198 Three fully sequenced and annotated genomes (phylotype I GMI1000 [45] and Y45[48],
199 phylotype III CMR15 [42]), publicly available via the MaGe interface (RalstoniaScope, [64])
200 were screened for detection of tandem repeats using the websites : “Microorganisms Tandem
201 Repeats Database” (MTRDB) [65, 66] and the “Tandem Repeat Database” (TRDB) [67]. It is
202 reported that the number of alleles is correlated with the number of TR repetition in the
203 genome and is conversely correlated to the pattern size [68], but no general rules have been
204 published so far. From literature, expert personal communications (O. Pruvost, 2012) and the

205 first *R. solanacearum* MLVA development [20], we observed that highest polymorphism
206 were observed on loci with more than 10 repeats and pattern sizes ranging from 5 to 9 bases
207 pair (bp) [20]. For TR detection on MTRDB we thus set the following criteria (after a
208 preliminary search): total length in a range of 50–600 bp, the TR length in a range of 5–9 bp,
209 the copy number in a range of 9–50, matching percentage above 80%, and other parameters
210 set as default. TR detection on TRDB was performed using default parameters (alignment
211 weights at 2, 7, 7 respectively for match, mismatch and indels; the two latter parameters are
212 considered least permissive; see detailed explanation on TRDB finder website [67])). PCR
213 primers (18-27 bp) were designed within the 500 bp-flanking sequences of the TR using
214 Geneious software v 6.0.3 (Biomatters Ltd). Primer sequences were then blasted using the
215 BLASTN program [69] available on MaGe website [64] to determine the location of loci and
216 to check the specificity of each pattern to a single locus per genome. This first step lead to the
217 identification of 24 loci, that were further screened for amplificability, repeatability and
218 polymorphism on a 24 strains-collection subset (Tables S1 and S2): (i) 16 strains from the
219 collection “Vallon 2012” selected on the basis of their allelic profile when using the MLVA-
220 13 scheme, their location in the field, their host (tomato, susceptible or resistant eggplant) and
221 their sampling habitat (stem, rhizosphere and soil) and (ii) 8 worldwide strains [20] selected
222 on the basis of the clonal complex they belong to and their geographic origin. Simplex PCR
223 were performed as previously detailed [20] and followed by electrophoresis migration with
224 high resolution Metaphor Agarose (3% MetaPhorTM and 1% SeaKem[®]Agarose; Lonza Ltd,
225 Basel, Switzerland). Based on these results, seven loci and primer pairs were selected to
226 develop the new MLVA scheme (Table 2). As we found that CMmp0985 (RS3L20) from
227 N’Guessan *et al.* scheme [20] was the only polymorphic locus on the “Vallon 2012”
228 collection, RS3L20 primers were added to the seven other loci to compose the new MLVA-8
229 scheme. Primers were multiplexed into two pools of four pairs (Table 2) labeled on the

230 forward primer with different fluorescent dye: 6-FAM (blue), VIC (green), NED (yellow) and
231 PET (red) (Applied BioSystems). Primers concentrations and annealing temperatures were
232 optimized for amplification of loci on four reference strains according to the manufacturer
233 instruction (Applied BioSystems). Capillary electrophoresis was performed as mentioned
234 above.

236 *VNTR analysis and performance measures*

237 Peak data were analyzed using GeneMapper v 4.0 (Applied BioSystems) and automatically
238 converted in fragment size (bp). Analyses cited underneath were realized using the
239 amplification size. When needed, amplicon sizes were converted in repeat number using the
240 formula: observed size = extra TR sequence length + (TR size × repeat number). The number
241 of TR was rounded up to the nearest integer, as previously recommended [70].
242 Reproducibility of the amplification of our markers was assessed using GMI1000, the
243 reference phylotype I strain [45], as a positive control for each genotyping run, and also by
244 amplifying twice the 37 phylotype I strains composing the worldwide collection from
245 independent DNA extractions. Allelic profiles were identical across the different replicates.

247 *Analysis of genetic data*

248 Haplotypes (defined as allelic profiles), Nei's unbiased diversity index (H.u.b) [71], the total
249 number of alleles (Na) and their frequencies were determined using the software GenAlex
250 v6.5 [72]. Discriminatory power of *egl/mutS*-based typing technique and MLVA-based
251 technique were compared by using the Hunter & Gaston Discriminatory Index (HGDI) [73],
252 as previously detailed [20]. To assess the correlation between locus location (chromosome vs.
253 megaplasmid, intergenic vs. intragenic) and locus polymorphism, allele numbers of loci were
254 statistically compared by a Fisher exact test under the null hypothesis (H0) that a locus has an

255 equal probability to be polymorphic wherever its position. A Principal Component Analysis
256 (PCA) was realized using the ‘ade4’ package [74] implemented in R software [75] on the
257 allelic profile to determine which loci are the most informative and which markers most
258 contribute to the differentiation of strains.

259 Haplotype networks were achieved with the global optimized eBURST analysis (goeBURST)
260 implemented in PHYLOViZ v1.0 [76]. These analyzes allowed to highlight different clonal
261 complexes, defined as groups of Single Locus Variant (SLV). It also allows visualization of
262 allelic profiles diverging by one locus (SLV) or several loci (Double Locus Variant (DLV),
263 Three Locus Variant (TLV), etc...). With the eBURST algorithm the STs are clustered with
264 respect to their number of SLVs, DLVs, TLVs and occurrence frequency. The group founder
265 is firstly connected to all its SLVs, then, each one of those, following the ST ordering, is
266 connected to their SLVs not yet present in the tree. This process is repeated until every
267 element of the disjoint graph is present in the tree. The second step consists in a local
268 optimization of the tree. The goeBURST algorithm provides a global optimal solution and
269 corrects links that were not strictly following the eBURST rules.

270 To assess the congruence of MLVA-13 and MLVA-8 clustering, distances matrices were
271 calculated and compared by Mantel test using the “CADM.post” function of the R Package
272 “ape 3.1-4” with 9999 permutations [77]. The Mantel correlation coefficients are computed
273 on rank-transformed distances, among the distance matrices.

274 The population structure of *R. solanacearum* (the worldwide strain collection and the three
275 “Vallon” collections), was assessed using the Discriminant Analysis of Principal Components
276 (DAPC) with ‘adegenet 1.4.1 and 1.4.2.’ package [78] implemented in the R software. This
277 clustering method, free of any assumption related to a population genetics model (e.g. Hardy-
278 Weinberg equilibrium, absence of linkage disequilibrium) [6] provides an efficient description
279 of genetic clusters using a few synthetic variables (called the discriminant functions). DAPC

280 yields linear combinations of the original variables (alleles) which maximize differences
281 between groups while minimizing variation within clusters. Clusters were defined by
282 independent k-means, using the Bayesian Internal Criterion (BIC), and DAPC runs were
283 performed in order to assess stability of clusters. The “xvalDAPC” function was used to
284 choose the optimal number of PCs for DAPC.

285 To detect signatures of recombination and population structure within field collections,
286 multilocus linkage disequilibrium (LD) was estimated using the index of association
287 calculated by the R package “poppr” [79]. Poppr calculates both Brown’s indices I_A , which
288 was found to increase with the number of loci, and r_d which corrects for this scaling and
289 forces the index to lie between 0 (linkage equilibrium) and 1 (full disequilibrium). To test the
290 significance of both indices, the package generated 999 resampling of the data under the null
291 hypothesis (H0) of free recombination using the “permutation over alleles” and “parametric
292 bootstrap” methods, and then calculated a P -value.

293

294 **2) Results**

295

296 *Genotyping using N'Guessan's [20] MLVA scheme (MLVA-13)*

297 We first used a previously developed MLVA scheme (MLVA-13) [20] on a collection
298 composed of 319 strains of *R. solanacearum* phylotype I isolated from a single field ("Vallon
299 2012" collection). At the field scale, only one locus of the MLVA-13 scheme (RS3L20) was
300 polymorphic, with only 3 alleles detected and therefore only three haplotypes were detected.
301 With only one marker polymorphic, genetic diversity detected was very low (measured by the
302 Nei's unbiased diversity indexes (H.u.b) of 0.007) (Table 3) and we could not properly
303 performed population genetic analysis.

304

305 *Development of a new MLVA scheme (MLVA-8): VNTR loci location, polymorphism and* 306 *information level*

307 From the 24 TRs loci selected, eleven were detected on the chromosome (four from
308 GMI1000, three from Y45 and four from CMR15), and thirteen were detected on the
309 megaplasmid (five from GMI1000, three from Y45, five from CMR15). Four of the eleven
310 chromosomal loci were intergenic whereas all 13 megaplasmid loci were intergenic. No
311 significant (NS) differences in polymorphism were neither observed between chromosome
312 and megaplasmid loci (P -value = 1.000 NS), nor between intergenic and intragenic loci (P -
313 value = 0.625 NS). High resolution agarose gel electrophoresis was performed for these 24
314 loci on a 24-strains collection including 16 local strains (from field "Le Vallon") and eight
315 strains from the worldwide collection, revealing only seven loci to be polymorphic. These loci
316 were between 6 and 9 bp long and repeated between 5 to 21 times in the genome of origin
317 (Table 2). Among these seven loci identified, four were from GMI1000 genome (GMch0133,
318 GMch0754, GMmp3461 and GM0266), two from CMR15 genome (CMmp0131 and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

319 CMmp0233) and one from Y45 genome (Ymp0875). From these results (ie 7 polymorphic
320 loci) and the typing results using the MLVA-13 (ie 1 polymorphic locus), we defined a new
321 MLVA scheme hereafter called MLVA-8. The inter-experimental (between plates) variation
322 of fragment size calling by capillary electrophoresis reached 1 bp when the GeneScan-500
323 LIZ size standard was used and allowed unambiguous assignation of alleles. The number of
324 TR expected (*in silico* prediction) and the number of TR observed for reference strains
325 GMI1000 (phylotype I) and CMR15 (phylotype III) were statistically similar between each
326 other (Chi-square Test: P -value = 0.976 NS and P -value = 0.988 NS respectively).
327 Considering the whole *R. solanacearum* phylotype I collections (580 strains), the highest
328 allelic diversity was observed with loci GMmp0266, and CMmp0131 (H.u.b of 0.469 and
329 0.427), followed by CMmp0985 (RS3L20), the most polymorphic locus in MLVA-13 scheme
330 study [20] (H.u.b = 0.393) and GMch0133 (H.u.b = 0.344). Intermediate diversities were
331 observed with loci GMch0754 and Ymp0875 (respectively H.u.b = 0.131 and 0.112). The
332 weakest allelic diversities were observed with loci GMch3461 and CMmp0233 (H.u.b of
333 0.045 and 0.044 respectively) (Additional file 3). According to the PCA realized on the global
334 field collection of strains (543 strains) (Additional file 4), loci GMch0754, GMch3461,
335 GMch0133 and less distinctly loci CMmp0985 (RS3L20) and CMmp0131 contributed the
336 most to the construction of the first axis (42.6% of the total inertia). Loci Ymp0875 and
337 secondarily GMmp0266 and CMmp0233 contributed to the construction of the second axis
338 (19 % of the total inertia). GMch0131 and CMmp0985 (RS3L20) were two loci contributing
339 equally to the formation of the 2 axis. Correlation circle indicated that loci GMch0754,
340 GMch3461, CMmp0131 and CMmp0985 (RS3L20) were the most explanatory variables
341 (Additional file 4).

342
343 *Locus specificity of MLVA-8 scheme*

344 When the MLVA-8 scheme was applied to other species of the genus *Ralstonia* (type strains
345 of *R. mannitolylitica*, *R. insidiosa* and *R. pickettii*), no amplification was observed, indicating
346 that these eight loci were clearly specific of the *R. solanacearum* species complex (RSSC)
347 (Table 4). When applied to worldwide strains, all eight loci were amplified in all phylotype I
348 strains. GMch3461 was specific to phylotype I since no amplification was observed for strains
349 belonging to the other phylotypes. Seven loci (apart of GMmp3461) were amplified with the
350 phylotype III strains, with an amplification rate reaching 66.66% (CMmp0131, CMmp0233
351 and Ymp0875), 83.3% (GMmp0266 and GMch0754) and 100% (CMmp0985 and GMch0133
352 loci). The GMch0133 locus amplified 87.5% of phylotype II strains and 75% of the phylotype
353 IV strains whereas CMmp0233 amplified 25% of phylotype II strains (Table 4). From these
354 results, we considered that our new MLVA typing scheme is specific to *R. solanacearum* and
355 obviously specific to phylotype I.

357 *Comparison of discriminatory power between MLVA-13 and MLVA-8*

358 To compare the discriminatory power between the MLVA-13 and the newly developed
359 MLVA-8 scheme at the local (fieldwide), regional (countrywide) and global (worldwide)
360 scales, a subset of strains (n=356) was selected, consisting of the “Vallon 2012” collection
361 (n=319) and the worldwide phylotype I collection (n=37), among which a subset consisted of
362 representative strains from Ivory Coast (n=18) (Table 3).

363 All loci of the MLVA-8 scheme were polymorphic over the 580 phylotype I strains analyzed,
364 with a high allelic diversity ranging from two to ten alleles per locus in field collections
365 (“Vallon” and “Pirogue 2007”) (Table 3 and additional file 3). Allele numbers per locus were
366 from one to two within “Pirogue 2007” collection, one to three for “Vallon 1999” and “Vallon
367 2009” collections, and two to ten for “Vallon 2009” collections (Additional file 3).

368 Genetic diversity observed with the new MLVA-8 scheme was twenty five times higher
1
2 369 (H.u.b = 0.333) than with the former MLVA-13 scheme (H.u.b = 0.013). The ratio between
3
4 370 the number of haplotypes and the number of strains (G/N) followed the same trend, much
5
6
7 371 higher with MLVA-8 than with MLVA-13 (0.135 vs. 0.07) (Table 3). Considering the country
8
9 372 scale (Ivory Coast strains from [51] ; n=18), similar trend was observed, with MLVA-8
10
11 373 revealing a higher diversity than MLVA-13 (respective H.u.b of 0.597 and 0.307), as well as a
12
13 374 higher G/N (0.94 vs. 0.83). Considering the worldwide collection (n=37), unbiased diversity
14
15 375 index was higher for the MLVA-8 scheme (H.u.b = 0.666) than for the MLVA-13 scheme
16
17 376 (H.u.b = 0.374), as was G/N ratio (0.90 vs. 0.88) (Table 3).
18
19
20
21

377

378 *Discriminatory power of MLVA-8 compared to egl and mutS based sequence typing*

379 We compared MLVA-8 discriminatory power with *egl*-based and *mutS*-based sequence
26
27 379 We compared MLVA-8 discriminatory power with *egl*-based and *mutS*-based sequence
28
29 380 typing on a common strain set (n=46). Sequence-typing polymorphism was extremely low;
30
31 381 two *egl* Sequence-Types (eST) were identified: eST60, specific to “Pirogue 2007”
32
33 382 (Martinique) collection, and eST43, common to all four “Vallon” collections. One single *mutS*
34
35 383 ST (mST22) was found, common to all collections (Additional file 5). It is important to note
36
37 384 that within the same eST, three to eight MLVA haplotypes were found, depending on the field
38
39 385 collection (Additional file 5). We also compared discriminatory power between the MLVA-8
40
41 386 scheme and the MLVA-13 scheme on the worldwide collection of strains (n=27, Additional
42
43 387 file 6). MLVA-8 was slightly more discriminative than MLVA-13, and both were more
44
45 388 discriminative than *egl* and *mutS* sequence typing (with respective HGDI of 1, 0.99, 0.909,
46
47 389 0.769, Additional file 6A). At the field scale (Additional file 6B, n=46), MLVA-8 was much
48
49 390 more discriminative than *egl* and *mutS* sequence typing (0.844 versus 0.332 and 0,
50
51 391 respectively).
52
53
54
55
56
57

392

58
59
60
61
62
63
64
65

393 *Ability of MLVA-8 scheme for temporal analysis*

1
2 394 Within the *R. solanacearum* phylotype I collection (n=580), a total of 89 haplotypes were
3
4
5 395 identified, distributed within five collections of strains (Additional file 7). Genetic diversity
6
7 396 was variable across the different strain collections (Table 5). Genetic diversity was the highest
8
9 397 in “Vallon 2012” (H.u.b = 0.333, the highest haplotype diversity), then in “Vallon 2009”
10
11 398 (H.u.b = 0.182), then “Vallon 1999” (H.u.b = 0.097) and in “Pirogue 2007” (Martinique)
12
13 399 (H.u.b = 0.091). It is however striking to note that G/N ratios were similar in “Vallon 2012”
14
15 400 and “Pirogue 2007” (Martinique) (0.135 and 0.132, respectively), despite the huge difference
16
17 401 in sampling effort.
18
19
20

21 402 We also observed a location and date-specificity of the MLVA-8 haplotypes. All five
22
23 403 haplotypes detected in “Pirogue 2007” (Martinique) collection were specific to this collection
24
25 404 (Additional file 7), and constituted a single clonal complex (Figure 1A). Haplotypes from
26
27 405 “Vallon” collections were neither found within the worldwide collection (except H018, Figure
28
29 406 1C and additional file 7) nor within the “Pirogue 2007” (Martinique) collection, and were thus
30
31 407 very specific of this location. The two haplotypes (H008 and H009) were shared by all
32
33 408 “Vallon” collections (Figure 1C and additional file 7), but we were able to identify some
34
35 409 “date-specific” haplotypes within “Vallon”. Among the eight haplotypes identified for the
36
37 410 collection “Vallon 1999”, four (H006, H007, H012, H013) were “Vallon 1999”-specific.
38
39 411 Within the collection “Vallon 2009”, three (H015, H016, H017) were specific over the seven
40
41 412 haplotypes detected. Considering the collection “Vallon 2012”, 38 haplotypes were specific
42
43 413 over the 43 haplotypes detected. The haplotype H010 was common to “Vallon 1999” and
44
45 414 “Vallon 2012” collection, whereas the haplotype H011 was common to collections “Vallon
46
47 415 1999” and “Vallon 2009”. Another haplotype, H014, was common to “Vallon 2009”
48
49 416 collection and “Vallon 2012” collection.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

418 *Congruence between MLVA-13 and MLVA-8 schemes on a worldwide collection of strains*

1
2 419 DAPC analyses were first performed on a subset of the worldwide collection of strains
3
4
5 420 genotyped with both MLVA-13 and MLVA-8 (n=34). DAPC clusters were named after the
6
7 421 MLVA data we used to detect these clusters: “DAPC13.” for data from MLVA-13 typing
8
9 422 scheme followed by the number of the cluster (cl01 to cl14). The same notation was used for
10
11 423 MLVA-8 scheme (“DAPC8.”). Results obtained from both datasets were similar to each
12
13
14 424 other. In both cases, DAPC identified 14 clusters (Figure 2A and 2B). Eleven DAPC clusters
15
16 425 from MLVA-13 genotypes perfectly matched each with one unique cluster from MLVA-8
17
18 426 (Table 6), whereas DAPC 8.10 was splitted between “DAPC13.04” and “DAPC13.10”; and
19
20
21 427 “DAPC13.11” was splitted in “DAPC8.06” and “DAPC8.08”. Strains RUN0119 (Cameroon),
22
23 428 RUN0337 (China), and RUN1878 (Ivory Coast) were thus differently ranked by MLVA-13
24
25
26 429 and MLVA-8. Considering the correspondence between DAPC clusters and Clonal
27
28
29 430 Complexes (CC) previously defined [20], we found that each DAPC13 cluster corresponded
30
31 431 to a single CC except CC11 that was splitted into “DAPC13.01” and “DAPC13.08” (Figure
32
33
34 432 3). In MLVA-8 dataset CC02 was splitted into three clusters and CC10 in two clusters.
35
36 433 Cluster “DAPC8.01” gathered CC02 and CC10 strains, and “DAPC8.07” gathered CC02 and
37
38
39 434 CC03 strains. In both DAPC analyses, all strains were assigned to a single cluster (Additional
40
41 435 file 8). DAPC clusters were correlated with geographical origins in both datasets (Additional
42
43
44 436 file 9). In both datasets one cluster gathered Ivorian, Kenyan and South-African strains
45
46 437 (“DAPC13.07”, “DAPC8.02”), another cluster gathering Guatemalan and Ivorian strains
47
48
49 438 (“DAPC13.06”, “DAPC8.13”) and a last one gathering Nigerian and Ivorian strains
50
51 439 (“DAPC13.11”, “DAPC8.06”) (Figure 3). There were however slight differences: Cameroon
52
53 440 strains were distributed within three “DAPC13” clusters, but within only two “DAPC8”
54
55
56 441 clusters; Ivorian strains were distributed within seven “DAPC13” clusters, whereas in eight
57
58 442 “DAPC8” clusters.
59
60
61
62
63
64
65

443 We evaluated the congruence between MLVA-13 and MLVA-8 schemes. On the subset
1
2 444 worldwide collection (n=34), distance matrices (Euclidean and Manhattan distance) were
3
4 445 highly correlated, with respective Mantel correlation coefficients of 0.666 and 0.640 (*P*-value
5
6
7 446 = 0.001 for both Euclidean and Manhattan matrices) meaning that MLVA-13 and MLVA-8
8
9 447 data were significantly congruent.

11 448 When DAPC analysis was performed with strains from “Vallon 2012” (n=319), “Pirogue
12
13 449 2007” (n=38) and worldwide collections (n=37) together, 14 clusters were inferred (Figure 4
14
15
16
17 450 and Additional file 10). Martinique strains were clustered to one single specific cluster (cl12),
18
19 451 whereas Reunion strains were distributed within 9 clusters, among which five were specific to
20
21 452 Reunion (cl01, 05, 07, 11, 14), and three were shared with Ivory Coast (cl06, 09, 13)
22
23
24 453 (Additional file 10). Chinese and Taiwanese strains were clustered in cl03, a group specific to
25
26 454 Asia. Collectively, these results indicate that MLVA-8 gave clustering similar to those
27
28
29 455 obtained with MLVA-13 at the global scale, and give geographically-relevant clustering.

30
31 456
32
33
34 457 *MLVA-8 allows monitoring the temporal evolution and genetic structure of a field population*
35 458 *(“Vallon” collections).*

37 459 DAPC inferred 6 clusters within the collections “Vallon 1999”, “Vallon 2009”, “Vallon
38
39
40 460 2012”, two of which (cl03 and cl04, Figure 5) were present in all three collections and three
41
42 461 clusters (cl01, cl02, cl06) were specific to the 2012 sampling (Figure 5). DAPC strongly
43
44
45 462 differentiated the “universal” clusters from two of the “Vallon 2012”-specific clusters (cl01
46
47 463 and cl06) and from the cluster 05, composed of “Vallon 2009” and “Vallon 2012” strains.
48
49
50 464 Interestingly, the cluster 05 was first detected within the “Vallon 2009” collection, and then
51
52 465 increased in size within the collection 2012. Since “Vallon 1999” and “Vallon 2009”
53
54 466 collections were sampled from plant stem only, we hypothesized that the “Vallon 2012”-
55
56
57 467 specific clusters could have been isolated from specific habitats (rhizosphere, soil). However,
58
59 468 there was no correlation between DAPC clusters and habitat of isolation (Table value results
60
61
62
63
64
65

469 not shown). Haplotype networks generated by PHYLOViZ confirmed this structure. Most of
470 the haplotypes specific to Vallon populations are grouped in two clonal complexes (Figure 1).
471 The first clonal complex gathered 18 haplotypes (Figure 1B) mostly specific of “Vallon 2012”
472 collection and two present in “Vallon 2009” collection. The second clonal complex gathered
473 25 haplotypes (Figure 1C), among which some were found in “Vallon 1999”, “Vallon 2009”,
474 and “Vallon 2012”.

475
476 *Reproductive mode within the field collections as estimated by multilocus linkage*
477 *disequilibrium*

478 The “Pirogue 2007” (Martinique) collection although collected within a very small amount of
479 soil, displayed highly significant linkage disequilibrium, suggesting a clonal reproductive
480 mode (Table 7). For the Reunion “Vallon” collections results were contrasted: “Vallon 1999”
481 appeared to be nearly recombining, while “Vallon 2009” and “Vallon 2012” appeared highly
482 clonal. Considering the DAPC clusters as populations, it was striking to note that cluster 4
483 (mainly present in “Vallon 1999” and “Vallon 2012”) is in linkage equilibrium, thus likely
484 recombining, and that cluster 2, only present in “Vallon 2012”, is poorly clonal, while all the
485 other clusters showed clonal structure.

486
487 *Estimation of the TR loci mutation model*

488 To estimate the mutation model followed by our molecular markers, we examined loci
489 variation along the haplotype network of the minimum spanning tree, specifically looking at
490 the TR number variation across SLV (Figure 1A). Three loci (GMch0133, GMch3461,
491 CMmp0985 (RS3L20)) clearly followed the Stepwise Mutation Model (more than 80% of -
492 1/+1 TR variation), while CMmp0131 gave a majority (55.6%) of single TR variants (STRV)
493 but also 44.44% two-TR variants. Two other loci gave a majority of STRV but at much lower

1
2 494 rates. GMch0754 indeed gave 40% STRV, but also two-, five-, and six-TR variants at rates of
3 495 20%, 20%, 20% specifically. GMmp0266 gave 26.09% STRV, but also double (8.70%),
4 496 quadruple and quintuple (13.04% for both), seven- to 15-TR variants (respective rates at 4.35,
5 497 8.70, 4.35, 17.39, 4.35%). The locus CMmp0233 gave only three- and four-TR variants (50%
6
7 498 rate for both); while the locus Ymp0875 gave a majority of four-TR variants (63.64%), then
8
9 499 three-, single-, eight-TR variants (respective rates 18.18, 9.09, 9.09%).
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

500

501

502 3) Discussion

1
2 503 The first MLVA scheme (MLVA-13) [20] developed for *R. solanacearum* phylotype I
3
4 504 strains was successful to analyze the contribution of Ivory Coast strains in the worldwide
5
6
7 505 genetic diversity of this bacterium. Authors studied the genetic structuration of these strains in
8
9
10 506 different geographic region of Ivory Coast and they inferred possible dissemination routes
11
12 507 [51]. The second MLVA scheme (MLVA-5) developed, specific to *R. solanacearum*
13
14 508 phylotype IIB-1 strains, aimed to investigate the origin of Thames contamination by bacterial
15
16 509 wilt and to provide additional epidemiological information on the pathogen's dissemination
17
18
19 510 [17]. The authors found that the Thames was contaminated by infected field up-river, showing
20
21
22 511 the importance of MLVA analysis in source tracing [17]. Both studies, improved the
23
24 512 understanding of *R. solanacearum* epidemiology, its spread, its structuration at different
25
26 513 scales and its colonization pattern. But yet, these two MLVA schemes only focused on large
27
28
29 514 scales and did not pay particular interest in microevolution acting at the field scale. Until now,
30
31
32 515 fine scale studies of *R. solanacearum* genetic diversity were only achieved with RAPD
33
34 516 markers [49], REP-PCR [50] [80] and AFLP [52] [81] [82] but these tools have a limited inter
35
36 517 laboratory reproducibility. Therefore, particular interest is rising in the use of VNTR markers
37
38
39 518 because of their discriminatory power, their robustness, their repeatability and their inter
40
41 519 laboratory portability. VNTR loci has already proved their effectiveness to differentiate local
42
43 520 populations of *Xanthomonas citri* pv. *citri* from different citrus orchards in Vietnam [21, 22],
44
45
46 521 Mali and Burkina Faso [83] and on local population of *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv.
47
48 522 *oryzicola* [26].
49

50
51 523 In this study we developed a new MLVA scheme discriminant enough to differentiate
52
53 524 genetically closely related strains of *R. solanacearum* phylotype I from a unique field and
54
55
56 525 assessed its usefulness for future epidemiological investigation. Indeed, we found that the
57
58 526 phylotype I-specific MLVA-13 scheme previously developed [20] was not powerful enough
59
60
61
62
63
64
65

527 to discriminate clonal lineages within a field population of *R. solanacearum*: only CMmp0985
1
2 528 (RS3L20) locus was polymorphic allowing to identify only three haplotypes. Our first
3
4
5 529 objective was therefore to identify new VNTRs loci, unambiguously specific of the *Ralstonia*
6
7 530 *solanacearum* Species Complex (RSSC), and suitable for fine tuning phylotype I population
8
9
10 531 evolution. By optimizing our search criteria to target fast evolving loci in sequenced genome
11
12 532 of *R. solanacearum*, we successfully selected 24 loci among which 8 were polymorphic,
13
14 533 constituting our new MLVA scheme. These 8 loci were from 6 to 9 nucleotides long and
15
16
17 534 repeated 7 to 22 times in the genomes of origin. These characteristics meet the rules
18
19 535 previously cited in material and method part. However, contrary to [20] we neither could
20
21
22 536 detect a clear correlation between the pattern size of the VNTRs loci and their observed
23
24 537 number of alleles nor between the number of repeats of a VNTR locus in its genome of origin
25
26
27 538 and its polymorphism level. We also tested the specificity of our VNTR markers and no loci
28
29 539 amplification was observed for other species of the *Ralstonia* genus (*R. insidiosa*, *R. pickettii*
30
31 540 and *R. mannitolylitica*) indicating that our VNTRs only target loci specifically present in *R.*
32
33
34 541 *solanacearum* genomes. Besides, our VNTR loci were even associated to specific phlotypes
35
36 542 within the RSSC confirming earlier studies [17, 20]. All of them were amplified within all
37
38
39 543 phylotype I strains, and to a lesser extent within phylotype III strains, while poorly amplified
40
41 544 within phylotype II and phylotype IV. These findings tend to support the proposed concept of
42
43
44 545 three genomic species within the RSSC (first species gathering phylotype I and III, a second
45
46 546 species gathering phylotype IIA and IIB, and the third genomic species grouping phylotype
47
48
49 547 IV strains) [42, 84-86].

50
51 548 The second goal of this study was to assess the discriminatory power of the newly
52
53 549 developed MLVA scheme on collections sampled from the same location at different dates
54
55
56 550 and sampled from different fields at very small scales (either from a single soil bulk or from
57
58 551 different plants localizations). At the field scale (“Vallon” and “Pirogue 2007” collections),
59
60
61
62
63
64
65

552 there is an obvious gain in discriminatory power with the MLVA-8 scheme compared to the
1
2 553 *egl* and *mutS*-based genotyping technique [20], and most notably compared to the former
3
4 554 MLVA-13 scheme. The MLVA-8 scheme is also discriminant enough to reveal genetic
5
6
7 555 diversity on collections of strains from diverse geographical origin and from different
8
9 556 temporal sampling of a same field (“Vallon” collections). Genetic diversity could be revealed
10
11 557 at a scale as low as a single soil sample (20 grams), collected in a banana fallow in
12
13 558 Martinique. According to our data, the higher polymorphism of MLVA-8 may be explained
14
15 559 by other factors than pattern size, repeat number, or locus localization (intragenic vs.
16
17 560 intergenic). Indeed, MLVA-8 is composed of 6 to 9 nucleotide patterns, but 9 of the 13 loci of
18
19 561 MLVA-13 were also 6 and 9 nucleotides long [20]. Moreover, all MLVA-8 loci, except the
20
21 562 locus CMmp0131, are intragenic.
22
23
24
25

26 563 The third goal of this study was to evaluate the suitability of our markers in assessing
27
28 564 population genetic and evolutionary studies. We demonstrated that clustering inferred with
29
30 565 the MLVA-8 on a worldwide collection was globally congruent with clustering inferred from
31
32 566 the initial N’Guessan scheme (MLVA-13) [20]. MLVA-8 loci also highlighted the specificity
33
34 567 of African phylotype I populations towards Asian ones, and the differentiation of the
35
36 568 Martinique haplotypes not found in our “Vallon” collections. We did not identify common
37
38 569 allelic profiles between field collections and worldwide collection (with one exception),
39
40 570 unlike Parkinson’s study where authors detected common allelic profiles between English and
41
42 571 Sweden strains [17] concluding that strains derived independently by mutation from strains
43
44 572 with different profiles and origin. Our results also highlighted the close relatedness between
45
46 573 some Reunion strains and Ivorian strains (e.g. the haplotype H018 gathered the Ivorian
47
48 574 RUN1539 and the Reunion TM29.01 strain (collection “Vallon 2012”), which confirmed the
49
50 575 phylogenetic relatedness established by by multilocus sequence analysis (N’Guessan and
51
52 576 Wicker, unpublished data 2012). Since this haplotype belongs to the Clonal Complex 6
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

577 (CC06) composed of highly virulent strains in Africa [51], it will be important to investigate
578 the virulence of homologous Reunion strains. Finally, we demonstrated that these markers
579 could be used to decipher evolution of field populations over time, even with different
580 sampling efforts. We were thus able to distinguish within “Le Vallon” field some
581 recombining populations from more clonal populations. Such evolution patterns need now to
582 be further investigated on collections generated by similar sampling efforts, and with
583 complementary approaches including spatial genetics.

584 MLVA approach has been widely used to describe the genetic diversity and structure of
585 human and animal pathogen bacteria [7-14], and is increasingly popular on plant pathogen
586 bacteria, as exemplified by the cases published on *Xylella fastidiosa* [87], *Xanthomonas citri*
587 *pv. citri* (*Xcc*) [21], *X. axonopodis pv. manihotis* [19], *E. amylovora* [25], *X. arboricola* [88],
588 *X. oryzae pv. oryzae* [26, 89] and *R. solanacearum* [17, 20]. Genetic diversity of our field
589 collections ($0.091 < \text{H.u.b} < 0.333$) remain low compared to other studies on plant pathogenic
590 bacteria such as *E. amylovora* ($\text{H.u.b} = 0.50$) [25], *X. citri pv. citri* ($\text{H.u.b} = 0.77$) [24, 28] or
591 *R. solanacearum* ($\text{H.u.b} = 0.595$) [20]. However, these studies analyzed the genetic diversity
592 in areas that were larger than ours, respectively continent, country and regional scale.
593 Recently, a study revealed similar level of genetic diversity in a collection of regional *Xcc*
594 strains in Iran ($\text{H.u.b} = 0.35$) [90]. Another explanation of the low genetic diversity detected
595 might be that *R. solanacearum* is capable of surviving in plant and in soil at the viable but not
596 cultivable (VBNC) state [91] meaning that therefore haplotypes identified might not reflect
597 the total variability in the field and that we only detected haplotypes specifically able to grow
598 on agar medium.

599 Mutation model of our markers can also be an issue to address. On the considered
600 collections, we cannot firmly conclude that all MLVA-8 loci follow strictly the Stepwise
601 Mutation Model (SMM), which will have implications in future population genetics analyses.

602 It is widely known that mutation dynamics of VNTR is different depending on the loci and on
603 the species studied [92, 93] and might explain why only few VNTR seemed to follow the
604 SMM model. Whether MLVA loci evolve following a SMM model or another one (Infinite
605 Allele Model (IAM) [94], Two Phase Model (TPM) [95], Generalized Stepwise Mutation
606 model (GSM) or K-Allele Model (KAM) [96]) will be further investigated before deep
607 evolutionary and population genetic studies. The IAM model has already been shown to be
608 effective in human pathogenic bacterium such as *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria*
609 *meningitidis*, and *Staphylococcus aureus* [97]. Yet, the SMM model is the predominant
610 mutational model for some plant-pathogenic bacteria [25, 28, 90], but data remain scarce on
611 the actual mutation model at play, and the possible variations around this model in
612 Proteobacteria. Indeed, the SMM model is frequently used as default model because most of
613 population genetic software do not propose the GSM model. Nevertheless, several studies
614 showed that GSM model is the most appropriate mutational model for microsatellite [92, 93].

615

4) Conclusion

617 This study provides an adapted tool to characterize genetic diversity of *R. solanacearum*
618 phylotype I and our markers are discriminant enough to differentiate genetically closely
619 related strains from a single field. This high resolution typing technique is essential to
620 determine genetic structure of pathogens within a single country or in a single field that
621 traditional typing methods failed to distinguish. Until now, genetic structure of *R.*
622 *solanacearum* has already been analyzed at the regional and country scales but not at the field
623 scale. This approach makes a start in understanding adaptation mechanism under selective
624 pressure and population structuration at the field scale (i.e. impact of resistant or susceptible
625 plant accession, and of crop successions on the spatial genetic structure of soilborne bacterial
626 plant pathogens). Such tools will allow unraveling the bacterial population dynamics at the

627 plant and field scales, and may help understand plant resistance bypass processes. These
1
2 628 approaches pave the way to optimization of resistant/susceptible varietal mixtures, for
3
4
5 629 example.

6
7 630

8 9 10 631 **5) Competing interests**

11
12 632 The authors declare that they have no competing interests.

13
14
15 633

16 17 634 **6) Authors contribution**

18
19 635 JG performed most of the experiments, analyzed data, and wrote the paper; AL carried out
20
21 636 part of the experiments and analyzed data; FG revised the manuscript critically, SP
22
23 637 significantly helped in writing the paper; EW designed the experiment, analyzed data, wrote
24
25
26 638 the paper and supervised the study. All authors read and approved the final manuscript.

27
28
29 639

30 31 640 **7) Acknowledgements**

32
33
34 641 We thank S. Lebon, J. M. Baptiste, and E. Lallemand for their technical assistance both in the
35
36 642 field and laboratory, and O. Pruvost and C. Vernière for enriching discussions. This research
37
38
39 643 was financially supported by the European Union (FEDER project) and the Conseil Régional
40
41 644 de la Réunion, and by the French Ministry of Agriculture (Project CASDAR C-2013-09
42
43 645 “RESAUBER”).

44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

646

8) References

1. Grünwald NJ, Goss EM: Evolution and population genetics of exotic and re-emerging pathogens: novel tools and approaches. *Annual Review of Phytopathology* 2011, 49:249-267.
2. Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H: Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 2001, 39:187-224.
3. Mc Donald BA, Linde C: Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 2002, 40:349-379.
4. van Belkum A: The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Current opinion in microbiology* 1999, 2(3):306-311.
5. Vergnaud G, Pourcel C: Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis. In: *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Springer; 2006: 83-104.
6. Roumagnac P, Gagnevin L, Pruvost O, Achtman M: Insights into structure and evolution of bacterial species that are revealed by molecular methods. In: *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. Edited by Tibayrenc M: John Wiley and Sons; 2007: 475-494.
7. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM: Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infection, Genetics and Evolution* 2004, 4(3):205-213.
8. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L, Prieur A, Denoeud F, Ramisse V, Sylvestre P, Benson G, Ramisse F, Vergnaud G: A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC microbiology* 2001, 1(1):2.
9. Li Y, Cui Y, Hauck Y, Platonov ME, Dai E, Song Y, Guo Z, Pourcel C, Dentovskaya SV, Anisimov AP: Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. *PloS one* 2009, 4(6):e6000.
10. Jiang Y, Liu HC, Zheng HJ, Tang B, Dou XF, Zhao XQ, Zhu YQ, Lu B, Wang SY, Dong HY: Evaluation of Four Candidate VNTR Loci for Genotyping 225 Chinese Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains. *Biomedical and Environmental Sciences* 2012, 25(1):82-90.
11. Le Flèche P, Fabre M, Denoeud F, Koeck J-L, Vergnaud G: High resolution, on-line identification of strains from the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on tandem repeat typing. *BMC microbiology* 2002, 2(1):37.
12. U'Ren JM, Hornstra H, Pearson T, Schupp JM, Leadem B, Georgia S, Sermswan RW, Keim P: Fine-scale genetic diversity among *Burkholderia pseudomallei* soil isolates in northeast Thailand. *Applied and environmental microbiology* 2007, 73(20):6678-6681.
13. U'Ren JM, Schupp JM, Pearson T, Hornstra H, Friedman CL, Smith KL, Daugherty RR, Rhoton SD, Leadem B, Georgia S: Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC microbiology* 2007, 7(1):23.
14. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg RH, Vergnaud G: Improved multiple-locus variable-number tandem-repeat assay for *Staphylococcus aureus* genotyping, providing a highly informative technique together with strong phylogenetic value. *Journal of clinical microbiology* 2009, 47(10):3121-3128.
15. Lindstedt BA: Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005, 26(13):2567-2582.
16. Van Belkum A: Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007, 49(1):22-27.

- 696 17. Parkinson N, Bryant R, Bew J, Conyers C, Stones R, Alcock M, Elphinstone J: Application of
1 697 Variable-Number Tandem-Repeat Typing To Discriminate *Ralstonia solanacearum* Strains
2 698 Associated with English Watercourses and Disease Outbreaks. *Applied and environmental*
3 699 *microbiology* 2013, 79(19):6016-6022.
- 4 700 18. Gironde S, Manceau C: Housekeeping gene sequencing and MLVA analysis identified sub-
5 701 populations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv.
6 702 tomato that correlate with host specificity. *Applied and Environmental Microbiology*
7 703 2012:AEM. 06655-06611.
- 8 704 19. Arrieta-Ortiz ML, Rodríguez-R LM, Pérez-Quintero ÁL, Poulin L, Díaz AC, Rojas NA, Trujillo C,
9 705 Benavides MR, Bart R, Boch J: Genomic Survey of Pathogenicity Determinants and VNTR
10 706 Markers in the Cassava Bacterial Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Manihotis* Strain
11 707 CIO151. *PLoS one* 2013, 8(11):e79704.
- 12 708 20. N'Guessan CA, Brisse S, Poussier S, Koné D, Wicker E: Development of variable number of
13 709 tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt,
14 710 banana Moko disease and potato brown rot. *Journal of Microbiological Methods* 2013,
15 711 92(3):366-374.
- 16 712 21. Ngoc L, Verniere C, Vital K, Guerin F, Gagnevin L, Brisse S, AH-YOU N, Pruvost O:
17 713 Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas*
18 714 *citri* pv. *citri*. *Molecular ecology resources* 2009, 9(1):125-127.
- 19 715 22. Ngoc LBT, Vernière C, Jarne P, Brisse S, Guérin F, Boutry S, Gagnevin L, Pruvost O: From
20 716 local surveys to global surveillance: three high-throughput genotyping methods for
21 717 epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Applied and*
22 718 *environmental microbiology* 2009, 75(4):1173-1184.
- 23 719 23. Leduc A., Traoré Y. N., Boyer K., Magne M., Grygiel P., C. J, Boyer C., Guerin F., Wonni I.,
24 720 Ouedraogo L. *et al*: Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium:
25 721 *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso.
26 722 *Environmental Microbiology* 2015(in press.).
- 27 723 24. Bui Thi Ngoc L: Apport de la génétique évolutive dans la taxonomie et l'épidémiologie de
28 724 *Xanthomonas citri* pv. *citri* bactérie responsable du chancre asiatique des agrumes.
29 725 Université de la Réunion; 2010.
- 30 726 25. Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits TH, Ravnkar M, Frey JE, Duffy B:
31 727 Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen
32 728 *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental microbiology* 2013.
- 33 729 26. Poulin L, Grygiel P, Magne M, Gagnevin L, Rodriguez-R L, Serna NF, Zhao S, El Rafii M, Dao
34 730 S, Tekete C: New Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Tool for
35 731 Surveillance and Local Epidemiology of Bacterial Leaf Blight and Bacterial Leaf Streak of
36 732 Rice Caused by *Xanthomonas oryzae*. *Applied and environmental microbiology* 2015,
37 733 81(2):688-698.
- 38 734 27. Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, Parlange J, Carpezat J,
39 735 Balesdent M-H: Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary
40 736 potential of a fungal phytopathogen. *PLOS Pathogen* 2012, 8(11):e1003020.
- 41 737 28. Vernière C, Bui Thi Ngoc L, Jarne P, Ravigné V, Guérin F, Gagnevin L, Le Mai N, Chau NM,
42 738 Pruvost O: Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of
43 739 the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. *Environmental*
44 740 *microbiology* 2014.
- 45 741 29. Dunn AR, Bruening SR, Grünwald NJ, Smart CD: Evolution of an experimental population of
46 742 *Phytophthora capsici* in the field. *Phytopathology* 2014, 104(10):1107-1117.
- 47 743 30. Elphinstone JG: The current bacterial wilt situation: a global overview. In: *Bacterial wilt*
48 744 *disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Edited by Allen C, Prior P,
49 745 Hayward AC. Saint Paul, MN, USA: APS Press; 2005: 9-28.
- 50 746 31. Hayward AC: Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas*
51 747 *solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 1991, 29:65-87.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 748 32. Vinatzer BA, Bull CT: The impact of genomic approaches on our understanding of diversity
1 749 and taxonomy of plant pathogenic bacteria. In: *Plant pathogenic bacteria: genomics and*
2 750 *molecular biology*. Edited by Jackson RW: Horizon Scientific Press; 2009: 37-62.
- 3 751 33. Allen C, Prior P, Hayward AC: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species
4 752 complex; 2005; APS Press.
- 5 753 34. Gillings MR, Fahy P: Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas*
6 754 *solanacearum* species complex. In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent,*
7 755 *Pseudomonas solanacearum*. Edited by Hayward AC, Hartman GL. Wallingford, United
8 756 Kingdom: CAB International; 1994: 95-112.
- 9 757 35. Wicker E, Lefeuvre P, Cambiaire Jc, Lemaire C, Poussier S, Prior P: Contrasting
10 758 recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia*
11 759 *solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal* 2012, 6(5):961-974.
- 12 760 36. Coupat B, Chaumeille-Dole F, Fall S, Prior P, Simonet P, Nesme X, Bertolla F: Natural
13 761 transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA
14 762 that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology* 2008, 66(1):14-24.
- 15 763 37. Hayward AC: The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: *Bacterial wilt -The disease and*
16 764 *its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Edited by Hayward ACH, G.L. Wallingford:
17 765 CAB International; 1994: 9-24.
- 18 766 38. Wicker E, Grassart L, Mian D, Coranson Beaudu R, Dufeal D, Guilbaud C, Prior P: *Cucumis*
19 767 *melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia*
20 768 *solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bacterial Wilt Newsletter* 2002, 17:20-
21 769 21.
- 22 770 39. Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, Prior P:
23 771 Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to
24 772 diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 2011,
25 773 101(1):154-165.
- 26 774 40. N'Guessan AC, Abo K, Fondio L, Chiroleu F, Lebeau A, Poussier S, Wicker E, Koné D: So near
27 775 and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d'Ivoire
28 776 in Africa. *Phytopathology* 2012, First Look.
- 29 777 41. Mc Donald BA, Linde C: The population genetics of plant pathogens and breeding strategies
30 778 for durable resistance. *Euphytica* 2002, 124:163-180.
- 31 779 42. Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost
32 780 O, Elbaz M, Calteau A *et al*: Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia*
33 781 *solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*
34 782 2010, 11(379):1-16.
- 35 783 43. Remenant B, de Cambiaire JC, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S, Barbe V, Lajus A, Vallenet
36 784 D, Medigue C, Fegan M *et al*: The genomes of the insect-transmitted plant pathogens
37 785 *Ralstonia syzygii* and Blood Disease Bacterium reveal a recent evolutionary origin within
38 786 the *R. solanacearum* species. *PLoS One* 2011, 6(9):e24356.
- 39 787 44. Remenant B, Babujee L, Lajus A, Medigue C, Prior P, Allen C: Sequencing of K60, Type Strain
40 788 of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 2012,
41 789 194(10):2742-2743.
- 42 790 45. Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P,
43 791 Camus JC, Cattolico L *et al*: Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia*
44 792 *solanacearum*. *Nature (London)* 2002, 415(6871):497-502.
- 45 793 46. Guidot A, Elbaz M, Carrère S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C: Specific Genes from
46 794 the Potato Brown Rot Strains of *Ralstonia solanacearum* and Their Potential Use for Strain
47 795 Detection. *Phytopathology* 2009, 99(9):1105-1112.
- 48 796 47. Gabriel DW, Allen C, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores CZ, Huang Q,
49 797 Clifford JM, Presting G *et al*: Identification of open reading frames unique to a select agent:
50 798 *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Molecular Plant Microbe Interactions* 2006,
51 799 19(1):69-79.
- 52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 800 48. Li Z, Wu S, Bai X, Liu Y, Lu J, Liu Y, Xiao B, Lu X, Fan L: Genome sequence of the tobacco
1 801 bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of bacteriology* 2011,
2 802 193(21):6088-6089.
- 3 803 49. Grover A, Azmi W, Gadewar AV, Pattanayak D, Naik PS, Shekhawat GS, Chakrabarti SK:
4 804 Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by
5 805 random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Applied Microbiology* 2006,
6 806 101(4):798-806.
- 7 807 50. Ramsubhag A, Lawrence D, Fraser R, Umaharan P, Prior P, Wicker E: Wide genetic diversity
8 808 of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant*
9 809 *Pathology* 2012, Early View.
- 10 810 51. N'Guessan CA: Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia*
11 811 *solanacearum*, agent du flétrissement bactérien en Cote d'Ivoire. *PhD Thesis*. Université de
12 812 Cocody-Abidjan; 2012.
- 13 813 52. Poussier S: Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du
14 814 flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs
15 815 d'inoculum. *PhD thesis*. Rennes: Rennes I; 2000.
- 16 816 53. Van Elsas JD, Smalla K: Methods for sampling soil microbes. In: *Manual of environmental*
17 817 *microbiology*. Edited by Hurst CJ, Knudsen GR, Mc Inerney MJ, Stetzenbach CH, Walter MV.
18 818 Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press; 1997: 383-390.
- 19 819 54. Imazaki I, Nakaho K: Pyruvate-amended modified SMSA medium: improved sensitivity for
20 820 detection of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of general plant pathology* 2010, 76(1):52-61.
- 21 821 55. Poussier S, Cheron JJ, Couteau A, Luisetti J: Evaluation of procedures for reliable PCR
22 822 detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *Journal of*
23 823 *Microbiological Methods* 2002, 51(3):349-359.
- 24 824 56. Kelman A: The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony
25 825 appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 1954, 44:693-695.
- 26 826 57. Fegan M, Prior P: How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In:
27 827 *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Edited by Allen C,
28 828 Prior P, Hayward AC. Madison: APS Press; 2005: 449-462.
- 29 829 58. Opina N, Tavner F, Hollway G, Wang J-F, Li T-H, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC,
30 830 Krishnapillai V, Hong WF *et al*: A novel method for development of species and strain-
31 831 specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly
32 832 *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*
33 833 1997, 5:19-30.
- 34 834 59. Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P: *Ralstonia*
35 835 *solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic
36 836 potential. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73(21):6790-6801.
- 37 837 60. Sanchez Perez A, Mejia L, Fegan M, Allen C: Diversity and distribution of *Ralstonia*
38 838 *solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant*
39 839 *pathology* 2008, 57(2):320-331.
- 40 840 61. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive
41 841 multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties
42 842 and weight matrix choice. *Nucleic acids research* 1994, 22(22):4673-4680.
- 43 843 62. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S: MEGA5: molecular
44 844 evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and
45 845 maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 2011, 28(10):2731-2739.
- 46 846 63. Librado P, Rozas J: DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism
47 847 data. *Bioinformatics* 2009, 25(11):1451-1452.
- 48 848 64. Vallenet D, Labarre L, Rouy Z, Barbe V, Bocs S, Cruveiller S, Lajus A, Pascal G, Scarpelli C,
49 849 Medigue C: MaGe: a microbial genome annotation system supported by synteny results.
50 850 *Nucleic acids research* 2006, 34(1):53-65.
- 51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 851 65. Grissa I, Bouchon P, Pourcel C, Vergnaud G: On-line resources for bacterial micro-evolution
1 852 studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 2008, 90(4):660-668.
- 2 853 66. Denceud F, Vergnaud G: Identification of polymorphic tandem repeats by direct
3 854 comparison of genome sequence from different bacterial strains: a web-based resource.
4 855 *BMC bioinformatics* 2004, 5(1):4.
- 5 856 67. Gelfand Y, Rodriguez A, Benson G: TRDB—the tandem repeats database. *Nucleic acids*
6 857 *research* 2007, 35(suppl 1):D80-D87.
- 7 858 68. Estoup A, Angers B: Theoretical and empirical considerations. *Adv Mol Ecol* 1998, 306:55.
- 8 859 69. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool.
9 860 *Journal of molecular biology* 1990, 215(3):403-410.
- 10 861 70. Pourcel C, Vergnaud G: Strain typing using Multiple “Variable Number of Tandem Repeat”
11 862 Analysis and genetic element CRISPR. In: *Molecular microbiology: Diagnostic principles and*
12 863 *practice 2nd Edition*. Edited by Persing D, Tenover F, Tang Y, Nolte F, Hayden R.
13 864 Washington, D.C.: ASM Press; 2011: 179-197.
- 14 865 71. Nei M: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of
15 866 individuals. *Genetics* 1978, 89(3):583-590.
- 16 867 72. Peakall R, Smouse PE: GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for
17 868 teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 2006, 6(1):288-295.
- 18 869 73. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an
19 870 application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology* 1988,
20 871 26(11):2465-2466.
- 21 872 74. Dray S, Dufour A-B: The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists.
22 873 *Journal of statistical software* 2007, 22(4):1-20.
- 23 874 75. R DCT: R: A Language and Environment for Statistical Computing. In. Vienna, Austria: R
24 875 Foundation for Statistical Computing; 2010.
- 25 876 76. Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, Melo-Cristino J, Ramirez M, Carriço JA: PHYLOViZ:
26 877 phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC*
27 878 *bioinformatics* 2012, 13(1):87.
- 28 879 77. Paradis E, Claude J, Strimmer K: APE: analyses of phylogenetics and evolution in R
29 880 language. *Bioinformatics* 2004, 20(2):289-290.
- 30 881 78. Jombart T, Devillard S, Balloux F: Discriminant analysis of principal components: a new
31 882 method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 2010, 11(1):94.
- 32 883 79. Kamvar ZN, Tabima JF, Grunwald NJ: Poppr: an R package for genetic analysis of
33 884 populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2014, 2:e281.
- 34 885 80. Ivey MLL, Gardener BBM, Opina N, Miller SA: Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting
35 886 eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 2007, 97(11):1467-1475.
- 36 887 81. Cruz L, Eloy M, Quirino F, Oliveira H, Tenreiro R: Molecular epidemiology of *Ralstonia*
37 888 *solanacearum* strains from plants and environmental sources in Portugal. *European journal*
38 889 *of plant pathology* 2012, 133(3):687-706.
- 39 890 82. Poussier S, Trigalet Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A: Genetic
40 891 diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP
41 892 and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology*
42 893 2000, 146(pt.7):1679-1692.
- 43 894 83. Leduc A, Traoré Y, Boyer K, Magne M, Grygiel P, Juhasz C, Boyer C, Guerin F, Wonni I,
44 895 Ouedraogo L: Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium:
45 896 *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso.
46 897 *Environmental microbiology* 2015.
- 47 898 84. Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U: Polyphasic taxonomic revision of
48 899 the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of
50 900 *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as
51 901 *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as
52 902 *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains

- 903 as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III
1 904 strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *International journal of systematic and*
2 905 *evolutionary microbiology* 2014, 64(Pt 9):3087-3103.
- 3 906 85. Ailloud F: Le pouvoir pathogène chez *Ralstonia solanacearum* phylotype génomique
4 907 intégrative et paysages transcriptomiques en relation avec l'adaptation à l'hôte. Thèse de
5 908 Doctorat (PhD THESIS). Saint Denis, Reunion Island: University of La Reunion; 2015.
- 6 909 86. Prior P, Ailloud F, Dalsing B, Remenant B, Sanchez B, Bull CT, Allen C: Additional evidence
7 910 for the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species inferred
8 911 through genomic and proteomic analyses. *Systematic Applied Microbiology* 2015(in press).
- 9 912 87. Della Coletta-Filho H, Takita MA, de Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA:
10 913 Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat
11 914 analysis. *Applied and environmental microbiology* 2001, 67(9):4091-4095.
- 12 915 88. Cesbron S, Pothier J, Gironde S, Jacques M-A, Manceau C: Development of multilocus
13 916 variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas arboricola* pathovars.
14 917 *Journal of microbiological methods* 2014, 100:84-90.
- 15 918 89. Zhao S, Poulin L, Rodriguez-R LM, Serna NF, Liu S-Y, Wonni I, Szurek B, Verdier V, Leach JE,
16 919 He Y-Q: Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the
17 920 bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Phytopathology* 2012,
18 921 102(10):948-956.
- 19 922 90. Pruvost O, Goodarzi T, Boyer K, Soltaninejad H, Escalon A, Alavi SM, Javegny S, Boyer C,
20 923 Cottyn B, Gagnevin L: Genetic structure analysis of strains causing citrus canker in Iran
21 924 reveals the presence of two different lineages of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A*.
22 925 *Plant Pathology* 2015.
- 23 926 91. Grey B, Steck T: The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be
24 927 involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*
25 928 2001, 67(9):3866-3872.
- 26 929 92. Ellegren H: Microsatellite mutations in the germline:: implications for evolutionary
27 930 inference. *Trends in genetics* 2000, 16(12):551-558.
- 28 931 93. Schlötterer C: Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000, 109(6):365-
29 932 371.
- 30 933 94. Kimura M, Crow JF: The number of alleles that can be maintained in a finite population.
31 934 *Genetics* 1964, 49(4):725.
- 32 935 95. Di Rienzo A, Peterson A, Garza J, Valdes A, Slatkin M, Freimer N: Mutational processes of
33 936 simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy*
34 937 *of Sciences* 1994, 91(8):3166-3170.
- 35 938 96. Crow JF, Kimura M: An introduction to population genetics theory. *An introduction to*
36 939 *population genetics theory* 1970.
- 37 940 97. Fraser C, Hanage WP, Spratt BG: Neutral microepidemic evolution of bacterial pathogens.
38 941 *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America* 2005,
39 942 102(6):1968-1973.

40 943
41 944
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Captions to Figures.

1
2 **Figure 1. Haplotypes network built from MLVA-8 dataset on different collections.** Collection
3 “Vallon 1999” is represented in blue, collection “Vallon 2009” is represented in green, collection
4 “Vallon 2012” is represented in black, collection “Piroque” (Martinique) is represented in red, and
5 worldwide collection is represented in grey. Networks link Single-locus variants (SLV) in blue,
6 Double Locus Variant (DLV) in green and Triple Locus Variant (TLV) in red. Labels within the
7 circles indicate the haplotype number. (A) Global view (B) Detail view of clonal complex 01 (C)
8 Detail view of clonal complex 02. The founder of each CC is circled in yellow (H053 for CC1 and
9 H056 for CC2), whereas the founders of subgroups within CC are circled in light green. This figure
10 was built with the goEBURST algorithm implemented in PHYLOViZ 1.1.
11
12
13
14

15 **Figure 2. Scatter plot representing DAPC clusters over the worldwide collection (n=34).** (A)
16 DAPC cluster using the MLVA-13 dataset. Clusters are named DAPC13.1 to 14 in the text, while
17 labels on the figures correspond to the cluster numbers. Clusters 01, 02, 12, 14 are specific to Ivory
18 Coast, while four others are shared by several countries: Ivory Coast and Guatemala (cl06); Ivory
19 Coast, Kenya and South Africa (cl07), Ivory Coast and Niger (cl11); Cameroon and China (cl13). (B)
20 DAPC cluster using the MLVA-8 dataset. Clusters are named DAPC8.1 to 14 in the text while labels
21 on the figures correspond to the cluster numbers. Clusters 03, 04, 05, 11 are specific to Ivory Coast,
22 while others are specific to South Africa (cl07), Taiwan (cl09), Cameroon (cl10), French Guiana
23 (cl12), Australia (cl14); others clusters cover Ivory Coast, Kenya and South Africa (cl02), Ivory Coast
24 and Niger (cl06), Ivory Coast and Cameroon (cl08), Ivory Coast and Guatemala (cl13). Numbers on
25 axes indicate their respective inertia rates. Figures were obtained using the “scatterplot” function of the
26 R package “adegenet” [75].
27
28
29
30
31
32

33 **Figure 3. Correspondence between Clonal Complexes [20] and DAPC clusters inferred from**
34 **MLVA-13 (left) and MLVA-8 (right).** Inf = DAPC clusters inferred from the dataset mentioned. CC
35 = complex clonal, S = singleton. Figures obtained using the “table.value” function in the R “adegenet”
36 package [78].
37
38
39

40 **Figure 4. Scatter plot representing DAPC clusters on “Vallon 2012”, “Piroque 2007”**
41 **(Martinique) and worldwide collections.** Reunion-specific clusters and Martinique cluster (12) are
42 respectively associated to negative and positive values on the axis 1. RUN=Reunion, CI = Ivory Coast,
43 KEN= Kenya, ASIA = Taiwan and China, Some clusters are shared across countries: Ivory Coast and
44 Cameroon (8), Ivory Coast and Guatemala (2), Taiwan and China (3), French Guiana, Ivory Coast,
45 Niger, Taiwan and Reunion (6). Numbers on axes indicate their respective inertia rates. Figure
46 obtained using “find.cluster” and the “scatterplot” function in the R package “adegenet” [78].
47
48
49

50 **Figure 5. DAPC clusters inferred within “Vallon” collections.** Strains in “Vallon 1999” (n=96),
51 Vallon 2009” (n=90) and “Vallon 2012” (n=319) collections were genotyped using MLVA-8 scheme
52 (left scatterplot), and their distribution within the three collections (“table.value”, right plot). Among
53 the six clusters, three (cl01, cl02 and cl06) are specific to “Vallon 2012”, whereas two (cl03 and cl04)
54 are common to all three collections. Numbers on axes indicate their respective inertia rates. Figure
55 obtained using “find.cluster”, the “scatterplot” and the “table.value” function in the R package
56 “adegenet” [75]. Inf = DAPC clusters inferred from the dataset mentioned.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1. Summary of the local collections of strains used in this study.

Collection	Sampling location	Country	GPS coordinates ^a	Sampling date	Sampled material	Host	No strains
Pirogue 2007 (Martinique)	Field "Habitation Pirogue", Le Lorrain	Martinique (French West Indies)	+14.803049° -61.104434°	2007	Soil	<i>Musa</i> fallow	38
Vallon 1999	Field "Le Vallon", CIRAD			1999	Stem and Rhizosphere	<i>Solanaceae</i> and <i>Geraniaceae</i>	96
Vallon 2009	experimental station of "Ligne paradis", St Pierre	Reunion Island	-21.320806° 55.484525°	2009	Stem	Pepper, Tomato and Eggplant	90
Vallon 2012				January-March 2012	Soil and Stem	Tomato	319
Total							543

^a Latitude and Longitude. Positive latitude coordinates correspond to North whereas negative coordinates correspond to South; positive longitude coordinates correspond to East whereas negative coordinates correspond to West.

Table 2. General features of the VNTR loci composing the newly developed MLVA-8 scheme. Localization, size and repeat number, and primers used for amplification of repeat regions.

Locus name ^a	Genome of origin ^c	Start position	Localisation	Tandem repeat sequence	Motif size (bp)	VNTR size in the genome of origin	Primers ^d	Annealing Temperature
CMmp0131	CMR15	131842	Intergene	TCGGGA	6	69	5' FAM-CCCCGGTGGCTTTGTGTCATTCCCGG 5' GATCGGGCAGCCGGGATACCCGC 3'	
CMmp0233	CMR15	233468	putative secreted protein popf1	GCCGGA	6	76	5' NED-GCCTGCAGTGGCCCACTTCAGGTC 5' ACCTGCCGTCCGACCTGTTCTTCA 3'	
GMch0133	GMI1000	133827	conserved hypothetical protein, putative 2-nitropropane dioxygenase	TCGCAA	6	41	5' PET-CATCGACCTGAAGCTGGCGCAGG 5' TGGACTACAGGTGATGGTCGGCA 3'	
GMch0754	GMI1000	754254	protein of unknown function or conserved protein of unknown function, proline-alanine-aspartic repeated motif	GGATCGGCA	9	142	5' VIC-GGCTCGTTGGCGGCTTCGATGTT 5' CGCTGTTCAACCGACCTGCCCGAG 3'	63°C
GMch3461	GMI1000	3461892	putative pseudogene (dehydrogenase) protein	AATGGTTG	8	57	5' FAM-CGAGGTGCTTCCAGAAAGGCGA 5' CGAGAAGGCCAGTCCCGAGCTGA 3'	
GMmp0266	GMI1000	266226	conserved protein of unknown function	GAAAGCGACC	9	108	5' NED-CCTGTATCGGCGCCGGAGATTGC 5' TGTCTTTGCCGAAACATCCGCG 3'	
Ymp0875	Y45	875800	type III secretion system protein hrpF	GACGAAAGAC	9	137	5' PET-CCGAGGATGAGGAGGAGGACCGCC 5' AGCGTGCCGGTGACTTCAACCAC 3'	
CMmp0985 (RS3L20) ^b	CMR15	985	putative cobalamin biosynthesis protein (cobN)	CGTGAT	6	128	5' VIC-GCCCGCGCCAGCTCGCACACA-3' 5' AAGCGCACCCGCCACCCCGCA 3'	

^a Loci were named according to the name of the genome of origin (CM = CMR15; GM = GMI1000 and Y = Y45), the localization (mp = megaplasmid; ch = chromosome), and the physical position on the replicon.

^b The locus CMmp0985 (RS3L20) was previously described [20] and used in this study because it was the only polymorphic locus on the collection “Vallon 2012” when the first MLVA scheme (MLVA-13) was used.

^c Genomic sequences of these references strains CMR15 (phylogroup III) [42], GMI1000 (phylogroup I) [45] and Y45 (phylogroup I) [48]

^d Forward primer were labeled with different dye (FAM = blue; NED = yellow/black; PET = red; VIC = green).

Table 3. Comparison of genetic diversity revealed by MLVA-13 [20] and MLVA-8. Comparison realized at different scales ranging from worldwide to regional (Ivory Coast) and field (“Vallon 2012”) scales.

Collection (Phylotype I)	MLVA-13 scheme [20]				MLVA-8 scheme (this study)			
	N	H.u.b	No haplotypes	G/N	N	H.u.b	No haplotypes	G/N
Worldwide (in N’Guessan, 2012)	37	0.374	31	0.88	37	0.666	34	0.9
Ivory Coast (in N’Guessan, 2012)	18	0.307	15	0.83	18	0.597	17	0.94
“Vallon 2012”	319	0.013	3	0.007	319	0.333	43	0.135

N: number of strain, H.u.b: Nei's unbiased gene diversity per locus, G/N: ratio of the number of genotype divided by the number of strains. All statistics were calculated with GenAlex v. 6.5.

Table 4. Number of strains of each *R. solanacearum* phylotype and *Ralstonia* outgroup amplified per individual locus. Percentages (in brackets) are calculated based on the total number of strains per group (last row).

Locus	Phylotype I	Phylotype III	Phylotype II	Phylotype IV	<i>Ralstonia spp.</i>
CMmp0131	580 (100)	4 (66,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CMmp0233	580 (100)	4 (66,6)	2 (25)	0 (0)	0 (0)
CMmp0985	580 (100)	6 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GMch0133	580 (100)	6 (100)	7 (87,5)	3 (75)	0 (0)
GMch0754	580 (100)	5 (83,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GMch3461	580 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
GMmp0266	580 (100)	5 (83,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ymp0875	580 (100)	4 (66,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total number of strains	580	6	8	4	3

Table 5. Summary statistics for the different collections of strains, based on MLVA-8 loci.

Collection	Host	N ^a	Number of haplotypes	G/N ^b	Mean Na ^c	I ^d	H.u.b ^e	Allelic richness
Pirogue 2007 (Martinique)	Soil, <i>Musa</i> fallow	38	5	0.132	1.375	0.140	0.091	1.22
Vallon 1999	<i>Solanaceae</i> , <i>Geraniaceae</i>	96	8	0.083	1.750	0.173	0.097	1.28
Vallon 2009	<i>Solanaceae</i>	90	7	0.078	1.750	0.301	0.182	1.3
Vallon 2012	<i>Solanum lycopersicum</i>	319	43	0.135	5.125	0.582	0.333	1.81

^aN: Number of strains;

^bG/N: ratio of the number of genotype divided by the number of strains;

^cNa: Number of different alleles;

^dI: Shannon's information index;

^eH.u.b: Nei's unbiased diversity index.

All statistics were calculated with GenAlex v. 6.5.

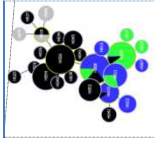
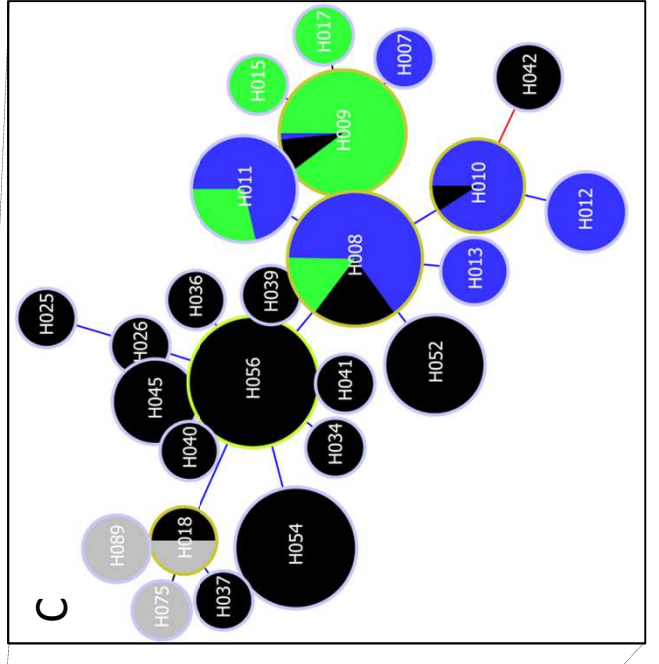
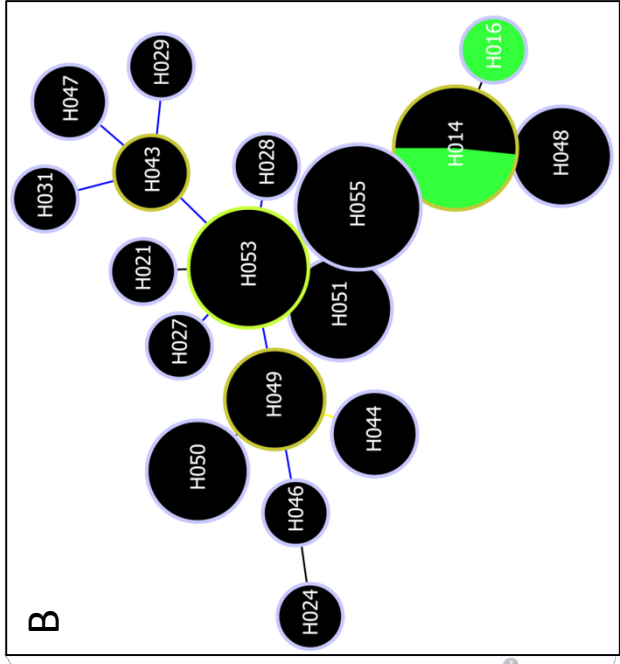
Table 7. Estimates of multilocus linkage disequilibrium. Estimation was realized on field populations and DAPC clusters inferred within the “Vallon” collections (see figure 5). Indices significance was tested on 999 permuted data sets using parametric bootstrap method unless specified.

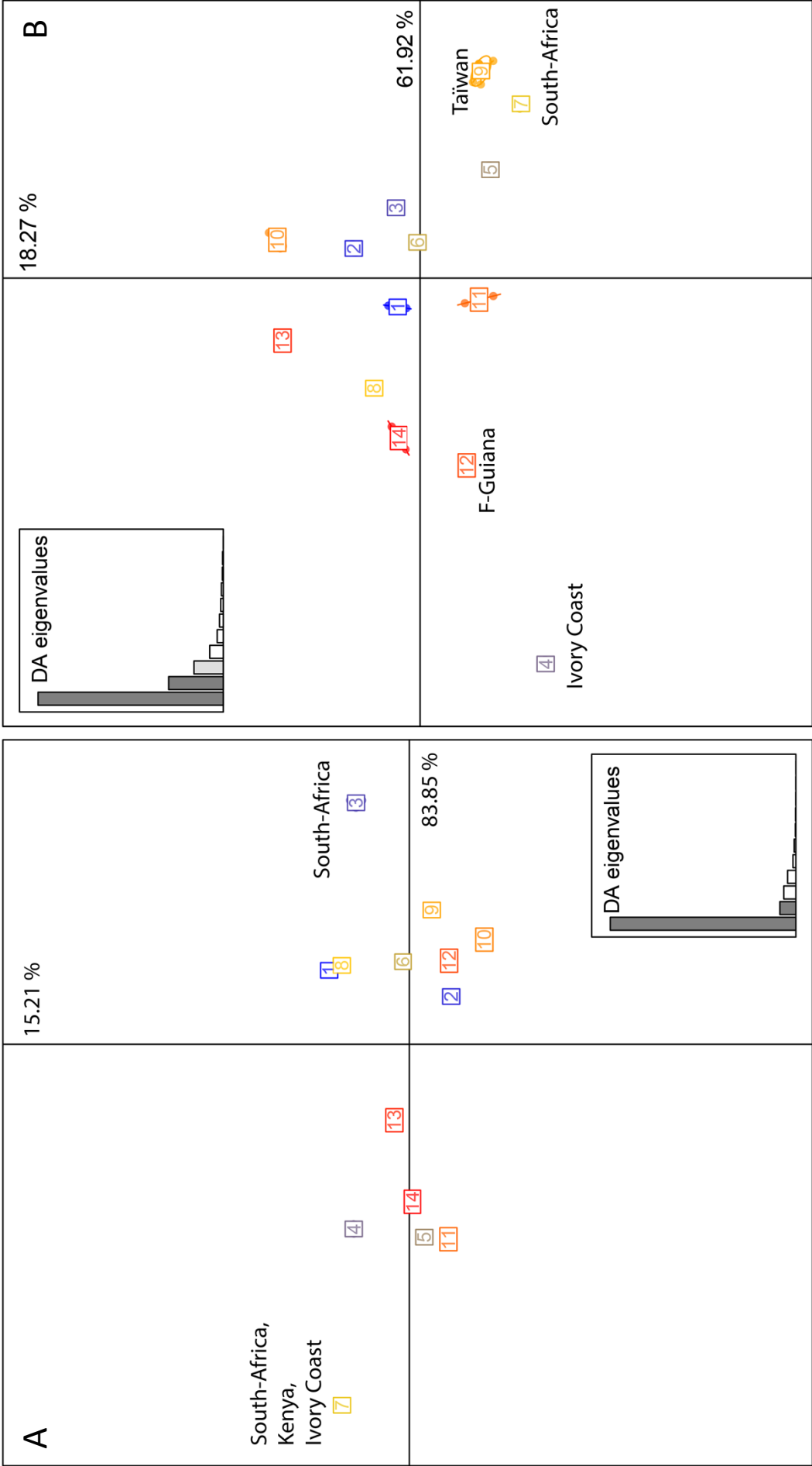
Populations	I_A	P^a	r_D	P^a
Field populations				
Pirogue 2007 (Martinique)	0.301	0.009** ^b	0.173	0.009** ^b
Vallon 1999	0.149	0.049*	0.052	0.065 ^{NS}
Vallon 2009	1.18	0.001***	0.438	0.001***
Vallon 2012	1.318	0.001***	0.247	0.001***
DAPC clusters within Vallon collections				
Cluster 1	1	NA	1	NA
Cluster 2	0.487	0.017*	0.102	0.037*
Cluster 3	0.56	0.001***	0.193	0.002***
Cluster 4	0.033	0.191 ^{NS}	0.014	0.22 ^{NS}
Cluster 5	0.285	0.002**	0.079	0.011*
Cluster 6	0.46	0.001***	0.127	0.001***

^a P -values were estimated from 999 randomized permutations. NS: not significant, *=significant, **=highly significant, ***=very highly significant.

^b Randomly permuted datasets were obtained using the “permutation over alleles” method.

A





15.21%

Reunion

7
13

Martinique,
F-Guiana
12

RUN, CI, KEN
10
14
11

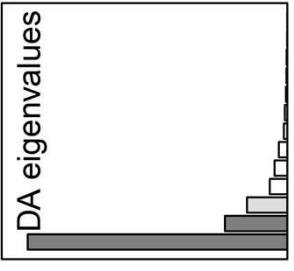
South Africa
4

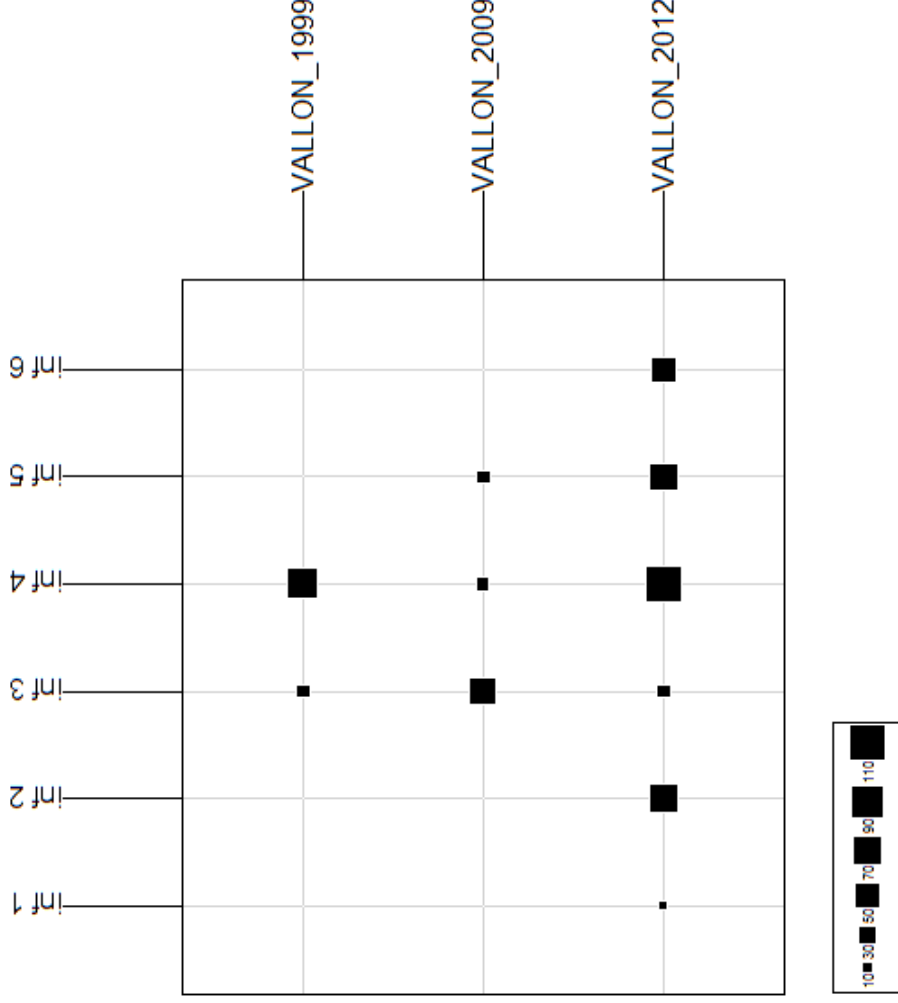
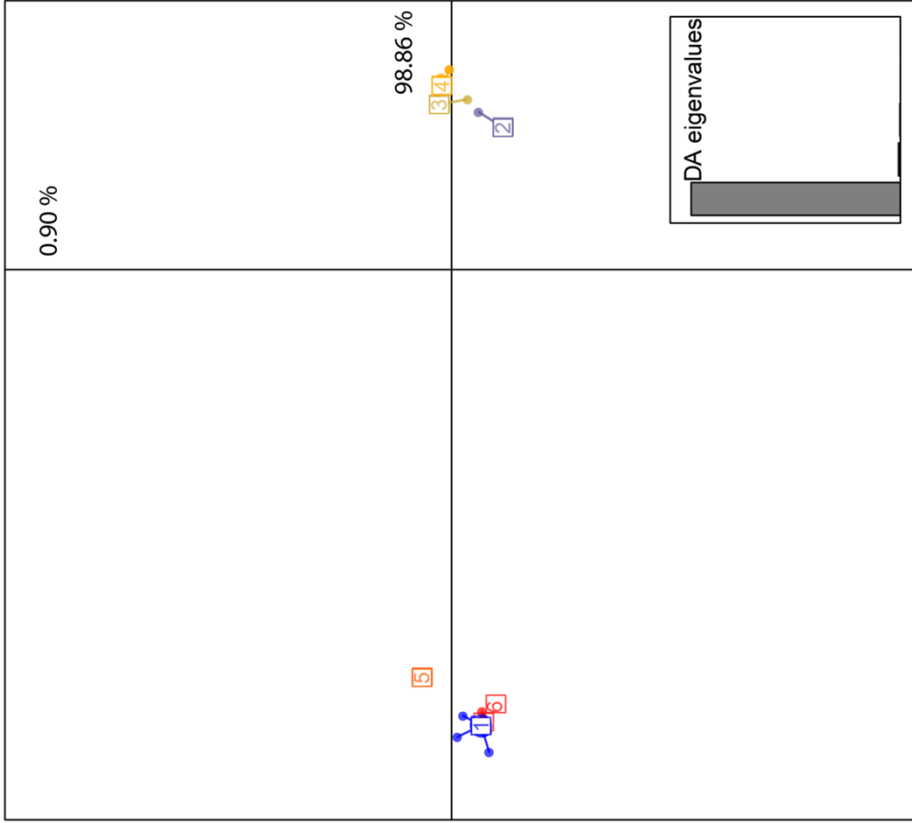
8
2

3

ASIA
6

63.29%





PARTIE 2.2

La succession de cycles de culture d'aubergines sensibles (E8) et d'aubergines résistantes (E6) impacte fortement la structure génétique d'une population naturelle de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I

1. Problématique

La durabilité de la résistance d'une plante a longtemps été définie comme étant la période entre l'introduction d'un cultivar résistant dans un agroécosystème jusqu'à ce que la fréquence des génotypes virulents atteigne un seuil au-delà duquel la résistance est considérée comme « contournée » [2]. Ainsi, la durabilité d'une résistance apparaît comme une notion *a posteriori*, que l'on ne peut étudier qu'une fois la résistance contournée. Cependant, certains auteurs ont proposé de prédire la durabilité en utilisant des indicateurs de durabilité potentielle [109, 110, 122] qui prennent en compte le potentiel évolutif des agents pathogènes [1]. Ce type d'approche prédictive a été utilisée avec *brio* chez *Leptosphaeria maculans* [122] et apparaît nécessaire pour comprendre l'évolution d'un agent pathogène en réponse à des changements cultureux. En effet, la plupart des études d'évolution expérimentale ont jusqu'à présent été réalisées en conditions contrôlées. Cependant, elles ne reflètent pas la réalité biologique de l'évolution d'un agent pathogène au champ, par exemple en réponse au déploiement d'une variété résistante. Les études se focalisant sur l'évolution expérimentale au champ des populations bactériennes sont pour l'instant très peu documentées, alors que ce type d'approche est capital pour comprendre l'évolution bactérienne dans des conditions plus proches de la réalité biologique « sur le terrain ». Avec le développement des marqueurs moléculaires, des stratégies d'analyse innovantes et la mise au point de systèmes expérimentaux optimaux, il est dorénavant possible de réaliser des études à l'échelle parcellaire.

Pour étudier la durabilité de la résistance de l'aubergine AG91-25, codée E6 (portant un gène majeur de résistance *ERs1*) [426], nous avons mis en place un essai d'évolution expérimentale au champ afin d'étudier son influence sur la diversité et structuration génétique d'une population naturelle de *R. solanacearum*. Cet essai est composé de trois couples de microparcelles (résistante E6, sensible E8), implantées deux fois par an, pendant trois ans. Les objectifs de cette étude sont (i) d'étudier l'évolution de la génétique bactérienne sous pression de sélection, (ii) de comprendre la structuration spatiale et temporelle de cette population et (iii) d'identifier les patrons de dissémination de *R. solanacearum* au sein du champ.

2. Méthodologie

Dans un premier temps, un premier cycle (cycle 0) de tomate sensible (« Farmer 209 », *Solanum lycopersicum*) a été implantée sur toute la parcelle du Vallon afin (i) de multiplier l'inoculum naturellement présent dans la parcelle, (ii) de détecter les principaux foyers d'infestation dans lesquels nous avons implanté des micro-parcelles d'aubergines, et (iii) de constituer une collection d'isolats collectés sur une culture peu voire pas sélective pour déterminer la structure génétique des populations de *R. solanacearum* présentes dans le sol et dans la tige. L'incidence du flétrissement bactérien a été suivie au cours de ce cycle chez la tomate et a permis de déterminer les foyers d'apparition du flétrissement bactérien au sein desquels les microparcels d'aubergines sensibles et résistantes ont été implantées. Ainsi, dans un second temps, plusieurs cycles successifs (cycles 1 à 5) d'aubergine sensible (*Solanum melongena* L. cultivar MM738, codée E8) et résistante (*Solanum melongène* L. cultivar AG91-25, codée E6) ont été implantées sur 3 couples de microparcels. Un premier échantillonnage en « double W » sur l'ensemble de la parcelle a été réalisé durant le cycle 0 (28 points d'échantillonnage). Pour les cycles successifs d'aubergine (microparcels), un échantillonnage en « double W » a été réalisé sur les plantes symptomatiques d'aubergine sensible (E8) et un prélèvement systématique des aubergines résistantes (E6) a été réalisé en fin de cycle pour identifier les infections latentes. 319 souches appartenant à *R. solanacearum* phylotype I ont été extraites durant le cycle 0, 223 durant le cycle 1 (dont 71 isolées de la variété résistante E6 et 152 de la variété sensible E8), 594 sont issues d'E8 durant le cycle 2 et 684 d'E8 durant le cycle 4.

En premier lieu, nous avons suivi le développement de la maladie au champ au cours des 5 cycles de culture d'aubergine. Ces données symptomatologiques ainsi que les données de génétique ont permis d'étudier l'aspect spatial et temporel de l'infection par *R. solanacearum*. Ensuite, les souches bactériennes ont été génotypées avec le schéma MLVA-8 précédemment développé. À partir de ces données, nous avons analysé l'évolution de la diversité génétique au cours des cycles d'aubergine à différentes échelles spatiales : à l'échelle globale et à l'échelle de la microparcelle. Ces données de génotypage ont par la suite été utilisées pour analyser la structuration temporelle de la génétique de ces populations bactériennes, en calculant les indices de différenciations génétique (F_{ST} et R_{ST}), la variance moléculaire (AMOVA) et les indices du déséquilibre de liaison (I_a et r_{barD}). Nous avons aussi étudié le *clustering* génétique (ACP et DAPC) et l'isolement par la distance (IBD) pour chaque cycle et chaque microparcelle. Ces analyses, réalisées sur différentes populations, ont aussi permis d'étudier l'impact du fond génétique de la plante sur la structure génétique des populations et l'effet-filtre de la variété hôte à l'entrée de la bactérie dans la plante.

Parallèlement, au vu des données d'incidence de la maladie, l'hypothèse d'une adaptation à l'hôte sensible (E8) entre les cycles 1 et 2 a été émise (H1). Nous avons ainsi testé l'hypothèse que l'augmentation de l'incidence et l'accroissement de la cinétique d'infection sur E8 est due à une augmentation de l'agressivité des souches entre les 2 cycles. La détection d'infections latentes en cycle

2 nous a amenés à formuler l'hypothèse que l'hôte résistant (E6) a sélectionné certaines souches (H2). Nous avons donc testé l'hypothèse que les souches issues d'infections latentes sur E6 ont une agressivité moindre sur l'accession sensible E8 que des souches isolées d'E8.

3. Résultats et discussion

Les aubergines résistantes (E6) n'ont présenté aucun symptôme de flétrissement bactérien au cours des 5 cycles de culture. Cependant, des infections latentes (bactéries infectant les tissus vasculaires de la tige de plante sans provoquer de symptôme), ont été détectées au cours du cycle 1. 71 souches ont été extraites de ces infections latentes au cours du cycle 1 alors qu'aucune souche de *R. solanacearum* n'a été isolée durant les autres cycles. Ces résultats démontrent une absence de contournement de la résistance d'E6 par nos populations parcellaires de *R. solanacearum*, confirmant le caractère durable de cette résistance. De plus, la variété résistante aurait un fort effet sur les populations bactériennes du sol. Des prélèvements de sol ont été réalisés après le cycle 5 au sein des microparcelles d'E6, aux mêmes endroits où ont été extraites des bactéries d'infection latente (cycle 1). Aucune souche de *R. solanacearum* n'a été identifiée. Cette réduction de l'*inoculum* bactérien, ne nous permettant plus de détecter la bactérie avec notre méthode, aurait ainsi fortement diminué la capacité de *R. solanacearum* à infecter l'hôte résistant.

Concernant l'aubergine sensible, entre 24 et 40% des plants ont flétri en cycle 1 alors que pour les cycles suivants (cycles 2 à 5), une incidence totale (100%) a été observée sur ce cultivar. Les résultats d'essais en conditions contrôlées montrent que l'augmentation de l'incidence entre les cycles 1 et 2 n'est pas due à une agressivité plus importante des souches en cycle 2. Concernant la dissémination spatiale de la maladie sur l'aubergine sensible, différents phénomènes ont été observés. Au cours du cycle 1, les symptômes du flétrissement bactérien apparaissent une semaine après implantation, d'abord par foyer puis l'infection se propage aux plantes environnant une plante infectée, c'est-à-dire « plante-à-plante ». Pour les autres cycles, les premiers symptômes de flétrissement apparaissent deux à trois semaines après l'implantation. Des foyers de maladie apparaissent tout au long du cycle de culture. Parallèlement, ces foyers s'étendent et infectent les plantes avoisinantes par contamination « plante-à-plante ». Finalement, les foyers de maladie coalescent et déciment l'ensemble des aubergines sensibles.

La diversité génétique des populations extraites de notre parcelle expérimentale est faible comparée à d'autres espèces de bactéries phytopathogènes [143, 144, 190, 447] Une baisse de la diversité génétique est observée au cours des cycles de cultures répétés d'aubergines sensibles. Cette diminution est associée à l'augmentation en fréquence de deux haplotypes majoritaires au sein des trois microparcelles. Ces résultats nous ont conduits à formuler l'hypothèse d'une adaptation locale des souches entre les cycles 1 et 2, hypothèse qui n'a pas été confirmée par les essais en chambre climatique. De plus, aucune différenciation génétique significative n'a pu être mise en évidence entre les souches issues des tiges et des rhizosphères des plants d'aubergine, que ce soit à l'échelle de la

microparcelle ou du point d'échantillonnage. Ces résultats suggèrent une absence de sélection des bactéries à l'entrée dans la plante (effet-filtre). De plus, la plupart des haplotypes détectés sont issus de la tige et non de la rhizosphère, ce qui va à l'encontre d'un effet-filtre de la plante sur les populations bactériennes. L'absence de *clustering* génétique semble indiquer une absence de structuration des populations ; en revanche, les mesures d'isolement par la distance, non-significatifs au premier cycle puis de plus en plus significatifs aux cycles suivants, suggèrent qu'une structuration spatiale se met en place suite aux successions culturales. Par ailleurs, les populations bactériennes apparaissent fortement clonales (déséquilibre de liaison très significatif).

4. Conclusion

Cette étude permet de mieux comprendre l'épidémiologie du flétrissement bactérien ainsi que de mieux appréhender la dynamique évolutive de cette population bactérienne sous pression de sélection à l'échelle de la parcelle. Nous avons démontré que la variété portant le gène de résistance majeur *ERs1* (E6) présente un niveau de résistance plus important que celui révélé dans de précédentes études [425] et apparaît bien plus durable qu'attendu. Bien que la variété sensible ne possède pas de facteur de résistance connu, elle semble, elle aussi, impacter les populations bactériennes de notre parcelle expérimentale.

Cette approche d'estimation la durabilité d'une résistance est primordiale en protection des plantes, notamment pour le déploiement raisonné des résistances variétales. Le cultivar E6 pourrait ainsi être utilisé en culture de mélange afin de limiter la dissémination de la maladie. Il pourrait éventuellement être aussi associé à d'autres cultures suppressives en rotation de culture, comme cela a été expérimenté pour d'autres plantes aux Antilles françaises [391, 448].

5. Publication

L'ensemble de ce travail a donné lieu à une publication scientifique en cours d'écriture pour une soumission à une revue internationale de rang A avec comité de lecture : *Environmental Microbiology*. L'article scientifique s'intitule « **Crop succession of resistant and susceptible eggplants strongly impacts the genetic structure of a natural population of *Ralstonia solanacearum* phylotype I** » Guinard Jérémy, Sujeeun Lakshmi, Damour Anais, Chiroleu Frédéric, Poussier Stéphane and Wicker Emmanuel (2015). Les tableaux et figures supplémentaires sont présentés en Annexe 2.

1 **Crop succession of resistant and susceptible eggplants strongly impacts the**
2 **genetic structure of a natural population of *Ralstonia solanacearum***
3 **phylotype I**

4

5 Guinard Jérémy^{a,b}, Lakshmi Sujeeun^{a,b}, Anais Damour^{a,b}, Frédéric Chiroleu^b, Poussier
6 Stéphane^a and Wicker Emmanuel^{b*}

7

8 ^a Université de la Réunion, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu
9 Tropical (PVBMT), 15 avenue René Cassin, BP7151, F-97715 Saint Denis Cedex 9, Réunion,
10 France.

11 ^b CIRAD, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT),
12 Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Réunion, France

13

14

15

16

17 ***Corresponding author:** Emmanuel Wicker

18 CIRAD, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Reunion,
19 France. Phone: (+262) 262 49 92 42; Fax: (+262) 262 49 92 93;

20 Email address: wicker@cirad.fr

21

22 1. Abstract

23 Among the different strategies to study plant resistance durability, one possibility is to
24 predict potential durability by using indicators which take into account the evolutionary
25 potential of pathogens. Here, we particularly investigated the pathogens evolution under
26 selective pressure from a resistance gene. We set up a three years-experimental evolution trial
27 to compare the influence of two eggplant cultivars on a natural population of
28 *Ralstonia solanacearum* phylotype I. The experiment was realized on the resistant eggplant
29 cultivars, AG91-25 (E6) carrying the resistance gene *ERs1*, and on susceptible eggplant
30 cultivars (MM738 or E8). We found out that the resistance of E6 eggplant was durable in our
31 conditions and had a strong effect on bacterial population. Indeed, E6 seemed to reduce so
32 much soil bacterial *inoculum* that we could not detect it in the soil and that E6 plants could
33 not be colonized anymore. Concerning the susceptible eggplant cultivar, we showed that it
34 caused a genetic diversity reduction associated with the increase in frequency of two main
35 haplotypes. Even though no clear genetic structure could be identified within E8-solates, IBD
36 results seemed to show that a spatial genetic structure was taking place in our field. Our data
37 suggested a clonal epidemic structure of our field population invading the three microplots of
38 susceptible eggplant.

39

40 **2. Introduction**

41 Resistance durability has always been a key goal of breeding programs. As defined by
42 Johnson (Johnson, 1984), a resistance is durable when it remains effective while a cultivar
43 carrying this resistance is deployed at large scale and over a long period of time under
44 disease-conducive conditions. Then, the notion of breakdown was introduced (Van Den
45 Bosch and Gilligan, 2003) and resistance durability was redefined as being the duration time
46 between the introduction of a resistant cultivar in an agroecosystem until the appearance of a
47 virulent genotype able to breakdown the resistance. Thus, resistance durability was only
48 investigated using theoretical models and by retrospective analysis of evolutionary processes
49 leading to the resistance breakdown (Leach et al., 2001; Zhan and McDonald, 2013). Until
50 now, few studies have tried to predict durability by using indicators of potential durability
51 (Leach et al., 2001; Janzac et al., 2009) which take account of the evolutionary potential of
52 pathogens (*sensu* McDonald & Linde (McDonald and Linde, 2002)). Using this kind of
53 approach, Daverdin et al. (Daverdin et al., 2012) successfully monitored the evolution of
54 *Leptosphaeria maculans* population faced to a cultivar carrying *Rlm7* resistance gene. By
55 combining molecular biology, population genetics and agronomy, they showed that a wide
56 range of mutation events was at the origin of resistance breakdown, thus giving new insights
57 on the strategies implemented by this ascomycete to adapt to resistance selective pressure
58 (Daverdin et al., 2012). Such multi-disciplinary approach is essential to understand how
59 pathogens evolved under different cultural practices at the field scale. So far, most of genetic
60 evolution studies testing adaptation hypothesis were conducted under laboratory conditions
61 because tracking pathogens population in field remained difficult until the recent development
62 of molecular tools and computing technologies (Zhan and McDonald, 2013). Biological
63 conclusions in laboratory experiment can be biased because controlled conditions most often
64 favor pathogen development to the detriment of plant. In this type of experiment, constraints

Chapitre II – Partie 2

65 on pathogen evolution - such as potential trade-off between *fitness* components - are often
66 underestimated (Irschick and Reznick, 2009) and plant resistance might be expressed
67 differently than in field conditions. In the field, strong trade-offs may occur and studying
68 these trade-offs can give insight into potential evolution of a pathogen in response to
69 agricultural changes, such as cultivar resistance deployment (Stearns, 1989). However, there
70 is a critical lack of empirical data from field experiment. Field-based experimental evolution
71 can thus provide a good complementary approach to laboratory experiment to characterize the
72 evolutionary process by natural selection (Reznick and Ghalambor, 2005). Such field-based
73 experiment approaches have been used for *Zymnoseptoria tritici* (Zhan and McDonald, 2013),
74 *Phaeosphaeria nodorum* (Oliver et al., 2012) and *Rhynchosporium commune* (Zhan et al.,
75 2008) to test theories about how these pathogens evolved faced to a selective pressure (Zhan
76 and McDonald, 2013).

77 *Ralstonia solanacearum* is a soil-borne beta-proteobacterium and has been described as
78 the second most important plant pathogen bacterium worldwide (Mansfield et al., 2012),
79 responsible for the highly destructive bacterial wilt (BW) (Hayward, 1964). This pathogen has
80 a large range of ecological specificities, with tropical ecotypes and cool temperatures-adapted
81 ecotypes, and presents a wide host range with more than 250 plant host species to date
82 (Hayward, 1994; Wicker et al., 2002; Denny et al., 2007; Wicker et al., 2007). Among the
83 different options to control BW, host resistance is considered as the most promising strategy
84 (Huet, 2014). However, breeding for BW resistance has been strongly hindered for many
85 years by the limited availability of high level resistance genitors, but also by the huge
86 genomic and phenotypic plasticity of *R. solanacearum* (Guidot et al., 2007; Remenant et al.,
87 2010). The *R. solanacearum* complex species (Gillings and Fahy, 1994) is composed of four
88 phlotypes with different geographical origins : Asia for I, America for II, Africa for III, and
89 Indonesia for IV (Poussier, 2000; Fegan and Prior, 2005; Wicker et al., 2012). It has been

Chapitre II – Partie 2

90 recently demonstrated that these phylotypes, though all being able to infect and wilt
91 Solanaceae, have specific evolutionary dynamics, displaying different recombination rates
92 and demographic histories (Wicker et al., 2012). Following the criteria stated by McDonald
93 and Linde (McDonald and Linde, 2002), the phylotype I harbors the highest evolutionary
94 potential (Wicker et al., 2012). Indeed, it attacks a wide range of host species (Hayward,
95 1994) and is able to cause latent infection (plant colonization without symptoms) (Prior et al.,
96 1990) (Skoglund et al., 1992). This phylotype possess the ability to survive at cold
97 temperatures (Milling et al., 2009) and gathers strains with highly different virulence profiles
98 on Solanaceae, from pathoprofiles A to F (Lebeau et al., 2011) (N'Guessan et al., 2012).
99 Altogether, these biological and genetic characteristics make *R. solanacearum*, and especially
100 phylotype I, an excellent model for evolutionary dynamics studies. Studying population
101 genetic structure is essential to better understand dynamics and evolution of populations in
102 space and time, to identify dissemination patterns (N'Guessan et al., 2012), to trace source
103 contamination (Parkinson et al., 2013) and finally to anticipate potential epidemics by
104 developing durable disease resistance strategy. However, no studies focused on population
105 genetics of *R. solanacearum* at the field scale.

106 In this study, we compared the influence of a resistant eggplant cultivar, AG91-25,
107 carrying the resistance gene *ERs1* (N'Guessan et al., 2012) and a susceptible eggplant cultivar
108 (MM738), on the evolution of genetic diversity and structure of a natural population of *R.*
109 *solanacearum* phylotype I. Using a newly developed eight-loci MLVA scheme (MLVA-8,
110 (Guinard et al., 2015a)) and an experimental design allowing several monoculture cycles, we
111 specifically aimed to investigate (i) the number of crop successions necessary to induce the
112 breakdown of AG91-25 resistance and the apparition of wilting symptoms, (ii) whether
113 resistant and susceptible eggplant successions induce a change in disease incidence and

114 severity; (iii) the impact of resistant and susceptible eggplant successions on both pathogen
115 genetic diversity and structure at the field scale.

116

117 3. Results

118

119 **Disease incidence analyses revealed evolution of the disease pressure and infection** 120 **patterns**

121 *Crop successions of susceptible eggplants induce increase of maximal incidence, but do not*
122 *trigger acceleration of the disease progression*

123 During the first stage of the experiment on susceptible tomato cv. ‘Farmer’ (C0), we observed
124 a constant evolution of disease symptoms (data not shown). During the second stage of the
125 experiment (C1 to 5), no symptoms were ever observed on any resistant eggplant E6 along the
126 different crop cycles. Therefore, disease incidence results were only obtained from susceptible
127 eggplants. Susceptible eggplants displayed different wilting patterns depending of the crop
128 cycle. Wiltings in C1 began shortly after planting (7 days after planting [DAP]) but increased
129 slower than during the other cycles and reached a lower maximum wilting incidence (**Figure**
130 **1**). Indeed, depending on the microplot (MP), between 24% and 40% of susceptible eggplants
131 were dead at the end of C1 whereas all susceptible eggplants (100%) were dead at the end of
132 the other cycles (**Supplemental Table S2 and Figure 1**). For C1, the time to reach 50% of
133 the maximal incidence (TM50) in MP3 and in MP5 was closely similar between each other
134 (respectively 13.1 and 11.5 days) while mean TM50 for MP1 was higher with 26.1 days.
135 However 95% confidence intervals (CI_{95%}) of their TM50 overlapped. For C2, TM50s were
136 globally similar with 22.6, 25.5 and 27.4 days for MP5, MP1, and MP3, respectively. CI_{95%}
137 for these MPs did not overlap but were closely similar. For C3, TM50 of the three MPs were
138 globally similar to those of the preceding cycle, reaching 23.8, 24.3, 27.7 days for MP3, MP5,

Chapitre II – Partie 2

139 and MP1 respectively. For C4, TM50 was lower than C2 and C3, reflecting a slower disease
140 progression, with 26.3, 28.1 and 31.4 days for MP1, MP5 and MP3 respectively. Based on
141 CI_{50} , MP3 TM50 looked significantly higher than the others. For C5, TM50s were lower than
142 in the 3 preceding cycles with 17.2, 22.4 and 23.4 days for MP5, MP1 and MP3 respectively;
143 suggesting that disease incidence progressed faster in this cycle. The areas under the Disease
144 Progression Curves (AUDPC) were calculated for each microplot of each cycle and were
145 statistically compared using GLM adjustment and Tukey's t test (**Supplemental Table S2**
146 **and Table S3**). AUPDC sharply increased across cycles, with lowest AUDPC values for C1,
147 and significant differences across cycles, except between C4 and C5 ($p = 0.854265^{NS}$).
148 Collectively, these results suggest that E8 crop successions favored a dramatic increase in
149 disease incidence, and selected for an increased disease pressure by either multiplying
150 primary inoculum, or selecting adapted strains with increased aggressiveness.

151

152

153 *Disease symptoms progressed in patches*

154 Weekly disease scoring allowed visualizing spatial dynamic of disease appearance within our
155 experimental field. During C1 (2012), first symptoms appeared in different disease hotspots in
156 each microplot of susceptible eggplant (E8) one week after plantation. Then, the disease
157 seemed to spread by contamination of the nearest neighboring plants, surrounding the first
158 diseased plants. During the four other cycles however, dissemination patterns were different.
159 First, wilting symptoms appeared later: two weeks after plantation for C2, C3 and C4 and
160 three weeks after plantation for C5. Second, two patterns of symptoms spread were observed.
161 The same "stepwise contamination" pattern was observed, but we also observed several new
162 disease hotspots appearing independently of previously wilted plants. Wilting symptoms

163 seemed to spread along lines in the same hill to finally merge in larger foci (**Supplemental**
164 **Figure S1**).

165

166 **Influence of crop successions on the pathogen genetic diversity and structure**

167 *At the global field level, eggplant baits specific haplotypes and induces a general reduction of*
168 *diversity*

169 Hereafter, we mention ‘localization’ to qualify the geographical sampling point in our
170 experimental field, and ‘population’ as groups of strains sharing the same origin: habitat (soil,
171 rhizosphere and stem xylem vessels), cycle (C1 to C4), or microplot (MP1 to MP6). We
172 isolated a total of 1819 strains of *R. solanacearum* from two hosts, *S. lycopersicum* (C0,
173 n=319) and from *S. melongena* (C1, C2 and C4; n=1500 strains) (**Supplemental Table S4**).
174 Twenty-eight haplotypes were identified among the 319 strains isolated during C0 (with a
175 number of genotypes/number of strains ratio $[G/N] = 0.088$, **Table 1**). Within C1 collection,
176 223 strains were isolated among which 71 were extracted from resistant eggplant (latent
177 infection, E6) and 152 from susceptible eggplant (E8). Seventeen haplotypes were detected in
178 this collection ($G/N = 0.076$, **Table 1**), among which four were E6-specific, seven were
179 E8-specific and six were common to both accessions. Latent infections on resistant eggplant
180 were only detected during C1. While sampling effort during C2 and C4 was more important
181 than in C1 (n=684, 593 and 319, respectively), haplotypes number sharply decreased: 11
182 haplotypes were detected in C2 and 8 in C4 (with a respective $G/N = 0.016$ and 0.013 ,
183 **Table 1**). Five haplotypes appeared specific to the soil (H01, H02, H15, H17 and H18) and
184 three haplotypes were only detected in the rhizosphere (H32, H38 and H39) (**Supplemental**
185 **Table S5**). 26 haplotypes were only detected on the stem of plants but we cannot establish
186 whether they are stem-specific due to sampling bias (**Supplemental Table S5 and**
187 **Supplemental Figure 4**). Among the 46 haplotypes detected in our entire collection (**Figure**

188 **2 and Figure S4**), six haplotypes were only detected in C0 and C1 (H19 to H24), two were
189 common to C0, C2 and C4 (H25 and H26) and two haplotypes were only detected in C1 and
190 C2 (H36 and H37). Seventeen haplotypes were specific to C1 collection (H01 to H18), five to
191 C2 (H19 to H24) and four to C4 (H43 to H46). Notably, two haplotypes (H27 and H28) were
192 detected in all collections, at frequencies increasing over successive eggplant cycles (H27:
193 relative frequencies of 0.147, 0.224, 0.251 and 0.285 for C0, C1, C2 and C4 respectively;
194 H28: relative frequencies of 0.320, 0.470, 0.689, 0.658 for C0, C1, C2 and C4 respectively)
195 **(Figure 2, Supplemental Table S5 and Supplemental Figure 4)**. Analysis of the haplotype
196 network built on the whole dataset showed the existence of one major clonal complex (CC)
197 and four single haplotypes. This major CC grouped most of strains isolated during C0, C1, C2
198 and C4 and were extracted from different hosts: tomato, E6 resistant eggplant and
199 E8susceptible eggplant. Among the four singletons identified, haplotypes H12 and H16 were
200 composed of strains from C0, H29 grouped strains isolated from E8 during C1, and H45
201 gathered strains from C4. CC and host of origin were not clearly correlated. The highest
202 genetic diversity index (H.u.b) was obtained in C0 collection (H.u.b = 0.318), then in C1
203 (H.u.b = 0.251), followed by C4 and C2, with similar H.u.b (respectively 0.192 and 0.173)
204 **(Table 1)**. Overall, genetic diversity was low in our experimental field and tended to decrease
205 along successive eggplant cycles. Moreover, eggplant successions tended to induce a gain of
206 frequencies of two main haplotypes and the appearance of new haplotypes **(Figures 2 and**
207 **Supplemental Table 4)**.

208

209 *Haplotype composition shifting and diversity reduction are observed at the microplot level.*

210 The haplotype H27 was detected in MP1 and MP3 during all three cycles (C1, C2 and C4)
211 and only in the MP5 during C2. This haplotype was very frequent in MP3 with relative
212 frequencies of 0.53 for C1, 0.86 for C4 and 0.97 for C2. H28, the most abundant haplotype

Chapitre II – Partie 2

213 within our dataset, was detected in all MP at different frequencies, but was not detected in
214 MP3 from C1. Thirteen haplotypes were MP-specific for each cycle. Within C1, H29 and
215 H30 were specific to MP3, H31 was specific to MP6 and H33 was specific to MP4. Within
216 C2, H38 and H39 were MP5-specific. Within C4, H32, H40 and H43 were specific to MP1,
217 H45 to MP5 and H46 to MP3 (**Supplemental Table S5**).

218 Considering genetic diversity evolutions in each microplot, H.u.b for MP1 was higher in C1
219 (0.112) and lower in C2 and in C4 (respectively, 0.050 and 0.025) whereas the G/N ratios
220 were equivalent, varying from 0.022 (C1) to 0.036 (C4). For MP3, the highest H.u.b value
221 was obtained for C1 (0.172) then C4 (0.026) and finally for C2 (0.012), whereas G/N ratio
222 decreased over cycles (0.132, 0.026 and 0.018 for C1, C2 and C4 respectively). Genetic
223 diversity for MP5 was null for C1 because only one single haplotype (H36) was detected over
224 9 strains (**Supplemental Table S5**). H.u.b was similar for C2 (0.028) and C4 (0.030) while
225 G/N value showed opposite trends, being 0.111, 0.024 and 0.010 for C1, C2 and C4
226 respectively (**Table 1**).

227

228 *Genetic clustering analysis does not identify a clear differentiation across microplots, and*
229 *highlights the specificity of C0 and C1 collections*

230 To assess how the genetic diversity was structured in our dataset, we first performed a PCA,
231 then a DAPC. For PCA analysis, some individuals were removed as they were too involved in
232 the construction of an axis, thus biasing the analysis: (i) TM37.10, for C1, (ii) RQ26.07 and
233 RQ26.06 for C2; (iii) 9 individuals for C4. The first two PCA axes explained 46 % and 29 %
234 of the genetic variability for the C1, 93 % and 5% of the genetic variability for C2 and 63.5%
235 and 34% of the genetic variability for C4. Overall, variables were well represented either by
236 one or by both axes. For the three cycles, both CMmp0131 and CMmp0985 markers were the
237 most explicative variables while GMmp0266 was also an important variable for C2 and C4

Chapitre II – Partie 2

238 **(Supplemental Figure S2)**. PCA for C1, C2 and C4 showed that MP3 tends to differentiate
239 from the other microplots whereas MP1 and MP5 were genetically very close from each other
240 **(Supplemental Figure S3)**.

241 We then used Discriminant Approach of the Principal Component analysis (DAPC) to
242 investigate the cycle-related genetic structure of our collections of strains. The first axis of the
243 Discriminant analysis explained 92.8 % of the total variability among our dataset while the
244 second axis explained 7.2 % of the variability. When assuming 10 clusters ($k = 10$), DAPC
245 analysis grouped haplotypes into different clusters (cl) without splitting them **(Figure 2 and**
246 **Supplemental Table S4)**. No consistent correlation between cluster and microplot or between
247 cluster and localization in the field was observed. Cl05, cl06, cl08 and cl10 seemed to be
248 differentiated from cl01, cl02, cl03, cl04 and cl09 and also from cl07 but no variable seemed
249 to explain the differentiation between these clusters (Figure 3A). Three clusters (cl01, cl06
250 and cl09) were retrieved from all four cycles. The other clusters gathered strains from two
251 cycles (cl02 with strains from C2 and C4; cl03 with strains from C1 and C2), from three
252 cycles (cl05 with strains from C0, C1 and C2). Only the cluster cl04 was specific of C4, and
253 cl07, cl08 and cl10 specifically grouped strains isolated from C0 and C1 **(Figure 3B)**. When
254 DAPC was performed on each cycle or on each microplot separately, no consistent clustering
255 could be detected: the BIC value curve showed no elbow disruption and therefore no k means
256 **(Supplemental Table S4)**.

257 Yet, strains from C0 and C1 presented highly significant genetic differentiation with the other
258 cycles. Strains from C2 and C4 showed no differentiation between each other **(Table 2)**.
259 Depending of the MP considered, genetic differentiation was weakly to highly significant
260 between E8-isolated populations across cycles. E6-isolated populations were weakly or not
261 differentiated from the other populations **(Supplemental Table S6.2)**. Altogether these results
262 indicate the originality of the strains from C0 and C1.

263

264 *Species of isolation impacted the bacterial population structure, but eggplant resistance did*
265 *not*

266 Highly significant F_{ST} and R_{ST} were observed between strains isolated from tomato (C0) and
267 strains isolated either from resistant eggplant (E6 during C1) or from susceptible eggplant (E8
268 during C1, C2 and C4) (**Table 2**). However, F_{ST} and R_{ST} between E6-isolated and E8-isolated
269 collections were not significant. Moreover, AMOVA between different hosts
270 (resistant/susceptible eggplant) revealed that genetic diversity was distributed mainly across
271 and within plots, not across hosts (**Table 3**). Collectively this suggested that host of origin did
272 not seem to structure the genetic variability of the bacterial populations, though G/N values of
273 E6-isolated populations were all higher than those of E8-isolated populations on C1 (**Table**
274 **1**). Globally, no genetic differentiation was observed between strains from E6 (resistant
275 eggplant) and strains from E8 (susceptible eggplant) isolated during C1 ($F_{ST} = 0.01304^{NS}$ and
276 $R_{ST} = 0.00161^{NS}$) (**Table 2**). However, when analyzing at the microplot level (MP1 (E8) vs
277 MP2 (E6), MP3 (E8) vs MP4 (E6) and MP5 (E8) vs MP6 (E6)), results appeared to be more
278 complicated, because genetic differentiation varied across the microplot couples considered
279 (**Supplemental Table S6**). However, globally E6 MPs were not or weakly differentiated from
280 the others MPs cycle. AMOVA analysis revealed that genetic variability was mostly
281 distributed within microplots (60.73% with F_{ST} , 95.86% with R_{ST} , **Table 3**) but not across the
282 different eggplant accessions. F_{ST} and R_{ST} values between microplot populations of C1 were
283 not significant, except MP4-MP1 couple, MP2-MP5 couple and MP4-MP5 couple. Similar
284 results were obtained with AMOVA analysis performed on couple of MPs (resistant eggplant
285 MPs vs susceptible eggplant MPs) (**Supplemental Table S7**). Thus, host resistance did not
286 seem to influence the genetic structure.

Chapitre II – Partie 2

287 At the cycle level, C0, C1 and C4 populations were in highly significant linkage
288 disequilibrium (LD) while C2 population LD was not significant. LD estimators for C2 were
289 negative but since I_A and r_{barD} are normally distributed around zero, we can conclude to a
290 zero value for I_A and r_{barD} . Therefore, C2 population may have experienced recombination
291 events. At the microplot scale, LD was not significant for MP1 and MP3 of C1; MP1 and
292 MP5 of C2 and MP1 of C4 (**Table 4**) with I_A and r_{barD} value negative most of the time. For
293 the other MP of each cycle, LD estimators and/or p -value associated could not be calculated,
294 because the genetic diversity and the number of haplotypes were too low to properly calculate
295 I_A and r_{barD} . Analysis of locus pairwise LD indicated that at the global scale (cycle), as well
296 as at the microplot scale, pairs of loci in LD were always the same over cycles
297 (CMmp013::CMmp0985; CMmp0131::GMmp0266 and CMmp0985::GMmp0266)
298 (**Supplemental Table S8**).

299

300 *Host plants do not select bacteria during penetration in the plant*

301 When comparing strains from different habitats, genetic differentiation index revealed that
302 bacterial populations isolated from soil were significantly differentiated from populations
303 extracted from rhizosphere ($F_{ST} = 0.08865^{***}$ and $R_{ST} = 0.22951^{***}$) and from stem ($F_{ST} =$
304 0.08516^{***} and $R_{ST} = 0.16477^{***}$) (**Table 5.A**). However, bacteria isolated from stems and
305 those extracted from rhizosphere showed no - or few - genetic differentiation ($F_{ST} =$
306 0.00358^{NS} and $R_{ST} = 0.00854^*$). When combining habitat and cultivars, populations isolated
307 from soil and from tomato stem were not significantly different ($F_{ST} = 0.01193^{NS}$ and $R_{ST} = -$
308 0.00143^{NS}), which is consistent with the hypothesis that tomato is a poorly selective host
309 (**Table 5.B**). Considering the populations isolated from different habitats within eggplant,
310 results were more contrasted. Indeed, on resistant eggplant E6, populations extracted from
311 rhizosphere were significantly different from populations extracted from stem

Chapitre II – Partie 2

312 ($F_{ST} = 0.59177^{***}$ and $R_{ST} = 0.23399^*$) (**Table 5.B**). Stem and rhizosphere populations from
313 susceptible eggplant (E8) were moderately significantly differentiated in C1 ($F_{ST} = 0.05529^*$
314 and $R_{ST} = 0.06064^{**}$) while highly differentiated or not in C2, depending on the estimator
315 considered ($F_{ST} = 0.00898^{NS}$, but $R_{ST} = 0.01809^{***}$) (**Table 5.B**). However this analysis,
316 encompassing the entire strain set, might have combined or confused respective effects of
317 “habitat” and “microplot” on the genetic differentiation. Therefore, we performed analysis on
318 “coupled populations”, defined here as populations extracted from either stem or rhizosphere
319 of the same localization in the field (same sample point). The analyses of eight coupled
320 populations showed no significant differentiations in five couples, but significant
321 differentiation was observed for D10 ($F_{ST} = R_{ST} = 0.82822^{***}$), K36 ($F_{ST} = R_{ST} = 0.22545^*$)
322 and Q26 ($F_{ST} = 0.07699^*$ and $R_{ST} = 0.06557^*$) (**Table 5.B**). AMOVA performed on “coupled
323 populations” from the same microplot (but from different cycles) showed that significant
324 genetic variability was found among individuals within localization habitats rather than
325 between “coupled populations” (**Supplemental Table S9**). AMOVA performed between
326 strains from the same microplot but from different cycles (and subdivided by habitat) also
327 showed that genetic variability was distributed among individuals within habitat (89% or 92%
328 for MP1 and 61% or 67.6% for MP3; **Supplemental Table S10**), thus indicating that habitat
329 was not a structuring factor of the genetic variability. This last AMOVA analysis was not
330 performed on MP5 populations because no strains were extracted from MP5 during C1.

331

332 *Spatial structure of the microplot populations estimated by isolation by distance*

333 The IBD measured for C0 on the whole field was significant considering F_{ST} , but not
334 significant considering R_{ST} . For C1, no significant IBD was observed, whereas in the
335 consecutive eggplant cycles, genetic distances and geographical distances were increasingly
336 correlated, suggesting that IBD significance increased with crop successions.

Chapitre II – Partie 2

337 Considering each separate microplot, results seemed more contrasted. For C1, no significant
338 IBD was observed at the microplot scale. For C2, IBD for each microplot was not significant
339 except for MP3 considering F_{ST} indicator. IBD for each microplot of C4 were not significant
340 except for MP1 (**Supplemental table S11**).

341

342 **Virulence assay**

343 In order to investigate if strains extracted from C2 were more virulent than strains extracted
344 from C1, we inoculated strains from each cycle on susceptible host twice (hypothesis 1).
345 Susceptible eggplants (E8) inoculated with C1 strains showed a mean percentage of wilting
346 (W) and a mean colonization index (CI) between 9 to 100% while strains from C2 had a mean
347 W and a mean CI between 33 and 100%. Analysis of variance on disease incidence of four
348 strains common to the two experiments (exp) showed highly significant differences between
349 experiments 1 and 2 ($p = 8.51 \cdot 10^{-5***}$) thus leading us to analyze results one experiment at a
350 time (**Supplemental table S12 and S13**). The mean W, CI and AUDPC values were higher
351 on C1 compared to C2. However, analysis of variance showed that the “strain” factor had a
352 weak effect ($p = 0.014^*$ for exp1 and $p = 0.028^*$ for exp2), whereas crop cycle of origin had
353 no significant effect on the AUDPC in both experiments ($p = 0.242^{NS}$ for exp1 and $p =$
354 0.207^{NS} for exp2). Thus, from our data, susceptible eggplant successions may not select for
355 more aggressive *R. solanacearum* strains.

356 To assess whether the resistant eggplant E6 selected for strains better adapted to this cultivar,
357 we performed assays to compare virulence and aggressiveness of E6-isolated strains on both
358 resistant (E6) and susceptible (E8) eggplants (hypothesis 2). Our hypothesis was that strains
359 that succeeded in infecting E6 have experienced a trade-off in aggressiveness on the
360 susceptible E8. Neither trial nor strains effect were detected between the two experiments ($p =$
361 0.1511^{NS} and $p = 0.6905^{NS}$). E6-isolated strains induced mean W and CI values between 0 to

Chapitre II – Partie 2

362 41% on E6, but were also very aggressive on E8, inducing mean Wilting and CI values
363 between 66.7 to 100%, depending on the strains inoculated. For E6-isolated strains inoculated
364 on both resistant (E6) and susceptible eggplant (E8), ANOVA analysis on disease incidence
365 and AUDPC showed highly significant differences between resistant cultivar and susceptible
366 one ($p = 2.10^{-16***}$). These results suggested a strong effect of the resistant cultivar on our
367 strains. Looking specifically at the aggressiveness on E8, E6-isolated strains induced mean
368 wilting, CI and AUDPC of 85.22%, 90.15% and 1529.54 respectively, whereas E8-isolated
369 strains induced lower values (77.85%, 78.94% and 1389.47 respectively) (**Supplemental**
370 **table S12**). Statistical analysis on mean wilting and AUDPC data revealed highly significant
371 differences between E6-isolated strains and E8-isolated strains (respectively $p = 2.10^{-16***}$
372 and $p = 2.10^{-16***}$), showing a higher aggressiveness of E6-isolated strains on susceptible
373 eggplant than of E8-isolated strains.

374

375 **4. Discussion**

376 *The eggplant E6 resistance was durable and had a strong effect on bacterial population*

377 In order to investigate the impact of a resistant eggplant carrying the resistant gene *ERs1*
378 (Lebeau et al., 2012) on a field population of *R. solanacearum*, we set up a 3 years
379 experimental evolution trial with both resistant (E6) and susceptible (E8) eggplant. To do so,
380 we took advantage of a naturally infested field with *R. solanacearum* phylotype I (Poussier,
381 2000) (Guinard et al., 2015a), in which wilting on E6 was previously observed (N'Guessan et
382 al., unpublished results 2009). Disease incidence was extremely different between the two
383 cultivars, E8 being increasingly infested and wilted whereas E6 showed no wilting symptoms.
384 Indeed, one of the most interesting finding of this study was that no resistance breakdown was
385 observed for E6 over the five crop cycles successions. We could expect a fast breakdown of
386 E6 resistance as single dominant resistance genes are often quickly overcome by the pathogen
387 (Leach et al., 2001), but in our experiment, E6 resistance was durable and we can hypothesize
388 that fitness cost (Crow, 1986) for *R. solanacearum* to overcome *ERs1* might be very
389 important. Interestingly, strains inducing latent infections in the field were actually able to
390 wilt E6 in controlled conditions, indicating that they have the ability to overcome *ERs1*
391 resistance but do not express this ability in the field, or that field conditions are more
392 favorable to the plant host than laboratory conditions (Reznick and Ghalambor, 2005), which
393 contribute to global host resistance.

394 Another interesting finding was that resistant eggplant E6 harbored isolable and culturable
395 strains from latent stem infections during C1, but these isolates were not genetically
396 differentiated from the E8-infecting isolates. Surprisingly, no isolates were ever detected in
397 following E6 crop cycle successions, neither in the stem nor in the rhizosphere. After five
398 crop cycles, we sampled the soil in E6 microplots at locations where latent infections were
399 found in C1. The population levels were very low or under the detection threshold of our

Chapitre II – Partie 2

400 method. Over 13 samplings, no isolates were detected on four soil-samples and mean bacterial
401 population was detected on nine samples at Log 1.03.g⁻¹ of soil (data not shown). E8
402 microplots soils were sampled at the same time, revealing that they were infected by more
403 than one more magnitude (mean: Log 2.45. g⁻¹ of soil, data not shown). These findings lead us
404 to hypothesize that E6 may suppress *R. solanacearum* populations by a pre-infection
405 mechanism, thus reducing infectious population size. Such reduction may have promoted
406 genetic drift (McDonald and Linde, 2002), or have prevented any appearance of new virulent
407 variants by reducing the number of mutation and recombination events. Several hypotheses of
408 biochemical and biological mechanisms could be formulated to further investigate this
409 phenomenon. In the soil, it is widely known that some somatic plant cells known as root
410 border cells (BC) or root border-like cells (BLC) have the ability to produce specific
411 biochemical molecules that can dramatically alter the behavior of populations of soil-borne
412 microflora (Hawes et al., 2000). In the presence of a pathogen, BC and BLC are detached
413 from the root cap and export molecules such as antimicrobial enzymes, including chitinase,
414 peptidase, and glucanase (Wen et al., 2007) (Wen et al., 2009). These cells have been shown
415 to play a major role for *Pisum sativum* against *Nectria haematococca* (Gunawardena et al.,
416 2005), for *Arabidopsis thaliana* and flax against *Bacillus subtilis* (Plancot et al., 2013) and
417 for tomato and potato against *R. solanacearum* (Koroney A. S, 2015). Moreover, root
418 exudates might play an important role in plant defence to *R. solanacearum* (Poussier, 2000).
419 Indeed, on tobacco, root exudates of resistant plants contained less acids, oxalic acid, malic
420 acid, citric acid, and succinic acid leading to less attraction than the susceptible tobacco plants
421 (Wu et al., 2015). Other molecules might be involved in plant-pathogen interaction in the
422 rhizosphere such as arabinogalactan (APGs) (Nguema-Ona et al., 2013). Recent studies
423 suggested that AGPs play a crucial role at several stages of plant-pathogens interaction,
424 including root colonization, repelling or attraction of soil microbes (Nguema-Ona et al., 2013)

Chapitre II – Partie 2

425 (Plancot et al., 2013). Thus, the role of E6 root exudates in the resistance to *R. solanacearum*
426 may be a promising prospect. Recruitment of antagonists or beneficial microbe populations in
427 the soil (i.e. plant growth-promoting bacteria) might also be another biological explanation for
428 inoculum reduction as *R. solanacearum* is not a good competitor in the soil (Sequeira, 1998).
429 This hypothesis could be assessed by using metagenomics approach for instance, which could
430 provide a cultivation-independent assessment of the soil microbial communities composition
431 and dynamics (Daniel, 2005).

432

433 *Susceptible eggplant successions influence bacterial population structure*

434 The crop successions of susceptible eggplant E8 induced a sharp increase of disease incidence
435 and severity over the cycles, confirming the well-known deleterious effect of crop
436 monocultures on soil health and soil-borne disease pressure (Garbeva et al., 2004). One
437 interesting output of this study is that this susceptible accession (E8), being *a priori* a poorly
438 selective host, yet induced a significant bacterial population shift suggesting selection. Indeed,
439 susceptible eggplant successions induced a significant decrease in population genetic diversity
440 combined with the increase in frequency of two main haplotypes, in all three microplots
441 separately. This phenomenon, spectacular during the first cycles, led us to hypothesize that
442 eggplant selected for locally adapted genotypes. Local adaptation is defined as “the enhanced
443 performance on sympatric host populations” (Morand, 1996). This evolutionary process
444 implies a high *fitness* of the local pathogen against foreign hosts (Gandon and Van Zandt,
445 1998). From our controlled pathogenicity tests however, the C2 strains did not significantly
446 gain in aggressiveness and infectiveness (this last factor was measured by Internal Growth
447 Curves, data not shown) compared to strains isolated in C1. Thus, it seemed that this
448 increased global incidence may be more likely due to the increase of the soil inoculum level.
449 Our study also demonstrated that the host plant did not seem to select strains for stem

Chapitre II – Partie 2

450 infection and colonization (referred here as “filter effect”). Most haplotypes found in plant
451 rhizosphere were also found in the stem and haplotype diversity was more important in the
452 stem than in the rhizosphere (**Supplemental table S5**). If filter effect would have occurred,
453 we would have found more haplotypes specific to the rhizosphere than to the stem. The
454 decreasing level of G/N over cycles, the rise of two major haplotypes and the significant
455 linkage disequilibrium values raise the picture of an increasing clonal population completely
456 invading the three microplots.

457 Approximate Bayesian Computation approaches aim to estimate demographic evolutionary
458 scenario. Such approach would be interesting to use to infer the impact of E8 crop successions
459 on population efficient size (N_e), to know whether N_e level remains the same or decreases.

460 This study also allowed us to learn more about epidemic progression at the field scale.
461 Spatio-temporal progression of disease incidence on susceptible eggplant (E8) suggested that
462 in the first eggplant cycle, few disease hotspots appeared at the same time in the field, then
463 seemed to disseminate through neighboring plants. However, disease progression in the
464 following eggplant cycles showed different dispersal patterns with hotspots appearing one
465 after another. Finally, all disease hotspots seemed to coalesce. This host-to-host dissemination
466 has already been observed and statistically demonstrated for *R. solanacearum* in the
467 United-States (Wimer et al., 2011) and in New Zealand (Kelman, 1954). Roots contact
468 between plants might have helped bacteria to disseminate from contaminated plant to healthy
469 plant, thus infecting the entire microplot.

470 Looking to spatial structure of genetic diversity, evolution of Isolation-By-Distance suggested
471 that gene flow occurred during the first cycle of eggplant (no significant IBD) then became
472 less important. However, gene flow within microplots seemed to be important for most of
473 them (excepted for C2MP3 and C4MP1).

474

Chapitre II – Partie 2

475 *Low field genetic diversity may be due to VNTR markers, but also to actual monomorphism of*
476 *this population*

477 The level of genetic diversity that we revealed in this study was rather low. Most of our loci
478 gave only two to five alleles, except Ymp0875 (7 alleles) and GMmp0266 (11 alleles). Total
479 allelic richnesses per populations (cycles) were low (1 to 2.71), compared to the few data
480 available on field populations of plant pathogenic bacteria: *Xylella fastidiosa* in citrus
481 vineyards (3.02 to 3.55) (Coletta-Filho et al., 2011), *Xanthomonas citri* pv.*citri* in Vietnam (3
482 to 6.05 (Verniere et al., 2014)) and in Burkina and Mali (2.71 to 5.86 (Leduc et al., 2015)).
483 Indeed, very few studies focus on population genetic of plant bacteria at the field level.
484 Looking at *Erwinia amylovora* phylogeography and genetic structure (Bühlmann et al., 2014),
485 authors also identified a low genetic diversity on isolates from a single infected tree,
486 confirming that genetic diversity at small-scale is low for plant pathogenic bacteria.

487 This low diversity leads us to formulate two hypotheses. The first hypothesis concerns our
488 VNTR markers that may not be polymorphic enough at the field scale, even though we found
489 variability within a single soil sample from Martinique (Guinard et al., 2015a). We could
490 increase the number of VNTR markers, following the trend of MLVA schemes developed on
491 *Xanthomonas* species (14 loci for example (Pruvost et al., 2014)), thank to *in silico* screening
492 of new phylotype I genomes recently published (Cao et al., 2013) (Ramesh et al., 2014) (Shan
493 et al., 2013) and soon published (Guinard et al., 2015b). We also cannot exclude that our
494 VNTR markers may not evolve rapidly enough in *R. solanacearum* populations within the
495 time frame we studied. Nevertheless, VNTR markers are subject to two main problems
496 biasing the divergence time and gene flow estimation (Morin et al., 2004) : the high mutation
497 rate leading to homoplasy (Estoup et al., 1995) and the difficulty to understand the mutation
498 model (Kalinowski, 2002). By contrast, SNP are abundantly present in genomes species and
499 evolved following a simple mutation model well established (Vignal et al., 2002). These

Chapitre II – Partie 2

500 characteristics make them interesting tool for population genetic studies such as estimating
501 genetic variation (Vignal et al., 2002), analyzing population structure and size (Morin et al.,
502 2004), investigating route of invasion (Chen et al., 2002; Leduc et al., 2015) and studying
503 microevolution (Aziz and Nizet, 2010). Given the number of phylotype I genomes actually
504 available in databases (6 according to NCBI and 8 more to come), it may be valuable to
505 develop SNP markers.

506 The second hypothesis we considered is that the population we sampled is actually very
507 monomorphic and clonal, and that we might not have sampled the whole diversity of *R.*
508 *solanacearum* in our field. Dunn et al. (Dunn et al., 2014) had a similar conclusion when they
509 studied haplotypes obtained by *in vitro* crosses between two field strains population of the
510 oomycete *Phytophthora capsici* and realized that these haplotypes were not found in the field.
511 We sampled different habitats, but we only considered the infectious fraction of inoculum
512 which was able to grow on agar medium. We cannot exclude that it may exist a larger viable
513 but non culturable population of *R. solanacearum* in our field (Grey and Steck, 2001),
514 unsampled by our approach. MLVA amplification of DNA directly extracted from plant
515 symptoms, without an intermediate step of culture on agar media, might be a promising
516 prospect.

517

518 *A first experimental evolution approach leading to implementation of durable resistance*
519 *management and cultivar mixtures for soil-borne pathogens*

520 Our results, showing host-to-host spread of the disease, suggest that cultivar mixture would be
521 an adapted way to control the spread of bacterial wilt. Indeed, mixing host presenting
522 different levels of resistance would reduce the occurrence of disease development and lower
523 the evolution of the population of pathogen (Lannou and Mundt, 1997) (Marshall, 1989). This
524 strategy has already been used with success against fungi pathogens (Garrett and Mundt,

525 1999) (Finckh et al., 2000) (Mundt, 2002) but the lack of willingness for the application of
526 this technic has hampered its use (Zhan and McDonald, 2013). In the light of our results, E6
527 seems also to be a promising cultivar for ground cleaning by significantly reducing the
528 population size of *R. solanacearum*. Cropping E6 or eggplant cultivars carrying different
529 sources of resistance may thus be successful combined with bacterial wilt-suppressive crops,
530 such as *Crotalaria spectabilis*, *Raphanus sativus* and *Allium fistulosum* (Deberdt et al., 2012;
531 Deberdt et al., 2015).

532

533 3. Experimental Procedures

534 Plant material and experimental field

535 “Farmer 209”, a tomato cultivar (*Solanum lycopersicum*) highly susceptible to bacterial wilt
536 (AVRDC, 2004, 2005), was firstly used in this study. Then, two eggplant accessions were
537 cropped. AG91-25, coded E6 hereunder, carries the major dominant resistance gene *Ers1*,
538 conferring high-level resistance to some *R. solanacearum* phylotype I strains (Lebeau et al.,
539 2012). MM738, coded E8 hereafter, is highly susceptible to all phylotypes of
540 *R. solanacearum* (Lebeau et al., 2011). Plants were sown on potting mix (9x9 cm pots) and
541 grown 4 weeks in insect-proof greenhouse before being transplanted directly into the field “Le
542 Vallon”, within the ‘Ligne Paradis’ experimental station of CIRAD (21°S, 55.3°E) (Saint
543 Pierre, Reunion Island, France) at an elevation of 140 meter above the sea level. Previous
544 studies showed that this field was naturally infected with *R. solanacearum* phylotype I strains
545 (Poussier, 2000) (Guinard et al., 2015a) (N’Guessan et al., unpublished data 2009).

546

547 Experimental design and sampling effort

548 *Field design*

Chapitre II – Partie 2

549 A first two months tomato cycle ('Farmer 209') was planted in the field 'Le Vallon' in order
550 to (i) multiply the natural inoculum present in our experimental field, (ii) detect the most
551 important disease hotspots in which we planted microplots of eggplant and (iii) collected
552 strains on this host plant exerting no – or few – selective pressure, to assess genetic diversity
553 and structure of stem and soil isolates of *R. solanacearum*.

554 The experimental field was constituted of 9 hills of one meter width, spaced of 1.2 m between
555 each other and covered with black plastic canvas sheets. Two lines of 100 plants (figured as
556 columns on **Table S1**) were implanted in each hill (named A to R). The line
557 (column)-distance between plants of the same line was 40 cm. However, the row-distance
558 between plants varied: 80 cm between plants of the same hill, and 120 cm between plants of
559 adjacent hills. This tomato crop cycle was named "cycle 0" (C0). Inside the three main
560 disease hotspots identified, three microplot couples were delimited, consisting of one resistant
561 E6 eggplant microplot and one susceptible E8 eggplant microplot. Each microplot consisted
562 of 52 plants distributed in 13 plants long and 4 plants per row (thus covering 2 hills). Each
563 microplots were 4.80 meters long and 2.80 meters wide. Eggplant crops were planted twice a
564 year during three years, corresponding to five eggplant cycles (C1 to C5) each cycle lasting
565 three months (**Supplemental Table S1**).

566

567 *Sampling strategy*

568 Very few studies are available in the international literature concerning sampling strategies
569 for estimating the actual soil infestation by *R. solanacearum*. Studies mainly focused on
570 non-spatialized sampling (Poussier, 2000; Grover et al., 2006) or were contradictory on the
571 best sampling strategy between diagonal, X or W sampling (Tavares et al., 2000). Following
572 (Pradhanang, 1999) and (Lin et al., 2009), we decided to use a "double W" sampling plan.
573 Indeed, for a small cultivated field such as "Le Vallon", systematic "double W" sampling is

Chapitre II – Partie 2

574 adapted because it better represents the entire genetic diversity in the field (Huising et al.,
575 2008). During the tomato cycle (C0), a systematic “double W” sampling was realized in the
576 entire field (28 sampling points) on the vascular tissue of wilted plants or on soil when plants
577 were missing (death not caused by *R. solanacearum* attack). During the successive eggplant
578 cycles, E8 susceptible eggplants presenting wilting symptoms and positioned on the “double
579 W” were sampled, and 10 to 20 bacteria were extracted per plant following the protocol
580 previously described (Zhan et al., 2008). For E6 resistant eggplants, if no wilting was
581 observed during the crop cycle, a systematic sampling was realized at the end of the cycle to
582 search for latent infections, defined as symptomless plants being colonized by the bacteria
583 (Prior et al., 1990; Skoglund et al., 1992). For eggplants dead just after field plantation or
584 whose mortality during the crop cycle was not due to the bacterial infection, we considered
585 that they had no consequences on the soil bacterial population, and were thus not sampled
586 again. Plants were watered 5 minutes per hour thanks to a trickle irrigation system.
587 To test the hypothesis of a plant-scaled “filter effect” for penetration of the bacteria in the
588 plant, we decided to sample rhizosphere or soil as well as the vascular tissue of the plant (the
589 stem) during the cycle 1 and cycle 2.

590

591 **Bacterial strains culture, DNA extraction and genotyping.**

592 Bacterial strains were extracted either from stem, soil or rhizosphere of plants as previously
593 described (Poussier, 2000) (N'Guessan et al., 2012) (Guinard et al., 2015a). Molecular
594 identification of the *R. solanacearum* species complex and determination of the phylotype
595 were performed using multiplex PCR (mxPCR) on bacterial suspensions of morphologically
596 presumptive *R. solanacearum* colonies ($\sim 10^8$ cells.mL⁻¹ in HPLC water), as previously
597 described (Fegan and Prior, 2005) (N'Guessan et al., 2012). PCR products were then
598 separated by electrophoresis on 2% agarose gels, and checked for correct amplification of

Chapitre II – Partie 2

599 both the 280 bp-*R. solanacearum* specific fragment and the phylotype specific DNA
600 fragment. DNA of positive colonies was extracted using Wizard[®] Genomic DNA purification
601 kit (Promega, Fitchburg, Wisconsin, United States of America), following the manufacturer's
602 instructions. Bacteria were then stored in 20% glycerol at -80°C.

603 Strains were genotyped using the MLVA-8 scheme previously developed in our team
604 (Guinard et al., 2015a). Over our field strain collection, the VNTR locus GMmp0133
605 (Guinard et al., 2015a) presented a continuum of fragment size values, which prevented us to
606 assign unambiguously allele sizes to tandem repeat (TR) numbers. We therefore decided to
607 remove this locus from our dataset and will refer to this scheme as “MLVA-7”. Multiplexed
608 primers and PCR reactions were performed as previously described (Guinard et al., 2015a).
609 PCR product electrokinetic separation was realized using an ABI PRISM 3130XL sequencer.
610 Fragments size were analyzed using GeneMapper v4.0 (Applied BioSystems) and
611 subsequently converted in TR numbers, rounding any incomplete TR number to the next
612 superior integer.

613

614 **Infection assay in controlled conditions.**

615 We tested a first hypothesis that the increase in incidence and severity observed between
616 cycle 1 and cycle 2 was due to the increase in strain aggressiveness between cycle 1 and
617 cycle 2. We thus selected five *R. solanacearum* strains extracted from susceptible eggplant
618 (E8) during cycle 1 and five strains isolated from susceptible eggplant (E8) during cycle 2.
619 These 10 strains were representative of the most prevalent haplotypes (H) in each cycle.

620 We tested a second hypothesis that during cycle 1 the E6 resistant eggplant selected for strains
621 that were specifically adapted to this cultivar. Therefore, we investigated whether strains
622 extracted from E6 latent infections were less aggressive on E8 than strains isolated from E8.
623 Five strains isolated from E6 latent infections were then inoculated on the resistant eggplant

Chapitre II – Partie 2

624 E6 and on the E8 susceptible one. For inoculation, strains were taken out from glycerol stock
625 and put in nutritive broth for 24h at 28°C, shaken at 120 rpm. Strains were then streaked on
626 Kelman media and harvested 48h later for inoculation by flooding plates with 5 mL of Tris
627 buffer. Bacterial suspensions were determined by measuring optical density (OD₆₀₀) and
628 diluted at $\sim 10^8$ CFU.mL⁻¹ for inoculation on four weeks-old plants corresponding to 3 to 4
629 fully expanded leaves stage. For the first hypothesis, each strain was inoculated twice on 12
630 E8 susceptible eggplants and 12 E6 resistant eggplants (two replicates per strain and host)
631 while for the second hypothesis, 12 E8 susceptible eggplants were inoculated twice with each
632 strain (two replicates per strain). Inoculated plants were incubated for 28 days in a growth
633 chamber, with a relative humidity of 80%, a photoperiod of 12h/12h and a thermoperiod of
634 30°C/25°C day/night.

635

636 **Disease assessment**

637 Disease development was scored once a week for the field trials and every two days for
638 experiments in controlled conditions, using the symptoms scale (Lebeau et al., 2011) in which
639 0: plant without symptom, 1: one leaf wilted, 2: 30% of the plant wilted (usually 2 leaves), 3:
640 at least 50% of the plant wilted and 4: plant entirely wilted. The percentage of wilted plants
641 (score 3 and 4) was calculated at each scoring date. In order to compare the disease
642 development across microplots, incidence data were adjusted to different models predicting
643 the probability to shift from asymptomatic to symptomatic state (P) over time (DAI for Day
644 After Implantation). The non-linear adjustment method used correspond to the function
645 $P = f(A \times (DAI - B) + K_{50})$, where A is the slope value for the nonlinear regression model, B
646 (also known as “TM50”) is the time necessary to reach 50% of the maximal incidence P
647 (expressed in probability from 0 to 1), f is the link function that will give the best adjustment
648 and K₅₀ is a constant associated to the link. Four f functions (logit, loglog, cauchit and probit)

Chapitre II – Partie 2

649 were tested using the *nlme* package implemented in R software v. 3.2.0 (R, 2010). The Akaike
650 Information Criterion (AIC) and Bayesian Information Criterion (BIC) were used to estimate
651 the quality of the adjustment of each function. These criteria consider the best compromise
652 between model complexity (number of parameters) and quality of the adjustment (realized by
653 the nonlinear model using Generalized Least Squares (GNLS)).

654

655 **Analysis of the genetic diversity**

656 For each microplot (MP) of each cycle, the strains affiliation to haplotype, the ratio number of
657 genotypes over number of strains (G/N), allele number and frequency, and Nei's unbiased
658 diversity index (H.u.b ; (Nei, 1978)) were calculated using GenAlex software v6.5 (Peakall
659 and Smouse, 2006, 2012). Private and total allelic richness, defined as the mean number of
660 alleles per locus per populations, was calculated using HP-RARE version 1.0 (Kalinowsky et
661 al., 2005).

662

663 **Analysis of the population genetic structure**

664 Haplotype networks were reconstructed by Minimum Spanning Tree (MST) using PhyloViZ
665 v1.0 (Francisco et al., 2012), at the global scale and within each microplot across cycles. This
666 analysis allows identifying clonal complexes (CC, defined as groups of strains differing by
667 only one locus variant), as well as founder haplotype(s) of these CC. It also allows visualizing
668 haplotypes differing from the founder haplotype by one locus (Single Locus Variant or SLV),
669 two loci (Two Locus Variant or TLV) or more.

670 Genetic differentiation among populations was estimated using the population pairwise F_{ST}
671 and R_{ST} under the null hypothesis that there is no difference between populations (1000
672 permutations, $\alpha = 5\%$). Calculations were realized by computing distance matrices on
673 haplotype data using Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010). The distribution of

Chapitre II – Partie 2

674 Molecular Variance between and within populations was evaluated by AMOVA using
675 Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer, 2010). To perform this analysis, groups of
676 populations were defined depending on the hypothesis we tested (filter effect of the host plant
677 on bacterial populations, effect of the genetic background of the plant on these populations).
678 Genetic structure and differentiation were also analyzed using Principal Component Analysis
679 (PCA) and Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC). The total genetic
680 variability within a dataset can be decomposed by the simple model $VAR(X) = B(X) + W(X)$
681 where X is the data matrix, VAR (X) is the total variance in our dataset, B(X) is the variance
682 between populations and W(X) is the variance within populations. PCA approach mainly
683 focuses on the total variance (VAR(X)) while DAPC optimizes the variance between
684 populations B(X) while minimizing the variance within populations W(X) (Jombart et al.,
685 2010). Both multivariate analyses were performed using ‘*adeigenet*’ package (Jombart, 2008)
686 implemented in the R software v. 3.2.0 (R, 2010). In DAPC analysis, data is first transformed
687 using a principal component analysis (PCA) and subsequently clusters were identified using
688 discriminant analysis (DA). The “find.cluster” function implemented in ‘*adeigenet*’ package
689 (Jombart, 2008; Jombart et al., 2010) in R software v. 3.2.0 (R, 2010) was used to determine
690 the number of clusters, k. BIC value allowed choosing the best k mean after 20 independent
691 runs as proposed by (Pruvost et al., 2014).

692 To test whether recombination signatures can be detected within our populations, we
693 estimated the multilocus linkage disequilibrium (LD) and locus pairwise LD within each
694 microplot population, by calculating association index (I_A and r_{barD} , p -value obtained after
695 1000 permutations), using the ‘*poppr*’ package (Kamvar and Grünwald, 2013; Kamvar et al.,
696 2014) implemented in R software v. 3.2.0 (R, 2010).

697

698 **Spatial genetic structure**

Chapitre II – Partie 2

699 To estimate the spatial structure of genetic diversity within the field, we assessed the Isolation
700 By Distance (IBD), based on the concept that genetic distance increases with the geographic
701 distance (Wright, 1949). X and Y coordinates were therefore determined for each plant by
702 transposing “Le Vallon” field into an orthonormal base, whose coordinates 0, 0 correspond to
703 the location A-2 (**Table S1**), and taking into account the row- and column-distances between
704 plants described above. These coordinates allowed us to calculate geographical Euclidean
705 distance between populations using GenAlEx v 6.5 (Peakall and Smouse, 2006, 2012). The
706 half-matrix of geographic distances was then tested for correlation with the half-matrix of
707 genetic distances calculated using Arlequin v3.5. (Genetic distance corresponds to Stalkin’s
708 distance : $F_{ST}/1-F_{ST}$ (Excoffier and Lischer, 2010)). The correlation between the two matrices
709 was tested using a Mantel test with 1000 randomizations, using the IBDWS website
710 (<http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>). One dimension-IBD (geographic distance) and two
711 dimensions-IBD (decimal logarithm of geographic distance) were considered (Rousset, 1997).
712 IBD was tested for each cycle independently and for each microplot. Linear regression was
713 then calculated using R software (R, 2010).

714

715 **Acknowledgements:**

716 We thank Edith Lallemand-Mamosa, Sylvain Lebon and Jean-Michel Baptiste for their
717 excellent technical support. We are grateful to Sandrine Lesquin and Agathe Allibert for
718 significant help with non-linear adjustment method and for ANOVA analysis. Jeremy
719 Guinard’s PhD thesis was financially supported by a joint grant from CIRAD and the
720 University of la Réunion, by the projects “GENETOM3” and “BSV2.1” (FEDER projects
721 financed by European Union and Région Réunion), and by the CASDAR project
722 RESAUBER (“Sustainable management of eggplant resistances to bacterial wilt”, French
723 Ministry of Agriculture).

Chapitre II – Partie 2

Table 1. Summary statistics for the different collections of strains, based on our MLVA-7 scheme. (S) and (R) = susceptible and resistant, N = number of strains, b: G/N ratio of the number of genotypes/number of strains, Na = Number of alleles; I = Shannon's information index; H.u.b = Nei's unbiased diversity index. All statistics were calculated with GenAlex v. 6.5. (Peakall and Smouse, 2006, 2012) except allelic richness, which was calculated using HP-RARE version 1.0 (minimal sample size = 14 genes).

Host	Cultivar	Microplot	Year	Cycle	N	Number of haplotypes	G/N	Mean Na	I	H.u.b	Allelic richness Private	Allelic richness Total		
<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer (S)	-	2012	C0	319	28	0.088	4.429	0.543	0.318	1.82	1.82		
	E8 (S)	MP1	2012	C1	90	2	0.022	2	0.211	0.112	0.02	0.02	1.5	
			2013	C2	225	8	0.036	1.571	0.104	0.05	0.01	0.01	1.27	
			2014	C4	205	5	0.024	2	0.06	0.025	0.11	0.11	1.14	
			2012	C1	53	7	0.132	2.143	0.305	0.172	0.33	0.33	1.69	
	E8 (S)	MP3	2013	C2	167	3	0.018	1.429	0.03	0.012	0	0	1.07	
			2014	C4	195	5	0.026	1.571	0.143	0.079	0	0	1.34	
	<i>Solanum melongena</i>	E8 (S)	MP5	2012	C1	9	1	0.111	1	0	0	0	0	1
				2013	C2	292	7	0.024	1.857	0.066	0.028	0.04	0.04	1.16
				2014	C4	193	2	0.01	1.429	0.067	0.03	0.16	0.16	1.18
E6 (R)		MP6	2012	C1	7	1	0.143	1.143	0.085	0.068	0.01	0.01	1.14	
				C1	14	4	0.286	1.429	0.183	0.119	0.08	0.08	1.39	
				C1	50	8	0.16	2	0.38	0.247	0	0	1.68	
				C1	71	10	0.045	2	0.382	0.236	1.6	1.6	1.6	
TOTAL		TOTAL	2012	C1	223	17	0.076	2.714	0.42	0.251	1.15	1.15	2.71	
				2013	C2	684	11	0.016	1.857	0.262	0.173	0.23	0.23	1.71
				2014	C4	593	8	0.013	2.429	0.306	0.192	0.56	0.56	2.18

Table 2. Genetic differentiation estimated by R_{ST} (above) and F_{ST} (underneath) based on MLVA-7 data from bacterial isolated during the different crop cycles. (A) Strains were grouped depending of their cycle of origin (C = cycle). (B) Strains were gathered depending of their cycle (C) and host of origin. Cycle 0 (Farmer, n=319), cycle 1 (E6 and E8, respectively n=71 and n=152), cycle 2 (E8, n=684), and cycle 4 (n=593). Farmer = tomato; E8 = susceptible eggplant; E6 = resistant eggplant; P: *** $\leq 0.001 < ** \leq 0.01 < * \leq 0.05 \leq$ Not Significant (NS).

(A)		1	2	3	4
Collection		1	2	3	4
1	C0		0.04552***	0.25925***	0.19038***
2	C1	0.03634***		0.10381***	0.05643***
3	C2	0.10889***	0.0453***		0.00552*
4	C4	0.09024***	0.026***	0.00341 ^{NS}	

(B)		1	2	3	4	5
Collection		1	2	3	4	5
1	Farmer Cycle 0		0.04843**	0.04163***	0.25925***	0.19038***
2	E6 eggplant C1	0.04295**		0.00161 ^{NS}	0.26742***	0.09969***
3	E8 eggplant C1	0.03451***	0.01304 ^{NS}		0.10865***	0.05417***
4	E8 eggplant C2	0.10889***	0.02375*	0.06243***		0.00552***
5	E8 eggplant C4	0.09024***	0.01084 ^{NS}	0.03885***	0.00341 ^{NS}	

Table 3. Hierarchical AMOVA from strains of *R. solanacearum* isolated from resistant (E6) and susceptible (E8) eggplants during cycle 1. Analysis were performed using data of MLVA-7 based on number of different alleles (A) or size differences (B).

Source of variation	d.f.	F _{ST}			Significance
		Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	
Among cultivar (E6 – E8)	1	3.101	-0.33605	-38.43	0.80574 NS
Among microplots within each cultivar	4	156.488	0.67943	77.69	0 ***
Within Microplot	217	230.5	0.53111	60.73	0 ***
Total	222	390.089	0.87449		

Source of variation	d.f.	R _{ST}			Significance
		Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	
Among cultivar (E6 – E8)	1	14.359	-0.54147	-4.95	0.9005 NS
Among microplots within each cultivar	4	306.731	0.9945	9.09	0.00337 **
Within Microplot	217	4551.09	10.48638	95.86	0 ***
Total	222	4872.18	10.93941		

Chapitre II – Partie 2

Table 4. Estimates of multilocus linkage disequilibrium. Estimation was realized on field “Le Vallon” collections (C0 to C4) and microplots (MP1 to MP6) collections. Populations were clone-corrected before calculation. Indices significance was tested on 999 permutations on datasets using parametric bootstrap method. C = cycle, MP = microplot.

Cycle	Host	Cultivar	Microplot	Number of haplotypes	I _A	p ^a	rbarD	p ^a
C0	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	-	28	0.4384	0.001***	0.0764	0.002***
C1	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP1	2	-0.0034	0.41 ^{NS}	-0.0012	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E6	MP2	1	NA	NA	NA	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP3	7	0.4695	0.048*	0.1636	0.078 ^{NS}
	<i>Solanum melongena</i>	E6	MP4	4	-0.3077	NA	-0.3162	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP5	1	NA	NA	NA	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E6	MP6	8	0.5038	0.025*	0.1752	0.026*
			Total	17	0.6347	0.001***	0.2162	0.001***
C2	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP1	8	-0.3387	0.994 ^{NS}	-0.1696	0.988 ^{NS}
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP3	3	0.0000	NA	0.0000	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP5	7	-0.2266	0.807 ^{NS}	-0.0757	NA
			Total	11	-0.0249	0.525 ^{NS}	-0.0086	0.513 ^{NS}
C4	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP1	5	-0.0230	0.444 ^{NS}	-0.0077	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP3	5	-0.1250	NA	-0.0633	NA
	<i>Solanum melongena</i>	E8	MP5	2	2.0000	NA	1.0000	NA
			Total	8	0.4474	0.021*	0.1519	0.036*

^a p-values were estimated from 999 randomized permutations. NS: not significant, * = significant, ** = highly significant, *** = very highly significant. NA = not available.

Table 5. Differentiation indexes (F_{ST} and R_{ST}) calculated between populations extracted from different habitats. (A) Strains were grouped depending of their habitats of origin: soil, rhizosphere or stem. (B) Strains were grouped depending of their host of origin (E6, resistant eggplant; E8, susceptible eggplant; Farmer, susceptible tomato) and by their habitat of origin (soil, rhizosphere or stem) or by their localization in the field (“coupled populations”).

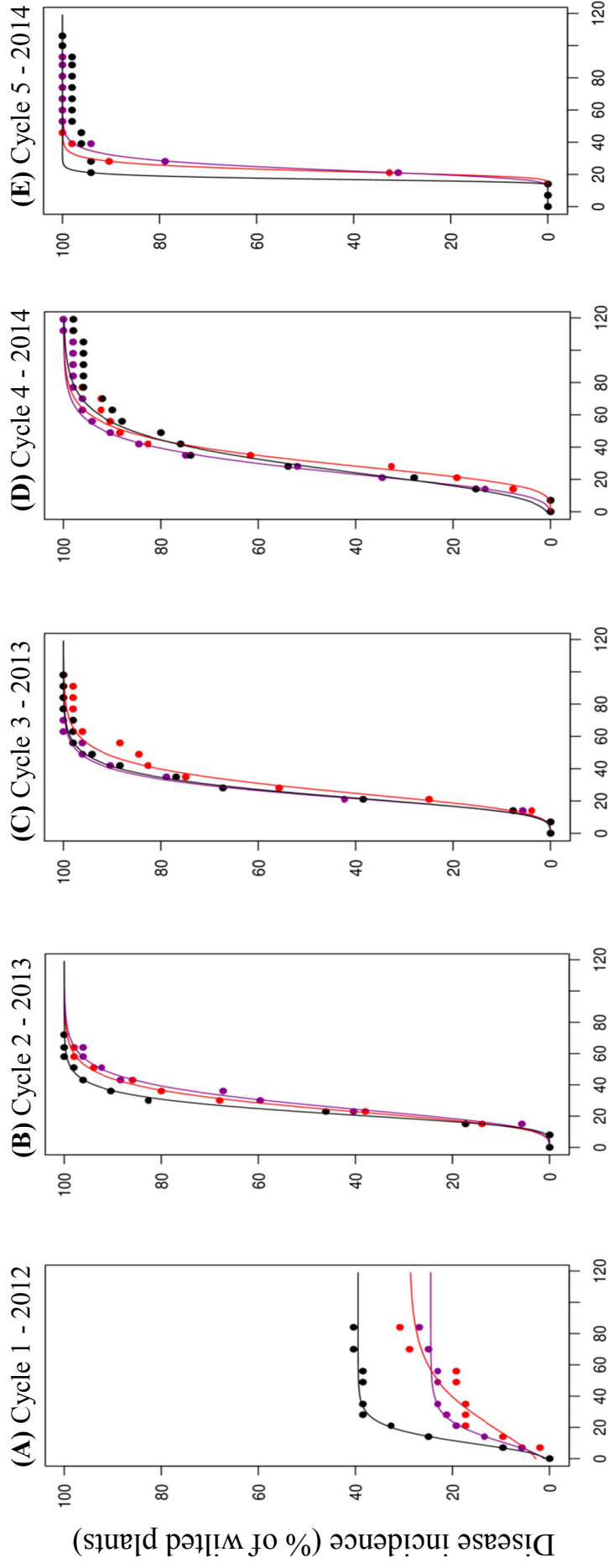
(A)			
Soil	Rhizosphere	Stem	
0.22951***	0.16477***		
0.08865***	0.00854*		
0.08516***	0.00358NS		

(B)					
	Population 1	Population 2	Cycle	F _{ST}	R _{ST}
Host and habitat	Soil of Farmer	Stem of Farmer	C0	0.01193 ^{NS}	-0.00143 ^{NS}
	Rhizosphere of E6	Stem of E6	C1	0.59177***	0.06064**
	Rhizosphere of E8	Stem of E8	C1	0.05529*	0.06064**
	Rhizosphere of E8	Stem of E8	C2	0.00898 ^{NS}	0.01809***
Localization and habitat (All on E8)	D07-rhizosphere	D07-stem	C2	0 ^{NS}	0 ^{NS}
	D10-rhizosphere	D10-stem	C1	0.82822***	0.82822***
	D13-rhizosphere	D13-stem	C1	0.11145 ^{NS}	0.11145 ^{NS}
	E08-rhizosphere	E08-stem	C2	0.08861 ^{NS}	0.08861 ^{NS}
	M37-rhizosphere	M37-stem	C1	0 ^{NS}	0 ^{NS}
	K36-rhizosphere	K36-stem	C2	0.22545*	0.22545*
	Q20-rhizosphere	Q20-stem	C2	-0.02703 ^{NS}	-0.02703 ^{NS}
	Q26-rhizosphere	Q26-stem	C2	0.07699*	0.06557*

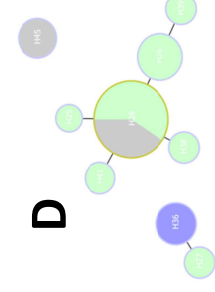
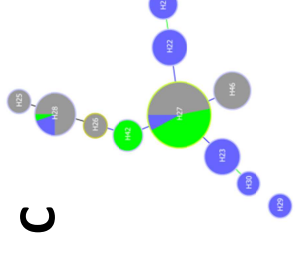
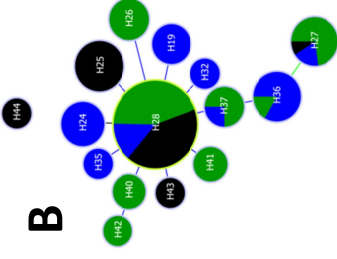
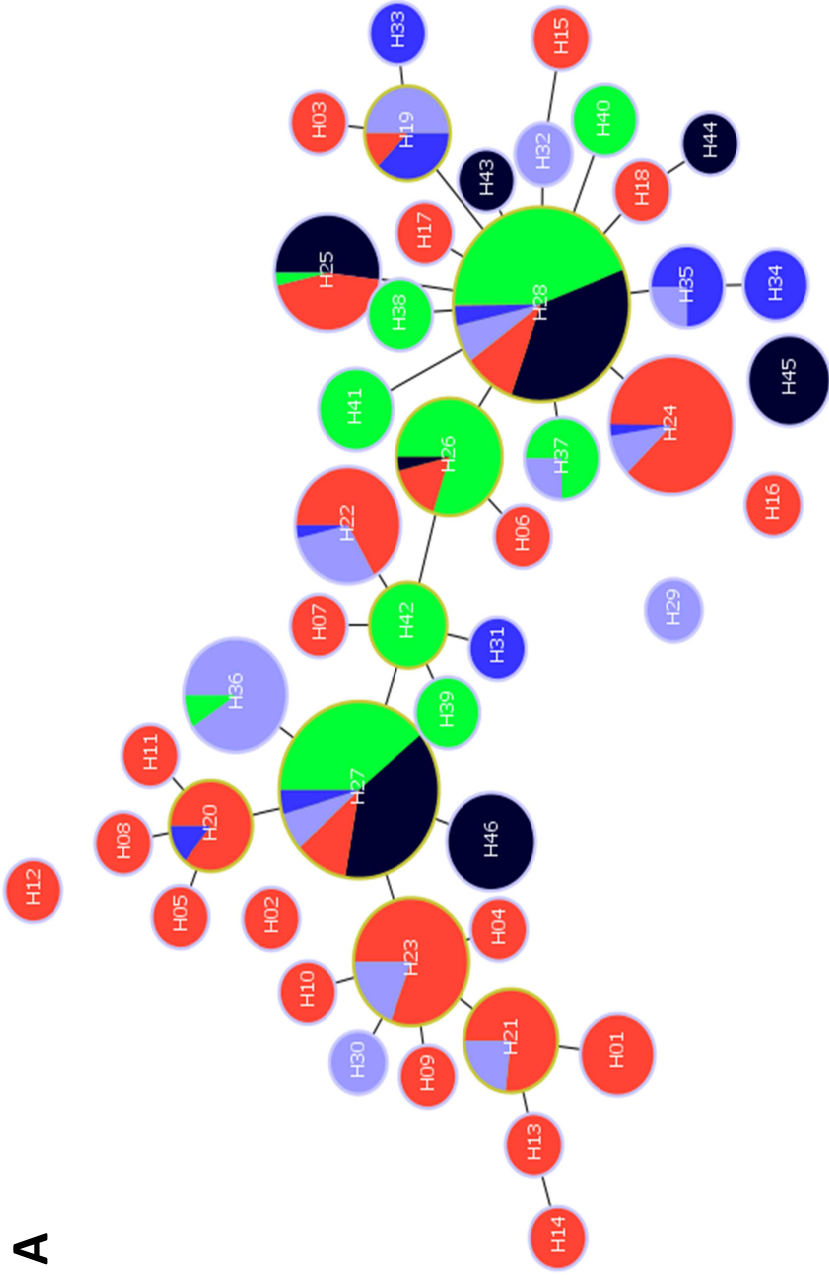
Figure 1. Bacterial wilting disease incidence for each microplot of susceptible eggplant (E8). Disease curves were adjusted using General non-Linear Model (GLM) under R software v.3.2. (A) Cycle 1 in 2012, (B) Cycle 2 in 2013, (C) Cycle 3 in 2013, (D) Cycle 4 in 2014 and (E) Cycle 5 in 2014. Red curves, pink curves and black curves represent the disease incidence for microplot 1, microplot 3 and microplot 5 respectively. X axis represents the number of days after plantation in the field and Y axis represents the percentage of wilted eggplant.

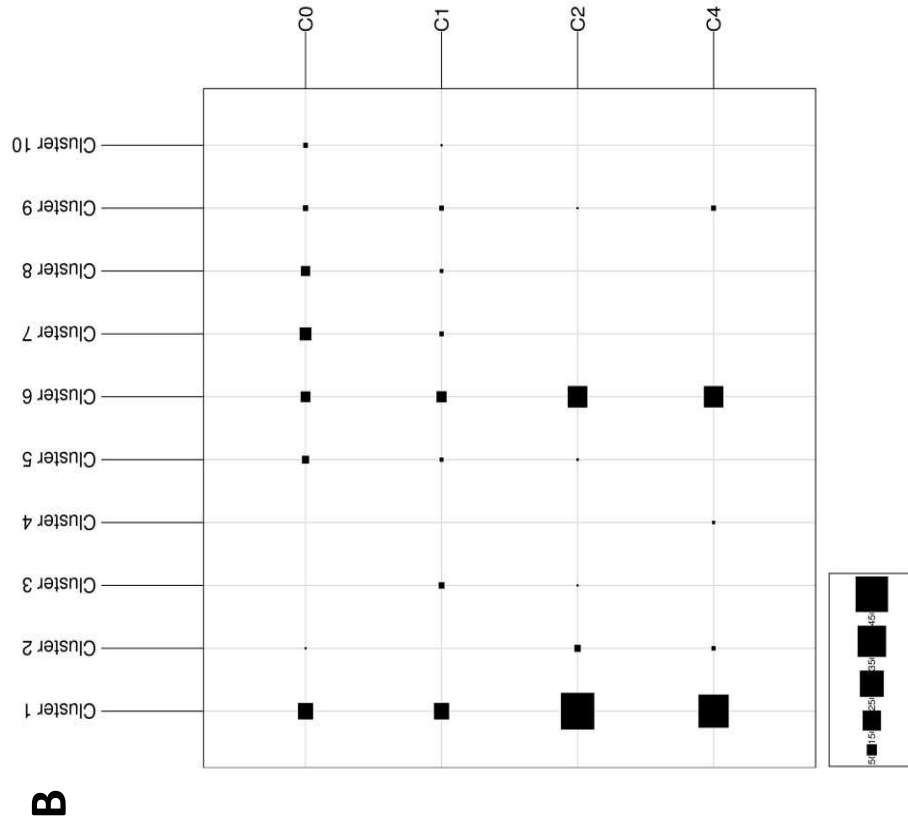
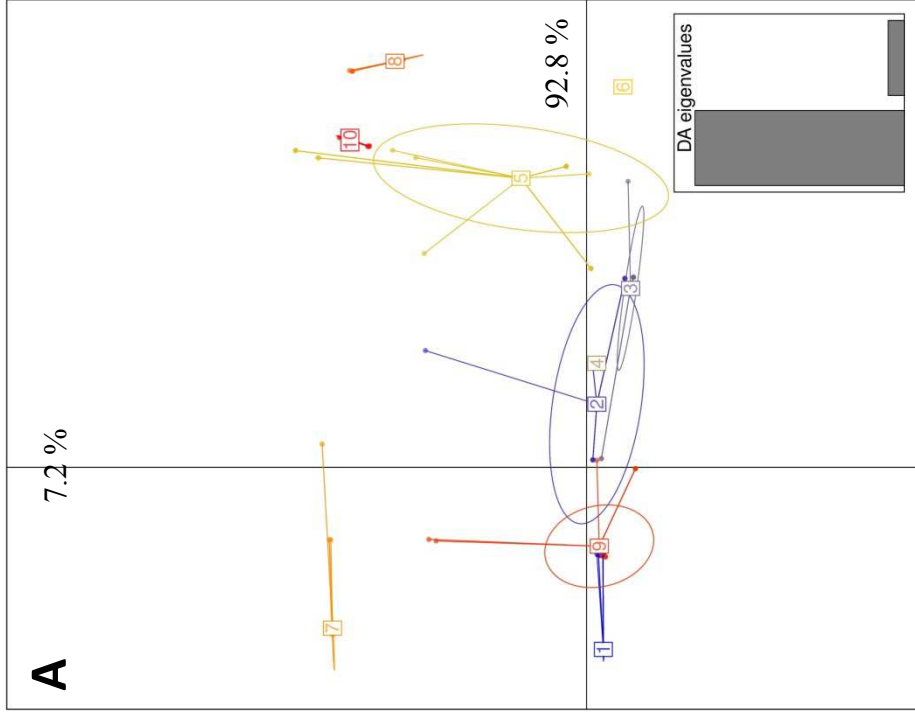
Figure 2. Minimum spanning tree of 1819 isolates grouped by crop cycle. (A) Haplotypes are colored in red for strains isolated from cycle 0 (tomato, n=319), in blue for strains isolated from cycle 1 (light blue: E8, susceptible eggplant, n=152; dark blue: E6, resistant eggplant, n=71), in green for strains isolated from cycle 2 (E8, susceptible eggplant, n=684) and in black for strains isolated from cycle 4 (E8, susceptible eggplant, n=593). Founder haplotypes of the main Clonal Complex are H27 and H28 (B, C, D) Global haplotype network separated by microplot 1, microplot 3 and microplot 5 respectively. In dark blue, blue and light blue are represented strains extracted during cycle 1 (n=90, 53 and 9 respectively). In dark green (n=225), flashy green (n=167) and light green (n=292) are represented strains extracted during cycle 2. In black (n=205), dark grey (n=195) and light grey (n=193). Links between Single-locus variants (SLV) are colored in blue, Double Locus Variant (DLV) in green and Triple Locus Variant (TLV) in red. Labels within the circles indicate the haplotype number. Founder haplotypes of each CC is circled in yellow, whereas the founders of subgroups within CC are circled in light green.

Figure 3. DAPC cluster analysis performed on a field population of *R. solanacearum* phylotype I from “Le Vallon” (n = 1500). (A) Scatter plot representing axis 1 and 2 of Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) performed on the entire dataset (C0, n = 319; C1, n = 223; C2, n = 683; C4, n = 593). (B) value of the DAPC cluster repartition among cycles of eggplant.



Days after planting (DAP)





5. References

- AVRDC (2004) AVRDC report 2003. In. Shanhua: Asian Vegetable Research and Development Center, p. 204.
- AVRDC (2005) AVRDC report 2004. In. Shanhua: Asian Vegetable Research and Development Center, p. 168.
- Aziz, R.K., and Nizet, V. (2010) Pathogen microevolution in high resolution. *Science translational medicine* 2: 16ps14-16ps14.
- Bühlmann, A., Dreo, T., Rezzonico, F., Pothier, J.F., Smits, T.H., Ravnikar, M. et al. (2014) Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites. *Environmental microbiology* 16: 2112-2125.
- Cao, Y., Tian, B., Liu, Y., Cai, L., Wang, H., Lu, N. et al. (2013) Genome Sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, Isolated from a Bacterial Wilt Nursery Used for Breeding Crop Resistance. *Genome Announc* 1.
- Chen, F., Goodwin, P.H., Khan, A., and Hsiang, T. (2002) Population structure and mating-type genes of *Colletotrichum graminicola* from *Agrostis palustris*. *Canadian journal of microbiology* 48: 427-436.
- Coletta-Filho, H.D., Bittleston, L.S., and Almeida, R.P. (2011) Spatial genetic structure of a vector-borne generalist pathogen. *Appl Environ Microbiol* 77: 2596-2601.
- Crow, J.F. (1986) *Basic concepts in population, quantitative, and evolutionary genetics*: WH Freeman and Company.
- Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3: 470-478.
- Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.-N., Fudal, I., Meyer, M. et al. (2012) Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen.
- Deberdt, P., Perrin, B., Coranson-Beaudu, R., Duyck, P., and Wicker, E. (2012) Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt. *Plant disease* 96: 687-692.
- Deberdt, P., Goze, E., Coranson-Beaudu, R., Perrin, B., Fernandes, P., Lucas, P., and Ratnadass, A. (2015) *Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as previous crops show promise for the control of bacterial wilt of tomato without reducing bacterial populations. *Journal of Phytopathology* 163: 377-385.
- Denny, T.P., Milling, A.S., Bhakta, V.G., and Allen, C. (2007) *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 strains are not uniquely cold tolerant in vitro. *Phytopathology* 97: S28-S28.
- Dunn, A.R., Bruening, S.R., Grünwald, N.J., and Smart, C.D. (2014) Evolution of an Experimental Population of *Phytophthora capsici* in the Field. *Phytopathology* 104: 1107-1117.
- Estoup, A., Tailliez, C., Cornuet, J.-M., and Solignac, M. (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* 12: 1074-1084.
- Excoffier, L., and Lischer, H.E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10: 564-567.
- Fegan, M., and Prior, P. (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Allen, C., Prior, P., and Hayward, A.C. (eds). Madison: APS Press, pp. 449-462.
- Finckh, M., Gacek, E., Goyeau, H., Lannou, C., Merz, U., Mundt, C. et al. (2000) Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance. *Agronomie* 20: 813-837.
- Francisco, A.P., Vaz, C., Monteiro, P.T., Melo-Cristino, J., Ramirez, M., and Carriço, J.A. (2012) PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC bioinformatics* 13: 87.

- Gandon, S., and Van Zandt, P.A. (1998) Local adaptation and host–parasite interactions. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 214-216.
- Garbeva, P., Van Veen, J., and Van Elsas, J. (2004) Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annu Rev Phytopathol* 42: 243-270.
- Garrett, K., and Mundt, C. (1999) Epidemiology in mixed host populations. *Phytopathology* 89: 984-990.
- Gillings, M.R., and Fahy, P. (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Hayward, A.C., and Hartman, G.L. (eds). Wallingford, United Kingdom: CAB International, pp. 95-112.
- Grey, B., and Steck, T. (2001) The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3866-3872.
- Grover, A., Azmi, W., Gadewar, A.V., Pattanayak, D., Naik, P.S., Shekhawat, G.S., and Chakrabarti, S.K. (2006) Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Applied Microbiology* 101: 798-806.
- Guidot, A., Prior, P., Schoenfeld, J., Carrere, S., Genin, S., and Boucher, C. (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* 189: 377-387.
- Guinard, J., Latreille, A., Guérin, F., Poussier, S., and Wicker, E. (2015a) A new MLVA scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I populations. *BMC Microbiology* soumis.
- Guinard, J., Vinatzer, B.A., Poussier, S., Lefeuvre, P., and Wicker, E. (2015b) Draft Genome sequence of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). *Genome Announcement* accepted.
- Gunawardena, U., Rodriguez, M., Straney, D., Romeo, J.T., VanEtten, H.D., and Hawes, M.C. (2005) Tissue-specific localization of pea root infection by *Nectria haematococca*. Mechanisms and consequences. *Plant Physiology* 137: 1363-1374.
- Hawes, M.C., Gunawardena, U., Miyasaka, S., and Zhao, X. (2000) The role of root border cells in plant defense. *Trends in plant science* 5: 128-133.
- Hayward, A.C. (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27: 265-277.
- Hayward, A.C. (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In *Bacterial wilt -The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Hayward, A.C.H., G.L. (ed). Wallingford: CAB International, pp. 9-24.
- Huet, G. (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in plant science* 5: n.p.
- Huising, E.J., Coe, R., Cares, J.E., Louzada, J.N., Zanetti, R., Moreira, F.M.S. et al. (2008) Sampling strategy and design to evaluate below-ground biodiversity (Chapter 2). In *A handbook of tropical soil biology : sampling and characterization of below-ground biodiversity*. Moreira, F.M.S. (ed).
- Irschick, D.J., and Reznick, D. (2009) Field experiments, introductions, and experimental evolution. *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*: 173-193.
- Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A., and Moury, B. (2009) Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Molecular plant pathology* 10: 599-610.
- Johnson, R. (1984) A critical analysis of durable resistance. *Annual review of phytopathology* 22: 309-330.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405.

- Jombart, T., Devillard, S., and Balloux, F. (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* 11: 94.
- Kalinowski, S.T. (2002) How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* 88: 62-65.
- Kamvar, Z.N., and Grünwald, N.J. (2013) Poppr 1.0. 5: An R package for genetic analysis of populations with mixed (clonal/sexual) reproduction. In.
- Kamvar, Z.N., Tabima, J.F., and Grünwald, N.J. (2014) Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* 2: e281.
- Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44: 693-695.
- Koroney A. S (2015) Amélioration de la résistance de *Solanum tuberosum* à travers la caractérisation de la racine et exsudats racinaires. In *Faculté des Science*. Rouen: Université de Rouen.
- Lannou, C., and Mundt, C. (1997) Evolution of a pathogen population in host mixtures: rate of emergence of complex races. *Theoretical and applied genetics* 94: 991-999.
- Leach, J.E., Vera Cruz, C.M., Bai, J., and Leung, H. (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual review of phytopathology* 39: 187-224.
- Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P. et al. (2012) Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics* 126: 143-158.
- Lebeau, A., Daunay, M.C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.F., Dintinger, J. et al. (2011) Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101: 154-165.
- Leduc, A., Traore, Y.N., Boyer, K., Magne, M., Grygiel, P., Juhasz, C.C. et al. (2015) Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso. *Environ Microbiol*.
- Lin, C.-H., Hsu, S.-T., Tzeng, K.-C., and Wang, J.-F. (2009) Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *European journal of plant pathology* 124: 75-85.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P. et al. (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13: 614-629.
- Marshall, D.R. (1989) Modeling the effects of multiline varieties on the population genetics of plant pathogens. *Plant disease epidemiology* 2: 284-317.
- McDonald, B.A., and Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40: 349-379.
- Milling, A., Meng, F.H., Denny, T.P., and Allen, C. (2009) Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Phytopathology* 99: 1127-1134.
- Morand, S. (1996) Life-history traits in parasitic nematodes: a comparative approach for the search of invariants. *Functional Ecology*: 210-218.
- Morin, P.A., Luikart, G., and Wayne, R.K. (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 208-216.
- Mundt, C. (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual review of phytopathology* 40: 381-410.
- N'Guessan, C.A., Abo, K., Fondio, L., Chiroleu, F., Lebeau, A., Poussier, S. et al. (2012) So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Cote d'Ivoire in Africa. *Phytopathology* 102: 733-740.
- Nei, M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nguema-Ona, E., Vitré-Gibouin, M., Cannesan, M.-A., and Driouich, A. (2013) Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends in plant science* 18: 440-449.

- Oliver, R.P., Friesen, T.L., Faris, J.D., and Solomon, P.S. (2012) *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annual review of phytopathology* 50: 23-43.
- Parkinson, N., Bryant, R., Bew, J., Conyers, C., Stones, R., Alcock, M., and Elphinstone, J. (2013) Application of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Typing to Discriminate *Ralstonia solanacearum* Strains Associated with English Watercourses and Disease Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6016-6022.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6: 288-295.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Plancot, B., Santaella, C., Jaber, R., Kiefer-Meyer, M.C., Follet-Gueye, M.-L., Leprince, J. et al. (2013) Deciphering the responses of root border-like cells of Arabidopsis and flax to pathogen-derived elicitors. *Plant physiology* 163: 1584-1597.
- Poussier, S. (2000) Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum. In *Ecole Doctorale Vie-Agronomie-Santé*. Rennes: Rennes I, p. 149.
- Pradhanang, P.M. (1999) Optimization of sampling method for accurate detection of *Ralstonia solanacearum* in naturally infested soil. *Bacterial Wilt Newsletter* 16: 2.
- Prior, P., Beramis, M., Chillet, M., and Schmit, J. (1990) Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) resistance mechanism. *Symbiosis* 9: 393-400.
- Pruvost, O., Magne, M., Boyer, K., Leduc, A., Tourterel, C., Drevet, C. et al. (2014) A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage. *PLoS one* 9: e98129.
- R, D.C.T. (2010) R: A Language and Environment for Statistical Computing. In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramesh, R., Gaitonde, S., Achari, G., Asolkar, T., Singh, N.P., Carrere, S. et al. (2014) Genome Sequencing of *Ralstonia solanacearum* Biovar 3, Phyloptype I, Strains Rs-09-161 and Rs-10-244, Isolated from Eggplant and Chili in India. *Genome Announc* 2.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C. et al. (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11: 1-16.
- Reznick, D.N., and Ghalambor, C.K. (2005) Selection in nature: experimental manipulations of natural populations. *Integrative and Comparative Biology* 45: 456-462.
- Rousset, F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Sequeira, L. (1998) Bacterial wilt: the missing element in International banana improvement programs. In *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects*. Prior, P., Allen, C., and Elphinstone, J. (eds). Heidelberg, Paris: Springer - INRA Editions, pp. 6-14.
- Shan, W., Yang, X., Ma, W., Yang, Y., Guo, X., Guo, J. et al. (2013) Draft genome sequence of *Ralstonia solanacearum* race 4 biovar 4 strain SD54. *Genome Announc* 1: n.p.
- Skoglund, L.G., Elphinstone, J.G., and Berrios, D.E. (1992) Study of Latent Infection of Potato Tubers by *Pseudomonas solanacearum* in Burundi. In *Bacterial Wilt*. Hartman, G.L., and Hayward, A.C. (eds), p. 106.
- Stearns, S.C. (1989) Trade-offs in life-history evolution. *Functional ecology*: 259-268.
- Tavares, L.A., Michereff, S.J., Souza, R.M.d., and Mariano, R.d.L.R. (2000) Sampling plan for quantifying tomato bacterial wilt in the field. - Plano de amostragem para quantificacao da murcha bacteriana do tomateiro no campo. *Summa Phytopathologica* 26: 306-310.
- Van Den Bosch, F., and Gilligan, C.A. (2003) Measures of durability of resistance. *Phytopathology* 93: 616-625.
- Verniere, C., Bui Thi Ngoc, L., Jarne, P., Ravigne, V., Guerin, F., Gagnevin, L. et al. (2014) Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin. *Environ Microbiol* 16: 2226-2237.

- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., and Eggen, A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34: 275-306.
- Wen, F., VanEtten, H.D., Tsapralis, G., and Hawes, M.C. (2007) Extracellular proteins in pea root tip and border cell exudates. *Plant physiology* 143: 773-783.
- Wen, F., White, G.J., VanEtten, H.D., Xiong, Z., and Hawes, M.C. (2009) Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection. *Plant physiology* 151: 820-829.
- Wicker, E., Lefeuvre, P., Cambiaire, J.C.d., Lemaire, C., Poussier, S., and Prior, P. (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME Journal* 6: 961-974.
- Wicker, E., Grassart, L., Mian, D., Coranson Beaudu, R., Dufeal, D., Guilbaud, C., and Prior, P. (2002) *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Bacterial Wilt Newsletter* 17: 20-21.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6790-6801.
- Wimer, A.F., Rideout, S.L., and Freeman, J.H. (2011) Temporal and spatial distribution of tomato bacterial wilt on Virginia's eastern shore. *HortTechnology* 21: 198-201.
- Wright, S. (1949) The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* 15: 323-354.
- Wu, K., Yuan, S., Xun, G., Shi, W., Pan, B., Guan, H. et al. (2015) Root exudates from two tobacco cultivars affect colonization of *Ralstonia solanacearum* and the disease index. *European Journal of Plant Pathology* 141: 667-677.
- Zhan, J., and McDonald, B. (2013) Field-based experimental evolution of three cereal pathogens using a mark–release–recapture strategy. *Plant Pathology* 62: 106-114.
- Zhan, J., Fitt, B.D., Pinnschmidt, H., Oxley, S., and Newton, A. (2008) Resistance, epidemiology and sustainable management of *Rhynchosporium secalis* populations on barley. *Plant pathology* 57: 1-14.

CHAPITRE 3 :
RÔLE DE DIX EFFECTEURS DE
TYPE TROIS DANS
L'INTERACTION ENTRE
***R. SOLANACEARUM* ET**
L'AUBERGINE RÉSISTANTE E6

Rôle de dix effecteurs de type trois dans l'interaction entre *R. solanacearum* et l'aubergine résistante E6

Introduction

Afin de développer des stratégies de lutte intégrée efficaces et durables contre les maladies, il est indispensable de déterminer la durabilité des sources de résistance variétale existantes. Cette durabilité peut être estimée en utilisant des indicateurs de durabilité potentielle [109, 110], qui prennent en compte le potentiel évolutif des agents pathogènes [1] ainsi que les mécanismes moléculaires de l'interaction entre une plante hôte et son pathogène.

Chez l'aubergine, un gène majeur de résistance (*ERs1*) a été identifié chez le cultivar E6 (MM960 ou AG91-25) permettant de contrôler certaines souches de *Ralstonia solanacearum* de phylotype I [219, 426]. Afin d'estimer la durabilité de cette résistance, il apparaît nécessaire d'identifier et de caractériser les gènes bactériens impliqués dans l'interaction avec E6. Dans notre équipe, une précédente étude basée sur la confrontation des données phénotypiques avec des données d'hybridation sur puce à ADN puis complétées par des tests PCR a été réalisée [376]. Elle a permis d'identifier une dizaine de gènes bactériens hautement associés à l'avirulence sur les aubergines résistantes E1 et E6 [376] (**Figure 1**). Parmi ces gènes, *ripP2* est fortement associé à de l'avirulence sur aubergine et sur tomate résistante (E6 et T5 respectivement), de même que *ripP1*, *ripG3*, *ripAU* et *ripAX2* dans une moindre mesure. *RipN* est associé à de l'avirulence sur E1 et T5, et *ripAS* est associé à de l'avirulence seulement sur aubergine E1. Les ET3 *ripE1*, *ripAJ* et *ripAZ1* n'avaient été repérés comme associés à l'avirulence sur aubergine qu'en phase 1 de l'étude de Pensec et coll. [376], et non considérés dans la suite de l'étude (**Tableau 1**). Cependant, nos collègues de VirginiaTech ont par ailleurs établi par expression transitoire que ces trois effecteurs induisaient une réaction de type HR sur l'aubergine E1 [281] ; nous les avons donc sélectionnés pour notre étude.

Ce chapitre de thèse se focalisera essentiellement sur l'étude de l'implication de ces 10 ET3 dans l'interaction *R. solanacearum* vs aubergine résistante (E6) par des approches complémentaires de génétique évolutive et fonctionnelle, avec les objectifs suivants : (i) comparer les répertoires des 10 ET3 (présence/absence, variabilité allélique) dans une large collection de souches, (ii) établir un lien entre le répertoire d'ET3 et le phénotype des souches sur aubergine, (iii) déterminer les répertoires d'ET3 de souches virulentes ou avirulentes sur E6, dont la séquence génomique a été générée pendant cette étude (**Tableau 2**), (iv) confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une fonction d'avirulence de ces ET3 sur l'aubergine résistante E6.

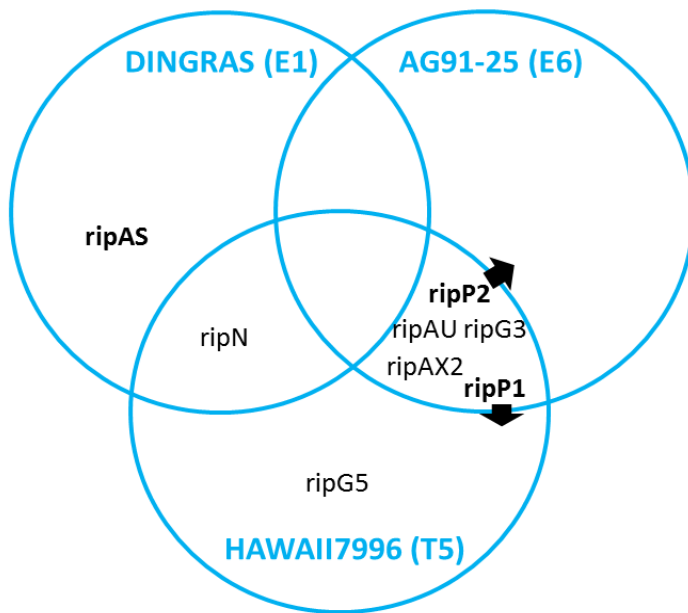


Figure 1. Effecteurs de type III identifiés comme hautement associés à l’avorulence sur aubergine résistante (E1 et E6) et sur tomate résistante (T5). Ces effecteurs ont été sélectionnés par une double approche « stringente » (**effecteurs en gras**) et d’ACP, détaillée dans Pensec et coll. [376]. *ripG5* est associé à l’avorulence sur T5 et uniquement exprimé en opéron avec *ripG4* (N. Peeters, comm. pers. 2011), n’a en revanche pas été retenu dans la suite de l’étude. La flèche noire indique l’accession correspondant à la priorité 1 pour l’effecteur considéré.

Tableau 1. Dix effecteurs de type III (T3E) ont été choisis pour cette étude. Ces ET3 ont été choisis parmi les 16 gènes associés à l’avorulence sur aubergine (E1 et E6), tomate (T5) et piment (P8) à l’issue de la Phase 1 de l’étude de Pensec et coll. [376], en se basant sur le ratio suivant : nombre de sondes présentes/nombre total de sondes par gène dans chaque pool « souches avirulentes ». Cette sélection regroupe des gènes (i) dont au moins 50% des sondes ont été associées à l’avorulence sur au moins une accession, et/ou (ii) ont été associées à l’avorulence sur E1 et E6, et/ou (iii) ont significativement contribué à la *fitness in planta* [368]. Les gènes sélectionnés en phase 2 sont en gras (d’après le Tableau 4 de [376]).

Code CDS	Code rip	Nb de sondes /gène	AUBERGINE				PIMENT	TOMATE	Contribue à la fitness sur [368]
			Dingras (E1)	Ceylan (E3)	Surya (E4)	AG91-25 (E6)	Perennial (P8)	Hawaii7996 (T5)	
RSc2101	ripAJ	3				0.67			
RSp1384	ripAS	4	0.25			0.5	0.75		
RSp1460	ripAU	3				0.67	0.33		
RSp0572	ripAX2	4					0.75		
RSp1582	ripAZ1	3			0.67	0.67			
RSc3369	ripE1	4				1			
RSp0028	ripG3	5				0.5	0.6		
RSc1801	ripG5	4	0.25			0.25			
RSp1130	ripN	3	0.33			0.33			
RSc0826	ripP1	3			1	0.67			
RSc0868	ripP2	4				0.75		Tomate, aubergine, haricot	

Tableau 2. Phylotype, hôte d'isolement, origine géographique et virulence sur aubergine E6/E8 de neuf souches de *Ralstonia solanacearum* dont les génomes ont été séquencés en collaboration avec l'équipe de B. Vinatzer

Nom	Numéro RUN	Phylotype-séquovar (eST-mST) ^a	Hôte et cultivar	Origine	Virulence sur E6 (phénotype)	Contrôlé par Ers1 ^b
CFBP3059	39	III-23 (e002-m005)	<i>Solanum melongena</i> ^c	Burkina Faso	4	NON
PSS004	157	I-15 (e015-m028)	<i>Solanum lycopersicum</i> ^d	Taiwan	4	NON
CFBP7058	215	I-13 (e019-m030)	<i>Solanum nigrum</i> ^e	Cameroun	2	OUI
TO10	969	I-47 (e050-m022)	<i>Solanum lycopersicum</i> ^d	Thaïlande	4	NON
CIV 23	1744	I-31 (e043-m022)	<i>Solanum melongena</i> ^c	Côte d'Ivoire	5	?
CIR011-208	1985	I-17 (e030-m022)	<i>Solanum melongena</i> ^c	Guyane	5	?
TD13.01	3012	I-31 (e043-m022)	<i>Solanum melongena</i> ^c cv. E8	Ile de La Réunion – Le Vallon	2	?
RD13.01	3013	I-31 (e043-m022)	<i>Solanum melongena</i> ^c cv. E8	Ile de La Réunion – Le Vallon	1	?
TF31.08	3014	I-31 (e043-m022)	<i>Solanum melongena</i> ^c cv. E6 (infections latentes)	Ile de La Réunion – Le Vallon	2	?

(Virginia Tech, Blacksburg Etats-Unis).

^a Le séquovar groupe des souches dont les séquences partielles du gène *egl* sont similaires à au moins 99%. eST : séquençotype *egl* ; mST : séquençotype mutS

^b D'après [425] ainsi que d'après la thèse de S. Salgon en cours dans l'équipe.

^c aubergine, ^d tomate et ^e morelle noire.

PARTIE 3.1

Détermination des répertoires d'effecteurs et analyses phylogénétiques

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel végétal

Un cultivar résistant E6 (*Solanum melongena* accession MM960) et un cultivar sensible E8 (*Solanum melongena* accession MM738) ont été utilisés dans cette étude. MM960 est issue d'un croisement entre une lignée d'aubergine résistante provenant de Turquie et de l'espèce apparentée sauvage *Solanum aethiopicum* [449, 450]. La résistance et/ou la sensibilité de ces deux lignées d'aubergine vis-à-vis des différents phylotypes et clades de *R. solanacearum* ont été caractérisées durant les thèses d'A. Lebeau [425] et Carine N'Guessan [435]. La lignée MM738 a été identifiée comme sensible aux six pathoprofiles de *R. solanacearum* [219, 385] et présente de forts taux de flétrissement et de colonisation. En revanche, la lignée MM960 (codée E6) s'est révélée hautement résistante aux souches des pathoprofiles A, C et D [385]. Des études de cartographie génétique, réalisées en 2010, ont montré que la résistance d'E6 aux souches de phylotype I était conférée par un gène majeur dominant (*ERs1*) situé sur le LG2 (« Linkage Group 2 ») associé à un QTL (« Quantitative Trait Locus ») de résistance partielle sur le LG3. Cependant la nouvelle cartographie en cours, réalisée à l'aide de marqueurs SNP (« Single Nucleotide Polymorphism »), remet en cause l'existence de ce dernier QTL (S. Salgon, comm. pers. 2015). La résistance de cette lignée s'est révélée souche-spécifique et complexe. Les souches capables de contourner *ERs1* sont partiellement contrôlées par un autre QTL sur le LG13 qui semble contribuer à ralentir la progression des symptômes [426].

1.2. Souches bactériennes et extraction d'ADN

Les souches bactériennes ont été conservées à -80°C dans du glycérol 20% ou sur billes microporeuses (tubes Cryobank). La collection de souches de *R. solanacearum* (collection RUN) est maintenue au CIRAD de Saint-Pierre (La Réunion). 91 souches bactériennes représentatives des phylotypes I, IIA, IIB, et III de *R. solanacearum* ont été sélectionnées en fonction de leurs origines géographiques, issues de 13 zones d'importance agronomique ou d'importance en sélection variétale (Guyane, Côte d'Ivoire, Indonésie, Inde, Martinique, Thaïlande, Australie, Philippines, Taïwan, Burkina Faso, Cameroun, Afrique du Sud et La Réunion) et en fonction de leur hôte d'isolement, principalement issues de Solanacées (aubergine, tomate, pomme de terre, poivron/piment ; **Annexe 3**). Cette collection comprend des souches virulentes sur l'aubergine sensible E8, ainsi que des souches (i) capables d'infecter et de faire flétrir E6, (ii) capables d'induire des infections latentes sur E6 et (iii) incapables de coloniser et de faire flétrir E6 (i.e., souches avirulentes). Parmi ces souches, 9 ont été sélectionnées pour en séquencer le génome (**Tableau 2**). Les souches de *R. solanacearum* ont été

placées dans du bouillon nutritif en agitation (120 rotations par minute [rpm]) pendant 48h à 28°C. 50 µL ont été prélevés et étalés sur milieu Kelman [186] et incubés pendant 24 à 48h à 28°C. Les bactéries ont ensuite été prélevées et mises en suspension (10^9 CFU.ml⁻¹) dans 1 mL de NaCl 0,5M, pour éliminer les polysaccharides. La suspension a été centrifugée à 8000 rpm (6000 g) pendant 3 min. Le surnageant a été éliminé et le culot bactérien a ensuite été utilisé pour en extraire l'ADN à l'aide du kit de purification Wizard® Genomic DNA selon les préconisations du fournisseur (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Etats-Unis d'Amérique). La concentration d'ADN et sa qualité ont été déterminées par spectrophotométrie au NanoDrop® (logiciel ND8000 V2.2.1). Les ADN bactériens ont finalement été dilués à 2 ng.µL⁻¹ et conservés à -20°C.

1.3. Test de virulence des souches de *R. solanacearum*

Sur les 91 souches sélectionnées, 43 souches avaient été précédemment phénotypées [376, 425, 427, 428], ce qui n'était pas le cas des 48 autres souches. Parmi ces 48 souches non-phénotypées, 20 souches représentatives des 11 différents groupes de répertoire d'ET3 (détaillés plus bas) ont été sélectionnées pour être inoculées sur aubergine sensible (E8) et aubergine résistante (E6), en conditions contrôlées. Les graines d'aubergine ont été semées en serre 4 semaines avant inoculation. Une semaine après le semis, les plantules ont été repiquées en pots. Au stade de 3-4 feuilles, les plants d'aubergine ont été transférés en chambre climatique trois jours avant inoculation à une humidité relative de 90%, à une température de 30°C le jour et de 24°C la nuit et avec une photopériode de 12h. Les plantes ont été scarifiées et inoculées avec 5 mL d'une suspension bactérienne de 10^8 CFU.ml⁻¹ en suivant le protocole détaillé par [385]. Chaque combinaison « souche x cultivar » a été testée sur deux répétitions de 10 plants. La progression de la maladie a ensuite été suivie en notant les symptômes à partir du quatrième jour après inoculation, puis tous les deux à trois jours durant 28 jours. La sévérité des symptômes de chaque plante a été évaluée selon une échelle de notation de 0 à 4, définie comme suit [292, 385] : 0, aucun symptôme ; 1, une feuille flétrie ; 2, deux ou trois feuilles flétries ; 3, toutes les feuilles flétries ; 4, tige pliée. Une plante notée 1 ou 2 correspond à une plante asymptomatique et une plante notée 3 ou 4 à une plante flétrie. Au bout de 28 jours, toutes les plantes asymptomatiques ont été prélevées afin de détecter des infections latentes suivant le protocole de [385]. Les échantillons de tige ont été désinfectés en surface puis flambés avec de l'éthanol à 95°. Les extrémités de la tige ont été rafraîchies et le fragment restant a été dilacéré et mis à macérer 15 min dans 5mL de tampon Tris ; 50 µL du macérât a été étalé sur milieu semi-sélectif Sequeira [202]. Les boîtes de Petri ont ensuite été mises à incuber à 28°C pendant deux à trois jours. Les plants asymptomatiques ont été notés comme positifs à une infection latente lorsque les colonies bactériennes isolées présentaient une morphologie caractéristique de *R. solanacearum*.

1.4. Amplification et séquençage de gènes

Pour positionner les différentes souches dans la phylogénie du complexe d'espèces *R. solanacearum* (« *Ralstonia solanacearum* species complex » ou RSSC [256]), une analyse de séquences multilocus a été menée en considérant les 8 gènes du dernier schéma MLSA [166]. Parmi ces huit gènes, (i) six sont des gènes de ménage situés sur le chromosome : *gdhA*, *mutS*, *adk*, *leuS*, *rplB*, et *gyrB* ; et (ii) deux sont des gènes associés à de la virulence et sont situés sur le mégaplasmide : *Egl* et *fliC*. Les couples d'amorces utilisés pour les amplifications PCR sont présentés en **Annexe 3** [165, 166, 256, 451]. Les produits PCR ont été séquencés par Beckman-Coulter Genomics (Takeley, Royaume-Uni).

1.5. Amplification et séquençage des effecteurs de type 3 (ET3)

Sur la base de l'étude de [376], dix gènes codant pour des effecteurs de type III (ET3) ont été sélectionnés. Par ordre décroissant d'importance, ce sont *ripP2*, *ripP1*, *ripG3*, *ripAU*, *ripAX2*, *RipN*, *ripE1*, *ripAJ* et *ripAZ1* (**Tableau 1**). Des familles de gènes orthologues ont été définies à partir des séquences des ET3 présents dans les génomes complets et disponibles dans l'interface Web « *Ralstonia* T3E » (INRA Toulouse, <https://iant.toulouse.inra.fr/T3E>) [280]. Les séquences des gènes-candidats ainsi que les zones flanquantes (400 nucléotides en 5' et 3' du gène) ont été exportées depuis l'interface MaGe (Magnifying Genomes, <http://genoscope.cns.fr/microscope/mage>) de la plateforme MicroScope. La recherche d'orthologues aux gènes-candidats a été réalisée par BlastN avec les critères suivants : (i) identité nucléotidique supérieure ou égale à 80% et (ii) des rapports de recouvrement minimaux (MinLrap) supérieurs à 90%. Les séquences des gènes orthologues ont été alignées avec le programme d'alignement ClustalW [452], implémenté dans le logiciel Geneious V5.5 (Biomatters ; <http://www.geneious.com>). Des amorces externes (en 5' et 3' du gène) ont été dessinées sur les zones consensus encadrant le gène. Pour certains gènes de grande taille tel que *RipAS* (~2500 pb), plusieurs couples d'amorces ont été définis afin d'amplifier le gène en plusieurs parties. Un total de 27 paires d'amorces a été déterminé en ciblant des températures de fusion proches de 60°C et des tailles de 18 à 25 nucléotides (**Annexe 3**). Les conditions de PCR ont été optimisées, en se basant sur les programmes initialement définis dans les travaux de F. Pensec [453] et de N'Guessan (2012) ; les mélanges réactionnels ainsi que les conditions d'amplification sont détaillés en **Annexe 3**. L'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% (migration durant 1h20 à 120 V). Si aucune amplification n'a été obtenue avec les amorces externes, les ET3 ont été amplifiés par PCR avec des amorces internes (**Annexe 3**) [219, 376]. Les produits PCR ont été séquencés par Beckman-Coulter Genomics (Takeley, Royaume-Uni).

1.6. Séquençage du génome de 9 souches de *R. solanacearum*

Parmi les 91 souches citées précédemment, 9 souches de *R. solanacearum* ayant des profils de virulence différents sur aubergine E6/E8 ont été sélectionnées pour en séquencer le génome (**Tableau 2**). Une fois l'ADN extrait comme précédemment détaillé, les génomes ont été séquencés

par l'Institut de Bio-informatique de VirginiaTech (VBI, <https://www.vbi.vt.edu/>; VirginiaTech, Blacksburg, VA, Etats-Unis). Le séquençage a été réalisé à une profondeur de ~100X avec la technologie Illumina HiSeq 2500, avec une taille moyenne d'insert de 450 pb. Les fragments ont été coupés (« trimmés ») en fonction de leur score de qualité grâce au programme HTQC [454]. Les génomes ont ensuite été assemblés en utilisant le package d'assemblage CLC Genomics Workbench v. 7.0.3 (<http://www.clcbio.com>; Aarhus, Danemark). Les génomes assemblés ont été annotés automatiquement en utilisant l'interface web MicroScope [455]. Les génomes ont ensuite été confrontés au site web « Ralstonia T3E » (<https://iant.toulouse.inra.fr/T3E>) pour identification des effecteurs « rip » (« *Ralstonia* injected protein ») de *R. solanacearum* [280]. Les génomes ont été déposés sur le site « European Nucleotide Archive (ENA) » sous le numéro de BioProjet PRJEB112980000000 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB11298>).

1.7. Analyse des données

1.7.1. Analyse des données de virulence et d'agressivité

De précédentes analyses réalisées sur les interactions *core*-TEP/*core*-Rs2 ont permis de déterminer 5 groupes phénotypiques de référence notés de 1 à 5 : 1, hautement résistant ; 2, moyennement résistant ; 3,1, partiellement résistant ; 3,2, infection latente ; 4, moyennement sensible ; 5, hautement sensible [385]. Ainsi, dans cette étude, en se basant sur les taux de flétrissement et de colonisation finaux, chaque combinaison « souche x cultivar » d'aubergine a été assignée à un phénotype de référence en utilisant la méthode des « plus proches voisins » (fonction *knn* et package *class*) sous le logiciel R v. 3.2.2 [456]. Les effets des facteurs « souche » et « cultivar » sur l'incidence de flétrissement et la colonisation ont été testés en utilisant respectivement un modèle linéaire généralisé (GLM) avec un test du χ^2 au seuil critique de 5% et avec une analyse de variance (ANOVA) au seuil critique de 5%. Afin de différencier les souches deux à deux, l'incidence du flétrissement et la moyenne de colonisation ont été comparées en utilisant un test de comparaison multiple des moyennes, basé sur la méthode de Tukey au seuil de 5% (fonction *glht* et package *multcomp* sous R).

1.7.2. Analyse des séquences nucléiques et construction d'arbres phylogénétiques

L'assemblage des séquences géniques a été effectué à l'aide du logiciel Geneious (Biomatters). Toutes les séquences ambiguës (défaut d'assemblage, taux de mésappariement trop important etc.) ont été systématiquement ré-amplifiées puis re-séquencées. Les séquences consensus ont ensuite été alignées *via* l'utilisation de l'algorithme d'alignement ClustalW implémentés sous Geneious (Biomatters). Les séquences brutes ont été alignées avec les séquences de référence des différents génomes séquencés de *R. solanacearum* : GMI1000 [283], RS1000 [457], CMR15 et CFBP2957 [273], IPO1609 [458] et MOLK2. Les extrémités des séquences de chaque gène ont ensuite été trimmées en fonction de leur qualité et du cadre de lecture [166, 219]. Les séquences nucléiques finales ont été traduites en séquences protéiques et des arbres phylogénétiques ont été construits pour

chaque ET3 par la méthode du « neighbour-joining » [459] (modèle de substitution Jukes Cantor) avec 1000 *bootstraps* sous Geneious (Biomatters).

Les séquences nucléiques finales des 8 gènes de ménage ont été concaténées selon les positions de chaque gène dans les différents génomes séquencés [166, 273]. Un arbre phylogénétique « *approximately-maximum-likelihood* » a été construit avec l'alignement du concaténat, en utilisant le logiciel FastTree (v. 2.1.7, Microbes Online, <http://www.microbesonline.org/fasttree/>), et le modèle de substitution nucléotidique GTR+CAT. La robustesse des différents nœuds a été estimée par un *SH-test* sur les 3 topologies alternatives de chaque nœud, avec 1000 ré-échantillonnages ; le résultat de ce test est « virtuellement identique au *SH-like local support* » de PhyML (Geneious, Biomatters). Tous les arbres ont été édités sous FigTree v 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

1.7.3. Analyses des répertoires d'effecteurs

Les répertoires d'ET3 des différentes souches ont été déterminés en fonction de la présence ou de l'absence des 10 gènes ciblés, ainsi que de leur polymorphisme de taille. Pour chaque gène putatif, les profils de répartition des ET3 ont été codés de la façon suivante : 0, absence d'amplification; 1, amplification avec obtention d'un fragment de la taille attendue ; 2 et 3, amplification avec deux taille de séquences différentes de celle attendue. Chaque souche est ainsi décrite par un profil de 10 variables (gènes) pouvant prendre quatre états différents. À l'aide du logiciel R v 3.2.2 [456], une classification hiérarchique ascendante des souches de la collection entière a été réalisée en fonction de la présence, de l'absence ou du polymorphisme des effecteurs. Les notes associées en fonction de cet état ont été transformées en variables nominales. Une souche ayant un ET3 dont la longueur est différente de celle attendue n'est pas plus proche, *a priori*, d'une souche ayant l'allèle attendu qu'une souche n'ayant pas cet ET3. Le calcul de la dissimilarité est effectué par « simple matching », rapport de concordance (fonction *daisy* du package *cluster*) et la classification hiérarchique ascendante utilise la méthode de Ward pour la construction du dendrogramme (fonction *agnes* du package *cluster*).

2. Résultats

Pour l'amplification de chaque gène, les conditions de PCR (températures d'hybridation et nombre de cycles) ont été optimisées afin d'augmenter la spécificité d'appariement des amorces et d'éviter l'apparition de bandes aspécifiques. Pour quelques souches, certains couples d'amorces externes n'ont permis d'amplifier qu'un fragment du gène (soit en 5', soit en 3'). Dans ce cas, les amorces internes ont été utilisées. Les informations disponibles dans cette étude ne sont données que pour les couples d'amorces pour lesquels l'amplification s'est révélée positive. Cependant, pour les effecteurs *ripAJ*, *ripN*, *ripAS* et *ripAZI*, les données de quelques souches ne portent que sur un fragment du gène (i.e., soit le fragment 5', soit 3') et non sur l'ensemble du gène (**Tableau 3**).

Tableau 3. Distribution et polymorphisme de taille des 10 ET3 au sein de 91 souches de la collection bactérienne soumise à l'amplification PCR. Les différentes notations 0 à 3 correspondent à : 0 : absence de l'ET3 (rouge) ; 1 : présence de l'ET3 à la taille attendue (vert) ; 2 et 3 : présence de l'ET3 mais à une taille différente de celle attendue (vert clair), correspondant à deux allèles différents. Les phénotypes sur l'aubergine E6 correspondent à : 0 et 1, hautement résistant (vert foncé) ; 2, moyennement résistant (vert clair) ; 3,1, partiellement résistant (jaune pâle) ; 3,2, infection latente (orange) ; 4, moyennement sensible (rose pâle) ; et 5, hautement sensible (rose foncé) [385]. Les numéros RUN surlignés en jaune correspondent aux souches séquencées dans cette étude. 1* signifie que le gène a été amplifié partiellement avec les amorces externes (soit en 5', soit en 3') et qu'aucune amplification PCR n'a été réalisée avec les amorces internes.

Numéro RUN	Pays	Phylotype	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipAX2	RipN	RipAU	RipAZ1	RipAS	Groupe de répertoire d'effecteurs	Phénotype sur E6
158	Australie	I	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
47	Philippines	I	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2
523	Ile de la Réunion	III	2	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	1	0
657	Ile de la Réunion	III	2	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	1	1
215	Cameroun	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
54	Guyane Française	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0
1986	Guyane Française	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	NA
1987	Guyane Française	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	2
2174	Guyane Française	I	1	1	2	1	1	0	1	1	1	1	2	4
2175	Guyane Française	I	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	4
2176	Guyane Française	I	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	3.1
1029	Inde	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4
994	Indonésie	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	NA
1050	Indonésie	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1240	Indonésie	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
1546	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	2	1	1	1*	1	2	3.1
1740	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2
1743	Côte d'Ivoire	I	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2
1771	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	2
1792	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	5
1793	Côte d'Ivoire	III	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1*	2	2
1867	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	1
1898	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	1
1900	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	5
1916	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
1924	Côte d'Ivoire	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	2
353	Martinique	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	NA
356	Martinique	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1*	2	NA
811	Martinique	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	NA
1143	Martinique	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	NA
106	Afrique du Sud	I	1	1	0	1	1	1	1	1	1*	1	2	1
156	Taiwan	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	2	NA
969	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4
996	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	1*	2	NA
997	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	1
999	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	1	2	NA
1039	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	NA
1042	Thaïlande	I	1	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	2	NA
1994	Guyane Française	IIA	1	1	0	1	1	3	0	2	1	1*	3	2

Numéro RUN	Pays	Phylotype	RipP1	RipP2	RipG3	RipE1	RipAJ	RipAX2	RipN	RipAU	RipAZ1	RipAS	Groupe de répertoire d'effecteurs	Phénotype sur E6
39	Burkina Faso	III	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	4	4
145	Cameroun	III	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1*	4	0
1109	Indonésie	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4	NA
1539	Côte d'Ivoire	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	4	2
1744	Côte d'Ivoire	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4	5
1802	Côte d'Ivoire	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	4	1
3012	Ile de la Réunion	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2
3013	Ile de la Réunion	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4	1
3014	Ile de la Réunion	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2
108	Afrique du Sud	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	4	3.1
85	Taiwan	I	1	0	1	1	1	1	1	0	1*	0	4	NA
155	Taiwan	I	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	4	NA
159	Taiwan	I	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1*	4	NA
133	Cameroun	III	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	5
1984	Guyane Française	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1*	1	5	NA
1985	Guyane Française	I	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	5
17	Martinique	IIB	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	5	2
36	Martinique	IIA	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	5	2
157	Taiwan	I	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	5	4
1002	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	6	2
1008	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	6	NA
1040	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	6	NA
1251	Inde	I	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1*	6	NA
1739	Côte d'Ivoire	I	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	6	2
1747	Côte d'Ivoire	I	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	6	4
58	Ile de la Réunion	IIA	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1*	6	1
59	Ile de la Réunion	IIB	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1*	6	0
150	Cameroun	IIA	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1*	7	NA
1013	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	7	NA
1047	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	7	NA
1234	Inde	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1*	1	7	NA
1114	Indonésie	I	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	7	1
104	Afrique du Sud	I	0	0	0	1	1	1	1	1	1*	1	7	1
1976	Guyane Française	IIB	0	1	1	1	1	1	0	2	1	2*	8	2
1216	Indonésie	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	8	NA
1533	Côte d'Ivoire	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1
1538	Côte d'Ivoire	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	1
1756	Côte d'Ivoire	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	3.2
1854	Côte d'Ivoire	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	2
1032	Thaïlande	I	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	2
147	Cameroun	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	9	4
928	Ile de la Réunion	IIB	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1*	9	3.2
941	Ile de la Réunion	IIB	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1*	9	4
2004	French Guyana	IIB	1	1	0	1	1	0	0	2	1	0	10	2
1753	Côte d'Ivoire	IIA	0	1	1	1	1	1	0	3	1	0	10	5
1761	Côte d'Ivoire	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	10	4
1762	Côte d'Ivoire	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	10	1
1861	Côte d'Ivoire	IIA	0	1	1	1	1	0	0	3	1	0	10	1
1884	Côte d'Ivoire	IIA	1	0	1	1	1	0	0	3	1	0	10	1
1947	Guyane Française	IIB	1	1	0	1	1	0	2	2	1	0	11	3.2
1966	Guyane Française	IIB	1	1	1	1	1	0	2	2	1	0	11	2
1992	Guyane Française	IIB	1	1	0	1	1	0	2	2	1	0	11	2

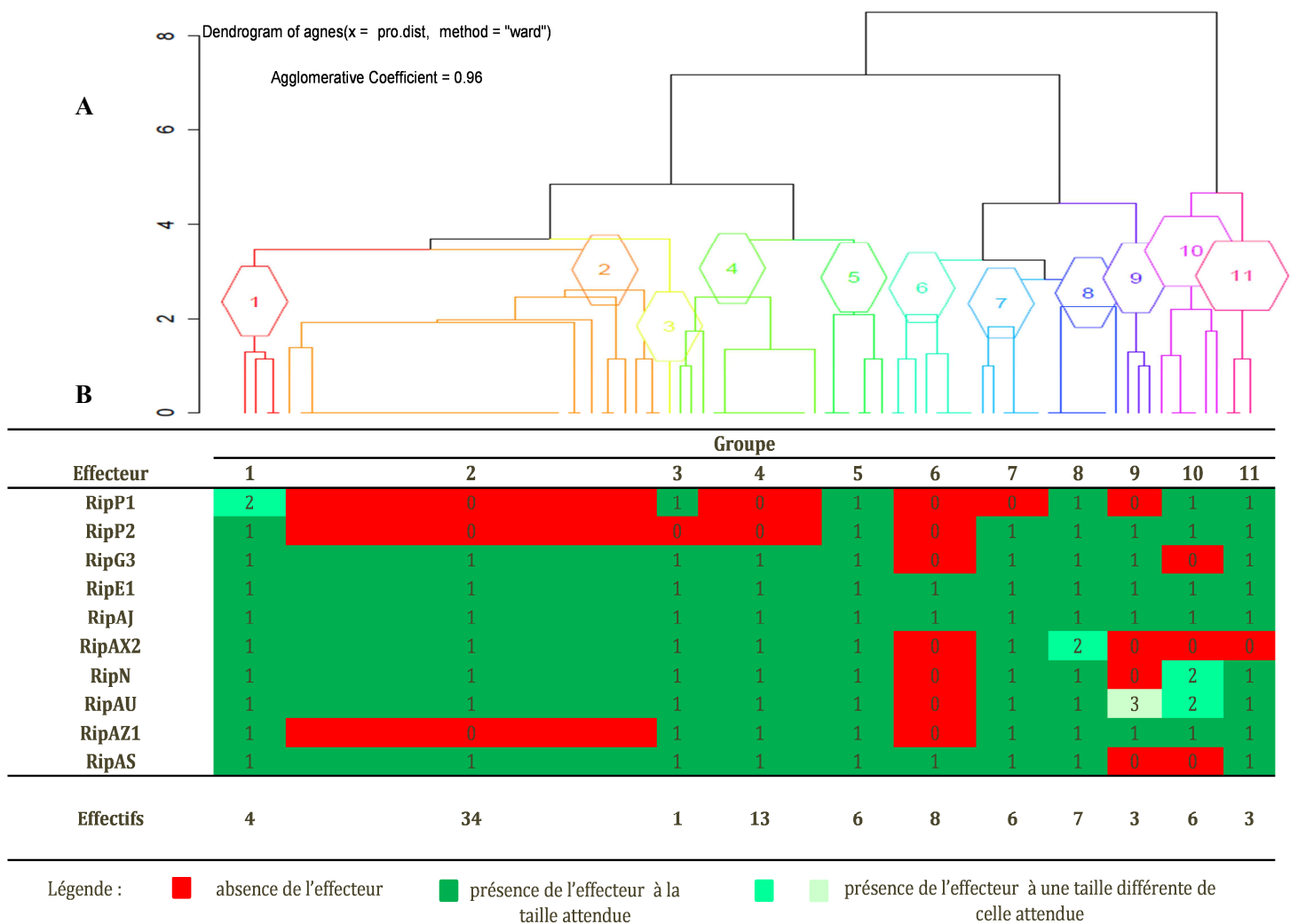


Figure 2. Classification hiérarchique ascendante des 91 souches de *Ralstonia solanacearum* selon leur répertoire d'effecteurs. (A) 11 groupes de souches ont été déterminé en fonction de la présence, l'absence et le polymorphisme de 10 effecteurs de type trois (ET3). (B) Caractérisation des groupes en fonction des effecteurs qu'ils contiennent. La notation correspondent à : 0 : absence de l'effecteur ; 1 : présence de l'effecteur à la longueur attendue ; 2 et 3 : présence de l'effecteur à une longueur différente à celle attendue, avec deux allèles différents.

2.1. Les ET3 présentent une distribution variable et du polymorphisme de taille

RipAJ est le seul ET3 présent chez toutes les souches. *RipE1* est présent chez la quasi-totalité des souches, seule RUN1793 et RUN0039 (phylotype III toutes les deux) en sont dépourvues. Les autres ET3 (*ripP1*, *ripP2*, *ripG3*, *ripN*, *ripAZ1*, *ripAU*, *ripAX2* et *ripAS*) présentent une distribution variable suivant les souches, *ripP1* et *ripP2* étant les moins prévalents (69.1 et 67.0% de souches, respectivement) (**Tableau 3**). C'est *ripAU* qui présente le plus de polymorphisme de taille (3 allèles). En effet, la taille attendue pour ce gène est de 1106 pb mais une taille de 1800 pb a été observée pour 7 souches et une taille de 1950 pb a été observée chez 5 souches. *RipP1* présente aussi du polymorphisme de taille (3 allèles) mais seulement chez RUN0047, RUN0158, RUN0523 et RUN0657. *RipG3* présente du polymorphisme (allèle 2) chez trois souches guyanaises de phylotype I (RUN2174, RUN2175 et RUN2176). *RipAJ* présente du polymorphisme de taille chez RUN0159, une souche taïwanaise de phylotype I. *RipAX2* est polymorphe chez trois souches ivoiriennes de phylotype I (RUN1546, RUN1740 et RUN1747) et une souche guyanaise de phylotype IIA (RUN1994). Alors que l'allèle le plus fréquent a une taille de 657 pb, les trois souches ivoiriennes présentent des tailles de gènes beaucoup plus grandes (respectivement 2115 pb, 1940 pb et 1943 pb), suggérant l'existence d'une séquence d'insertion, tandis que la souche guyanaise a une séquence plus courte (628 pb), suggérant la délétion d'une partie du gène. *RipAZ1* est seulement polymorphe chez la souche RUN1793 (phylotype III) et *ripAS* l'est uniquement chez la souche RUN1976 (phylotype IIB). Aucun polymorphisme de taille n'a été observé pour les gènes *ripP2* et *ripE1* (**Tableau 3**).

2.2. Les répertoires d'ET3 sont structurés en 11 groupes

Dans un premier temps, une analyse multivariée a permis de regrouper les souches selon leur répertoire d'ET3. Dans un second temps, des souches représentatives de ces différents groupes ont été sélectionnées pour tester leur phénotype sur aubergine E6. En tenant compte de la présence ou de l'absence des ET3 de chaque souche et du polymorphisme de taille observé, 11 groupes ont été définis (**Figure 2**). La classification obtenue montre que le groupe 3 est le seul groupe contenant une seule souche avec un répertoire d'ET3 différents des autres (absence de *ripP2*) : RUN1994. Les groupes 1, 5 et 8 ont le même contenu en ET3 mais se différencient par le polymorphisme de taille des gènes étudiés. Il est à noter que le groupe 5 regroupe des souches ayant un répertoire d'ET3 conservé. Les groupes 9 et 10 regroupent des souches au contenu en ET3 quasiment opposé à celui du groupe 2 (mis à part les gènes présents chez toutes les souches) : les gènes absents des groupes 9 et 10 sont présents dans le groupe 2. Le groupe 6 regroupe les souches possédant le moins d'effecteurs par rapport aux autres groupes : en effet, les souches ne sont caractérisées que par la présence de *ripE1*, *ripAJ* et *ripAS* (**Figure 2**). Ainsi, cette distinction en plusieurs groupes va permettre de vérifier si les souches contenues dans ces différents groupes induisent des phénotypes contrastés (i.e. virulence/avirulence) sur aubergine E6.

Les groupes de souches définis selon leur contenu en ET3 peuvent être comparés aux groupes phylogénétiques (**Tableau 3**). Les groupes définis associent en général des souches de plusieurs phylotypes : les groupes 1, 2 et 4 regroupent des souches de phylotype I et une à trois souches de phylotype III. Le groupe 3 ne comprend que la souche RUN1994 de phylotype IIA, et les groupes 6, 7 et 8 contiennent des souches de phylotype I avec une ou deux souches de phylotype IIA et une souche de phylotype IIB. Les groupes 9 et 11 sont uniquement composés de souches de phylotype IIB et le groupe 10 est composé de souches IIA et d'une souche IIB. Enfin, le groupe 5 présente une composition particulière puisqu'il regroupe des souches de phylotype I ainsi que les souches des phylotypes IIA, IIB et III.

2.2.1. Certains ET3 présentent des phylogénies incongruentes par rapport à la phylogénie basée sur des gènes de ménage

Le séquençage des 8 gènes de ménage a permis de reconstituer la phylogénie de l'ensemble des souches étudiées. L'arbre phylogénétique obtenu permet de répartir les souches dans quatre grands groupes correspondant aux phylotypes I, IIA, IIB et III de *R. solanacearum* (**Figure 3**). Le phylotype III est divisé en deux sous-groupes selon l'origine géographique des souches : un groupe composé de souches d'Afrique de l'Ouest (RUN1793 et RUN0039) et un autre groupe comprenant des souches de l'Afrique Centrale (RUN0133 et RUN0145) ainsi que deux souches originaires de La Réunion (RUN0523 et RUN0657). Le phylotype IIB est composé de deux sous-groupes comprenant des souches d'origines différentes : de Martinique et de Guyane pour un groupe et de La Réunion et du Cameroun pour l'autre. Le phylotype IIA est aussi divisé en deux sous-groupes contenant des souches d'origines diverses. Le phylotype I permet de distinguer globalement quatre grands groupes et quelques souches isolées. Un premier sous-groupe rassemble des souches d'Afrique du Sud, de Côte d'Ivoire, de La Réunion et d'Inde. En réalité, ce sous-groupe correspond aux souches du CC06 identifiés par [427]. Un deuxième sous-groupe conglomère des souches provenant de Guyane, du Cameroun, de Taïwan ainsi que d'Indonésie. Le troisième sous-groupe regroupe, quant à lui, des souches provenant d'Inde, d'Indonésie, de Thaïlande ainsi que de Côte d'Ivoire. Le dernier sous-groupe est hétérogène et rassemble des souches provenant d'Asie (Indonésie, Thaïlande, Taïwan). Finalement trois souches de Thaïlande (RUN1032, RUN0996, RUN0999) et une souche Guyanaise (RUN2176) sont isolées des autres groupes de souches. Cela indique que les souches du phylotype I ne sont pas forcément regroupées selon leur origine géographique. La majorité des souches du phylotype I présentent des longueurs de branches très courtes. Il est à noter que la souche RUN2175 (originaires de Guyane française), bien qu'identifiée comme appartenant au phylotype I, se retrouve isolée et très éloignée des autres souches de phylotype I.

Phylotype I

Phylotype III

Phylotype IIA

Phylotype IIB

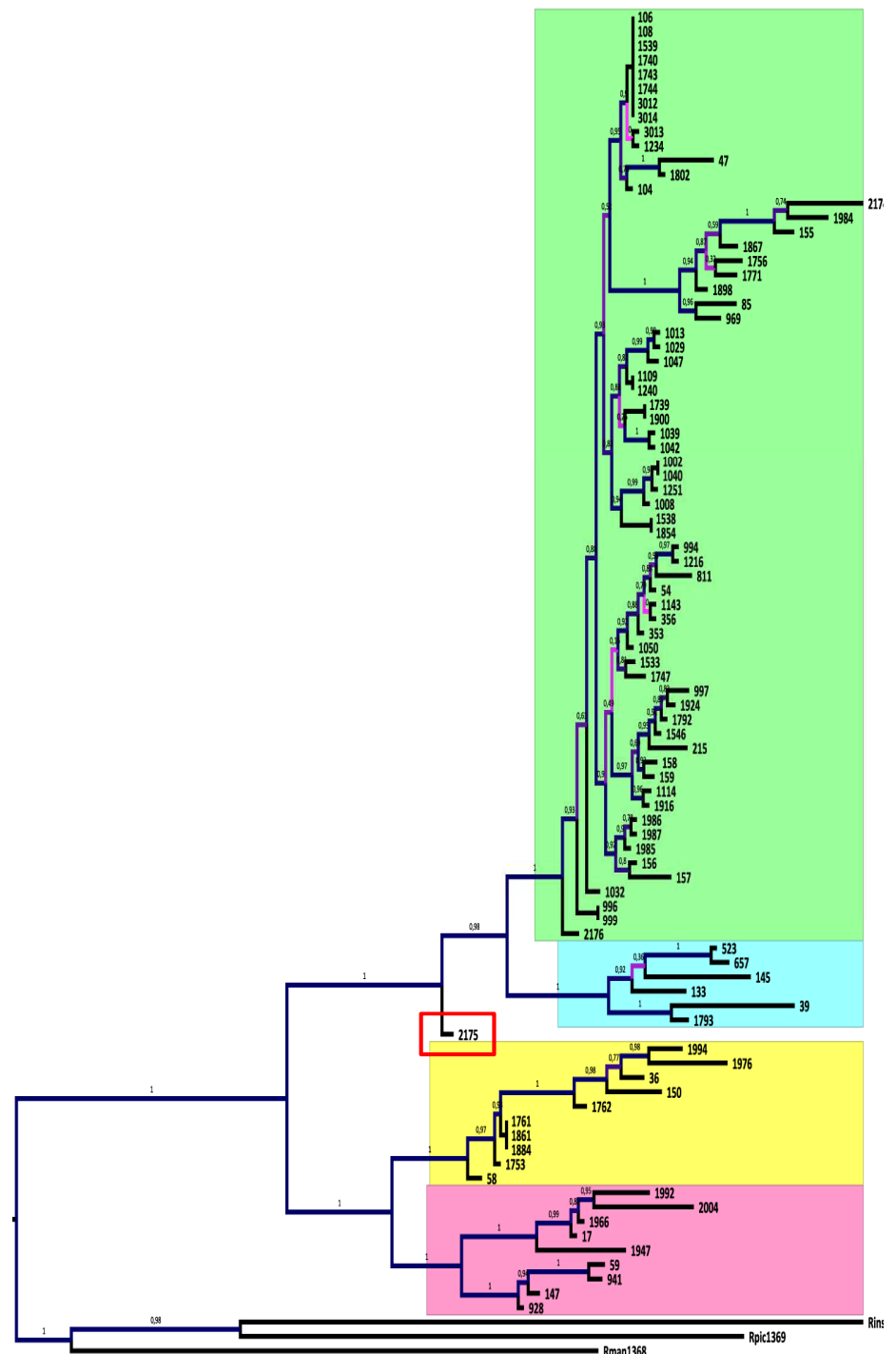


Figure 3. Arbre phylogénétique construit par la méthode « Approximate Maximum-likelihood » (modèle de substitution GTR+CAT), basé sur le concaténât des séquences nucléiques 8 gènes de ménage (*gdhA*, *mutS*, *adh*, *leuS*, *rplB*, *gyrB*, *Egl* et *fliC*) de 91 souches de *R. solanacearum*. La robustesse de chaque nœud est estimée par le *SH-test* (1000 ré-échantillonnages). L'arbre est enraciné avec les séquences des 8 gènes de ménage des souches de *R. mannitolylitica* (Rman 1368), *R. insidiosa* (Rins 1367) et *R. pickettii* (Rpic1369). Les cadres surlignés en rose, jaune, bleu et vert correspondent aux souches appartenant respectivement aux phylotypes IIB, IIA, III et I. Les flèches indiquent les souches de référence des phylotypes I (GMI1000), IIA (CFBP1683), IIB (CFBP2957) et III (CMR15).

Figure 4. Arbres phylogénétiques des effecteurs *RipP1*, *RipP2*, *RipE1*, *RipN* et *RipAU* des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée.

Figure 4a. Arbre phylogénétiques construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *ripP1* des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice de *bootstrap* (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, et CFBP6783 au phylotype IIB.

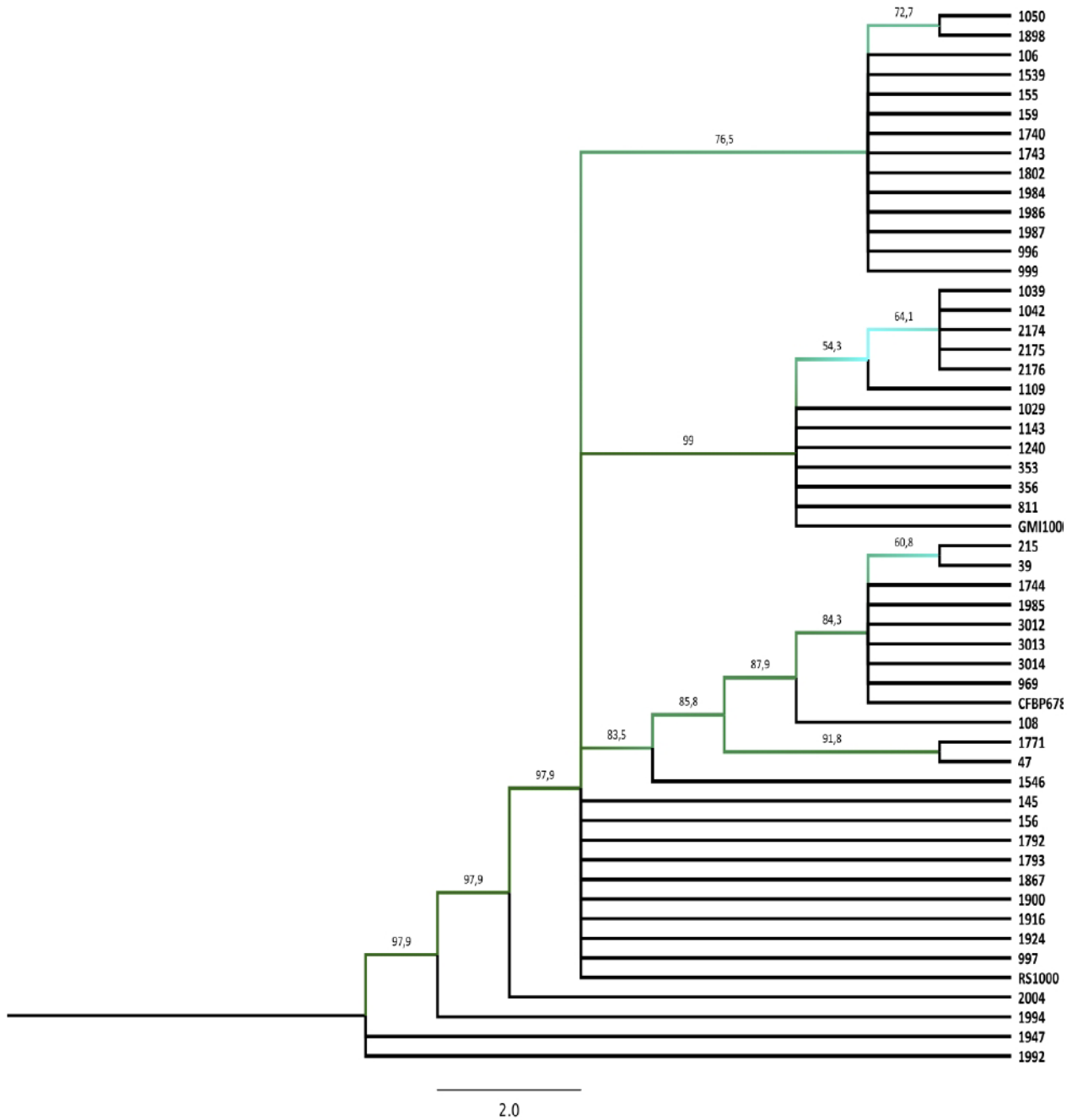


Figure 4b. Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *ripP2*, des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice de *bootstrap* (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, et CMR15 est la souche de référence appartenant au phylotype III.

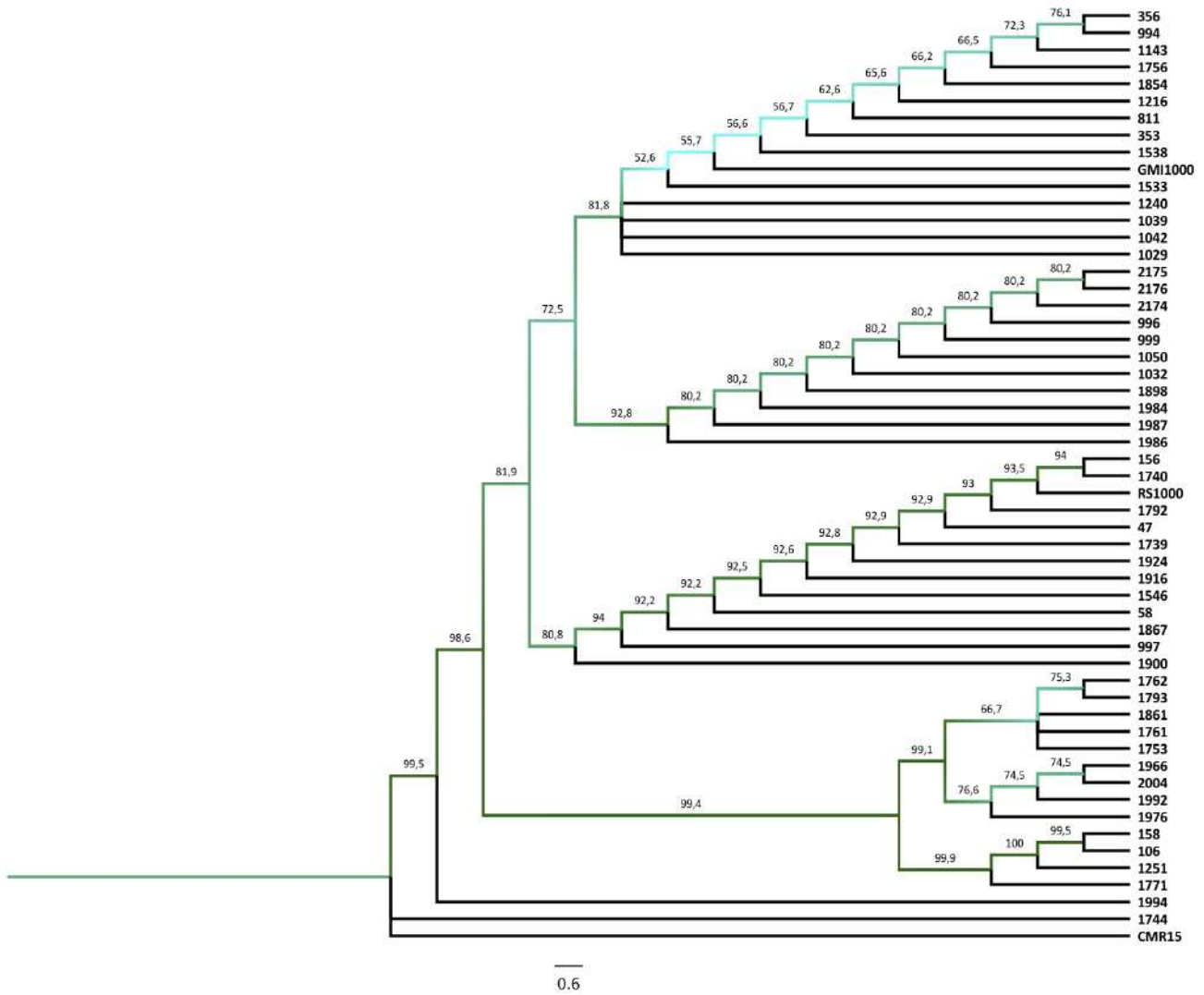


Figure 4c. Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *ripE1* des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice de *bootstrap* (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I, CFBP2957 au phylotype IIA, et CMR15 au phylotype III.

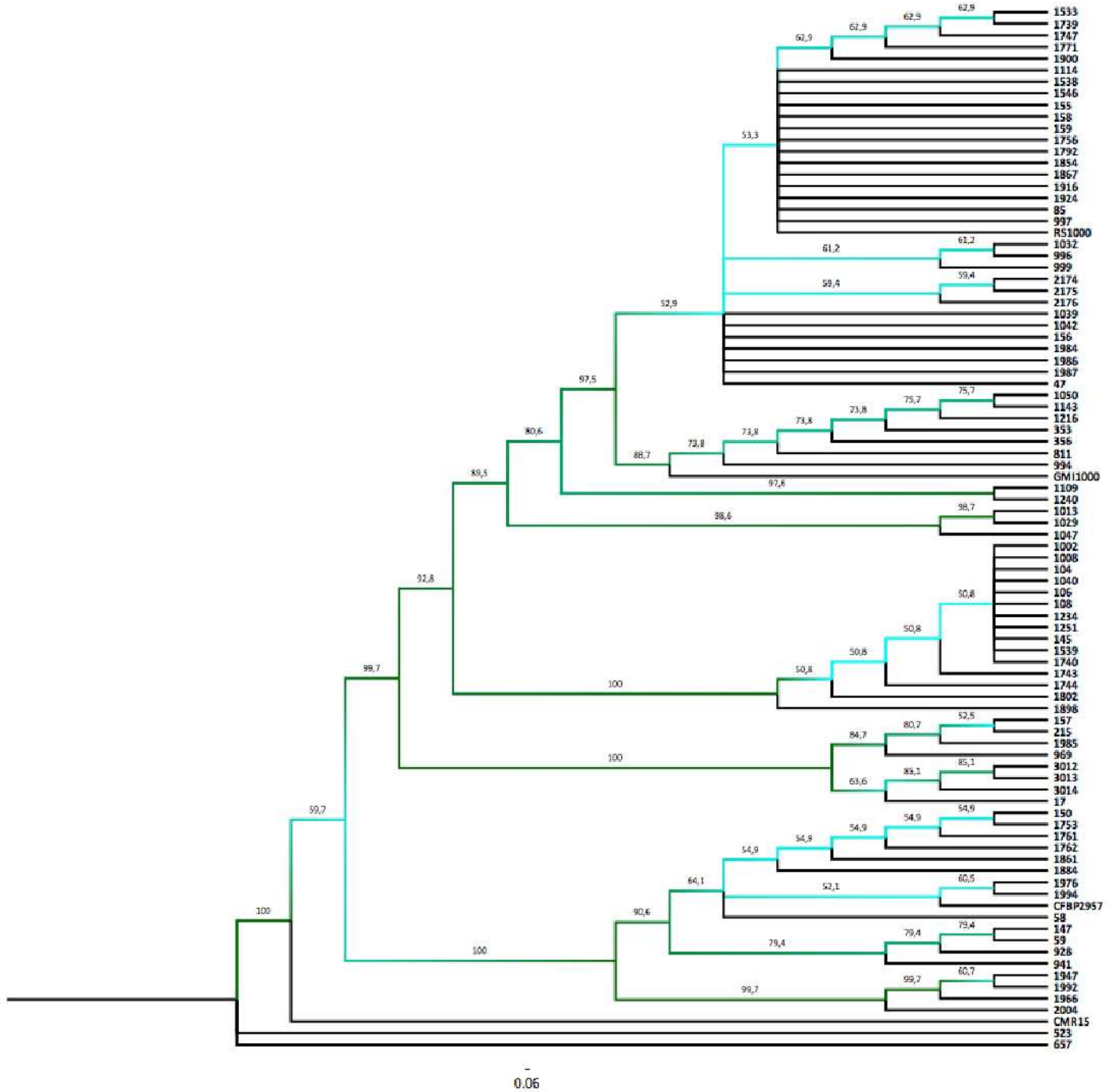


Figure 4d. Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *ripN* des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice de *bootstrap* (paramétrés à 1000). GMI1000 et RS1000 sont des souches de référence appartenant au phylotype I.

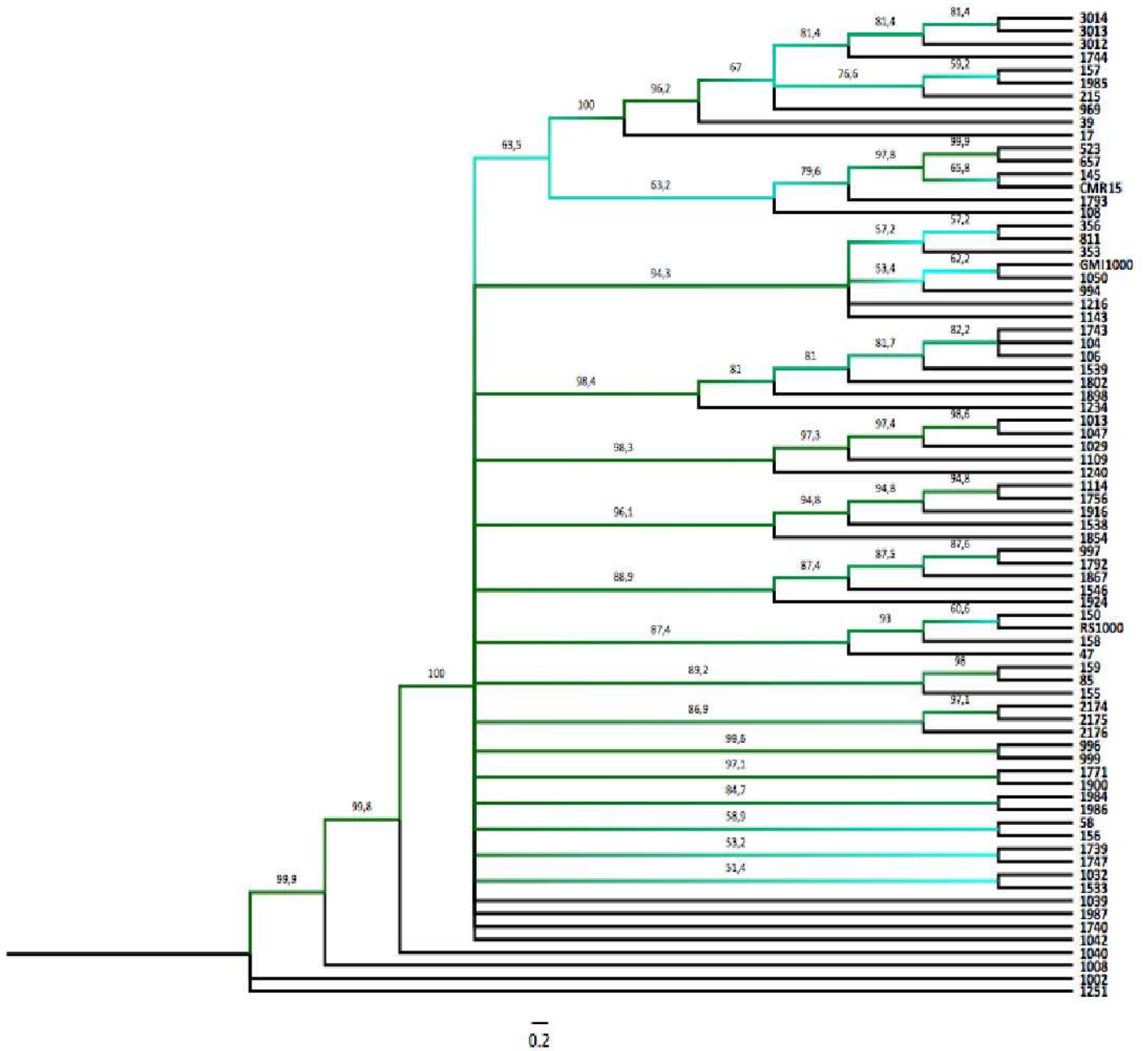
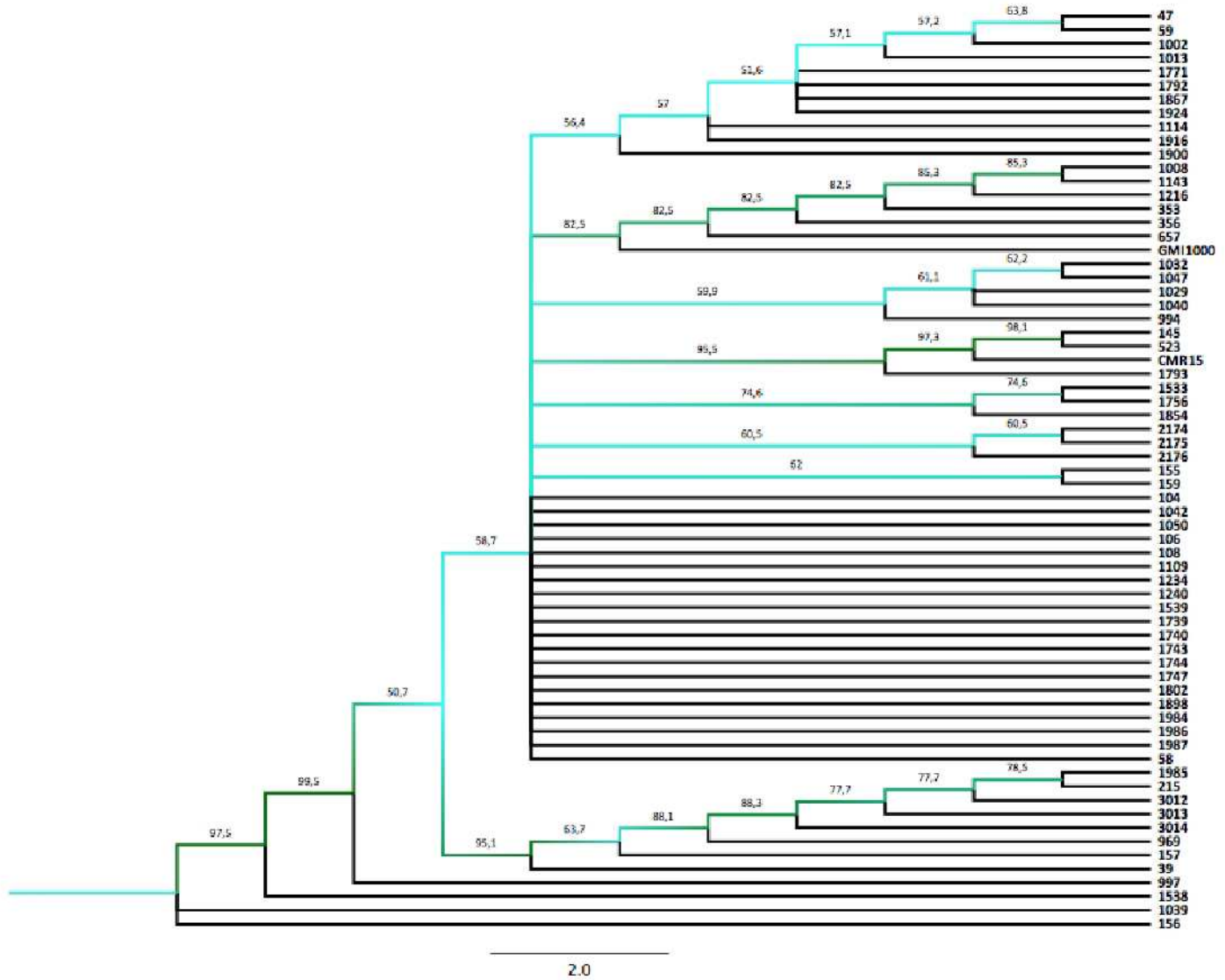


Figure 4e. Arbre phylogénétique construit par la méthode Neighbour-Joining, basé sur les séquences protéiques de *ripAU* des souches de *R. solanacearum* de la collection bactérienne étudiée. La robustesse de chaque nœud est estimée par l'indice de *bootstrap* (paramétrés à 1000). GMI1000 est une souche de référence appartenant au phylotype I et CMR15 une souche de référence appartenant au phylotype III.



Le séquençage des différents ET3 permet l'analyse de la variabilité allélique de ces gènes ainsi que l'identification d'incongruences en comparant la phylogénie basée sur les ET3 avec la phylogénie basée sur les gènes de ménage. Les arbres phylogénétiques de 5 ET3 ont été réalisés au cours de cette étude : *ripP1*, *ripP2*, *ripE1*, *ripN* et *ripAU* (**Figure 4a à 4e**), les autres étant en cours d'analyse. **Pour *ripP1***, la plupart des souches de phylotype I se regroupent de la même façon que la phylogénie construite à partir des gènes de ménage. De plus, les quatre souches de phylotype IIB sont regroupées au sein d'un même sous-groupe. Cependant, les souches de phylotype I RUN3012, RUN3013 et RUN3014 sont regroupées dans la même branche que la souche de référence du phylotype IIB (CFBP6783), ce qui n'est pas observé pour la phylogénie basée sur les gènes de ménage. **Pour *ripP2***, l'arbre se divise principalement en quatre grands groupes : trois groupes composés de souches essentiellement de phylotype I, et un dernier groupe composé de souches appartenant aux phylotypes I, IIA et IIB. Concernant l'arbre phylogénétique de ce gène trois souches sont isolées : RUN1994, RUN1744 et CMR15. L'arbre obtenu sur les séquences *ripE1* est composé de (i) cinq grands groupes contenant des souches spécifiques au phylotype I, (ii) un groupe avec seulement des souches de phylotypes IIB et (iii) un autre groupe composé uniquement de souches de phylotype IIA. Ce regroupement est aussi observé sur l'arbre phylogénétique basé sur les gènes de ménage. Il est à noter que CMR15, RUN0523 et RUN0657 sont différenciées des autres souches. L'arbre obtenu **pour *ripN*** présente une variabilité allélique beaucoup plus importante que les autres effecteurs. De nombreuses souches sont regroupées par « paires » ou sont isolées des autres souches. De plus, la majorité de souches de phylotype I sont regroupées avec les souches de référence (GMI1000 ou RS1000) et on observe un groupe ne contenant spécifiquement que des souches de phylotype III. Enfin, l'arbre obtenu pour *ripAU* montre un groupe spécifique au phylotype III (souches RUN0145, RUN0523, CMR15 et RUN1793) et le reste des souches se répartissent de façon très variable quel que soit le phylotype. Considérant la variabilité allélique de chaque effecteur, les plus variables sont *ripN*, *ripAZ1* et *ripP2* si l'on se fie au rapport G/N, tandis que les moins variables sont *ripP1* et *ripAX2* (**Tableau 4**). En revanche, *ripP1* est le gène qui présente le plus d'incongruences phylogénétiques (22,2% de souches positionnées différemment de la phylogénie « neutre »), suivi de *ripP2*, *ripAX2*, *ripAZ1*. *RipAS* semble le plus proche de la phylogénie neutre.

Tableau 4. (A) Variabilité allélique et (B) incongruences phylogénétiques, rangées par ordre décroissant, sur les effecteurs de type III considérés.

A				B	
Effecteur	Nombre de souches	Nombre d'allèles	G/N	Effecteur	Nombre de souches dont la position sur la phylogénie ET3 diffère de la phylogénie MLSA
RipP2	61	43	0,7	RipP1	14/63 (22,2%)
RipN	80	51	0,64	RipP2	5/61 (8,19 %)
RipAZ1	80	51	0,64	RipAX2	6/75 (8,00 %)
RipE1	89	47	0,53	RipAZ1	6/80 (7,50 %)
RipAS	79	37	0,47	RipE1	5/89 (5,61 %)
RipAJ	91	38	0,42	RipG3	4/80 (5,00 %)
RipAU	83	34	0,41	RipAU	4/83 (4,81 %)
RipG3	80	30	0,38	RipN	3/80 (3,75 %)
RipP1	63	14	0,22	RipAJ	3/91 (3,29 %)
RipAX2	75	13	0,17	RipAS	2/79 (2,53 %)

Tableau 5. Pouvoir pathogène et phénotype de virulence de 20 souches de *R. solanacearum* de phylotype I. Les souches ont été inoculées sur cultivars E6 et E8 sur aubergine, puis le phénotype d'interaction a été estimé par les indices de flétrissement et de colonisation finaux.

Origine géographique	Numéro RUN	Répertoires d'effecteurs	Cultivar E6 ^x				Cultivar E8 ^x
			Flétrissement ^y	Colonisation ^y	Phénotype ^z	Flétrissement ^y	
Philippines	47	1	0 ± 0,0 ab	25 ± 21,2 ab	2	80 ± 14,1 ab	
Australie	158	1	5 ± 7,07 ab	10 ± 14,1 ab	1	55 ± 21,2 abc	
Afrique du Sud	106	2	0 ± 0,0 ab	0 ± 0,0 ab	1	30 ± 0,0 abc	
Indonésie	969	2	60 ± 28,2 ab	70 ± 14,1 ab	4	5 ± 7,1 c	
Thaïlande	997	2	5 ± 7,1 ab	10 ± 14,1 ab	1	75 ± 21,2 ab	
Inde	1029	2	62 ± 21,2 ab	70 ± 28,3 ab	4	65 ± 35,3 abc	
Indonésie	1050	2	0 ± 0,0 ab	10 ± 0,0 ab	1	10 ± 0,0 c	
Indonésie	1240	2	20 ± 14,1 ab	25 ± 21,2 ab	2	100 ± 0,0 abc	
Guyane	1987	2	20 ± 14,1 ab	40 ± 42,3 ab	2	25 ± 7,1 bc	
Guyane	2174	2	70 ± 0,0 b	70 ± 0,0 b	4	85 ± 21,2	
Guyane	2175	2	45 ± 35,3 ab	60 ± 28,3 ab	4	70 ± 28,3	
Guyane	2176	2	40 ± 0,0 ab	50 ± 0,0 ab	3,1	55 ± 7,1 abc	
Afrique du Sud	108	4	40 ± 14,1 ab	50 ± 14,1 ab	3,1	35 ± 49,5 abc	
Ile de La Réunion	3012	4	25 ± 7,1 ab	35 ± 7,1 ab	2	75 ± 21,2 ab	
Ile de Réunion	3013	4	10 ± 0,0 a	15,7 ± 7,1 a	1	45 ± 21,2 abc	
Ile de Réunion	3014	4	20 ± 14,1 ab	45 ± 21,2 ab	0	95 ± 7,1 a	
Inde	1002	6	20 ± 0,0 ab	30 ± 0,0 ab	2	95 ± 7,1 a	
Afrique du Sud	104	7	0 ± 0,0 ab	15 ± 7,1 ab	1	10 ± 0,0 c	
Indonésie	1114	7	5 ± 7,1 ab	15 ± 21,2 ab	1	90 ± 14,1 a	
Thaïlande	1032	8	0 ± 0,0 ab	20 ± 0,0 ab	2	85 ± 21,2 a	

^x: E6 et E8 correspondent respectivement aux cultivars résistant et sensible. , Moyennes ± écart-types de deux réplicats (10 plants chacun).

^y: Flétrissement : pourcentage moyen final de plants flétris ; Colonisation : taux de plants flétris ou asymptotiques et colonisés, sur le nombre total de plants. Les valeurs suivies des mêmes lettres dans la même colonne ne sont pas significativement différentes (Tukey test, $p = 0,05$).

^z: Le nombre assigné à chaque souche correspond au score phénotypique défini par la combinaison de l'incidence de flétrissement et le taux de colonisation finaux et calculé selon [385] 1 = très résistant ; 2 = moyennement résistant ; 3,1 = partiellement résistant ; 4 = moyennement sensible. Le phénotype obtenu sur E8 n'a pu être calculé, du fait de l'absence des données de colonisation.

2.2.2. Les répertoires d'ET3 ne sont pas associés à un phénotype sur l'aubergine E6

Afin de tester l'hypothèse d'un répertoire d'ET3 associé à un phénotype (virulent/avirulent) sur aubergine E6, 20 souches ont été sélectionnées pour tester leur pouvoir pathogène. Ces souches sont toutes de phylotype I et ont été choisies parmi les 11 groupes définis la diversité des répertoires d'ET3 ainsi que la diversité des origines géographiques (**Tableau 5**). Ces 20 souches viennent compléter les études préalablement réalisées sur 48 souches [376, 425, 427], soit un total de 68 souches phénotypées sur les 91 étudiées (**Tableau 3**).

Dans cette étude, l'utilisation du cultivar E8 sensible permet de détecter les souches très peu virulentes et de vérifier l'agressivité des souches. Cependant, seules les données de flétrissement ont été prises en compte dans cette étude, du fait de l'absence de données de colonisation sur E8. L'incidence de flétrissement et le taux de colonisation sur E6 n'étant pas significativement différents entre les deux répétitions (respectivement $p = 0.209$ et 0.365), les analyses sont basées sur les résultats moyens (**Tableau 5**). 7 souches parmi les 20 inoculées semblent être agressives sur E8 : elles présentent un flétrissement supérieur à 85%. La souche RUN1240 est la seule qui a provoqué 100% de flétrissement sur les plantes E8. Trois souches (RUN0104, 969 et 1050) sont considérées comme très peu agressives sur E8, étant donné le faible pourcentage de flétrissement engendré (moins de 20%). Cependant, les valeurs de flétrissement de RUN0969 et de RUN0108 sont plus élevées chez le cultivar E6 résistant que chez E8 sensible. Chez le cultivar résistant E6, les souches RUN0969, 1029, 2174 et 2175 ont provoqué des taux de flétrissement supérieurs à 50% ainsi que des taux de colonisation importants. De plus, le score phénotypique associé à ces souches est le plus élevé : il est de 4, correspond à un cultivar moyennement sensible [425]. Les autres souches montrant de faibles taux de flétrissement ont peu colonisé E6. Ces souches sont associées à des scores phénotypiques de 1 (très résistant), 2 (moyennement résistant) et 3,1 (partiellement résistant), ce qui correspond à des cultivars qualifiés de résistants. Les groupes génotypiques (basés sur les répertoires d'ET3) 1 et 7 regroupent des souches peu virulentes (score phénotypique de 0 à 2) sur E6. La seule souche appartenant au groupe 4 (RUN1994) est modérément virulente sur E6 (score phénotypique de 2). Les souches des groupes 2, 4, 5 et 10 présentent des phénotypes très contrastés sur E6. En effet, certaines souches sont peu virulentes voire modérément virulentes (scores phénotypiques de 1 à 2) alors que d'autres sont extrêmement virulentes sur E6 (score phénotypique de 5). Les groupes 6 et 8 rassemblent des souches peu voire pas virulentes (score phénotypique de 0 et 1) avec des souches assez virulentes sur E6 (scores phénotypiques de 3.2 à 4). Les souches appartenant au groupe 9 sont assez virulentes sur E6 (scores phénotypiques de 3 à 4). Le groupe 11 associe des souches moyennement virulentes (scores phénotypiques de 2 à 3.2). Au vu de ces résultats, le répertoire d'ET3 d'une souche n'apparaît pas comme un facteur de structuration de la virulence sur l'aubergine E6. Ce point confirme le constat déjà fait lors de l'étude de Pensec et coll. [376] et pourrait être étayé par de plus amples analyses telles qu'une classification hiérarchique ascendante des souches basée sur leur répertoire d'effecteurs ainsi que sur leur phénotype.

Tableau 6. Caractéristiques des génomes séquencés au sein de notre équipe. Les scores phénotypiques correspondent à : 0 : non virulente ; 1 : peu virulente ; 2 : moyennement virulente ; 4 : assez virulente ; 5 : très virulente.

Code RUN	Souche	Phylotype	Taille moyenne de reads (bp)	Nb de reads	Couverture du génome	Phénotype sur E6		Nb d'ET3 présents	Nb de pseudogènes
						Score phénotypique	Virulence Avirulence		
RUN3012	RD13.01	I	2x150	3,282,572	86x	1	AVIR	71	5
RUN0215	CFBP7058	I	2x150	2,938,313	77x	2		71	3
RUN3012	TD13.01	I	2x150	4,147,527	111x	2		72	4
RUN3014	TF31.08	I	2x150	2,812,113	72x	2		73	4
RUN0039	CFBP3059	III	2x150	3,550,998	93x	4	VIR	55	7
RUN0157	PSS04	I	2x150	4,818,361	124x	4		67	5
RUN0969	To10	I	2x150	2,552,636	66x	4		71	2
RUN1985	CIR011-208	I	2x150	4,256,372	112x	4		73	4
RUN1744	CIV 23	I	2x150	3,207,602	88x	5		72	5

Tableau 7. Répertoire d'effecteurs (10 gènes) des souches séquencées dans l'équipe et de trois souches de référence. Les scores phénotypiques correspondent à : 0 : non virulente ; 1 : peu virulente ; 2 : moyennement virulente ; 4 : assez virulente ; 5 : très virulente. Les couleurs pour les effecteurs correspondent à : vert : présence de l'effecteur ; rouge : absence de l'effecteur ; gris : présence de l'effecteur avec un décalage du cadre de lecture. Souche* : Souche de référence dont le génome est disponible sur le site web « Ralstonia T3E » [280].

Code RUN	Phénotype E6												
	RUN0054	RUN3012	RUN0027	RUN0215	RUN3012	RUN3014	RUN0157	RUN1985	RUN0969	RUN0039	RUN0133	RUN1744	
Autre nom	GMI1000	RD13.01	CFBP2957	CFBP7058	TD13.01	TF31.08	PSS04	CIR011-208	To10	CFBP3059	CMR15	CIV 23	
Phénotype E6	Score phénotypique	0	1	2	2	2	2	4	4	4	4	5	5
Effecteurs	Description	Virulence			AVIRULENCE				VIRULENCE				
Effecteurs	Description	*	*										
RipE1		[Green]											
RipG3	Protéine GALA3 avec F-box LRR	[Green]											
RipN	Nudix hydrolase	[Green]											
RipP1	(PopP1) putative acetyltransferase	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]
RipP2	(PopP2) acetyltransferase	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]
RipAJ		[Green]											
RipAS		[Green]											
RipAU		[Green]											
RipAX2	Metallo-protéase avec un domaine de liaison zinc dépendant	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]	[Red]
RipAZ1		[Green]											

2.2.3. L'analyse des séquences génomiques permet de comparer les répertoires complets d'effecteurs

Les souches de phylotype I séquencées lors de cette étude contiennent entre 67 et 73 effecteurs et possèdent 2 à 7 pseudogènes de leur génome, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus pour GMI1000 [283]. En revanche, la souche de phylotype III RUN0039 (CFBP3059) ne contient 55 effecteurs, un répertoire moins riche que celui de la souche de référence du phylotype III CMR15 qui en possède 68 [273]. Ces souches possèdent aussi moins d'effecteurs que les souches de phylotype I (**Tableau 6**).

Nous avons également comparé les répertoires d'effecteurs de nos 9 génomes à 3 génomes de référence : GMI1000 (I), CFBP2957 (IIA) et CMR15 (III). Parmi nos dix effecteurs candidats, *ripG3*, *ripAJ* et *ripAU* sont les effecteurs les plus conservés et sont retrouvés dans les 12 souches étudiées alors que celles-ci possèdent un profil de virulence différent sur E6. Il en est de même pour *ripAZI*, présent chez toutes les souches mais à l'état de pseudogène chez CMR15 (RUN0215). *RipAS* et *RipE1* sont seulement absents chez la souche CFBP3059 (RUN0039) et présents chez toutes les autres souches. *RipP1* est absent chez CFBP2957 (RUN0027), une souche avirulente sur E6 ; PSS4 (RUN0157), une souche virulente et agressive sur E6 et CMR15 (RUN0133), une souche très agressive sur E6. *RipAX2* et *ripP2* sont les effecteurs les plus variables et sont respectivement présents chez 5 souches (CFBP2957, PSS04, CIR011-208, CFBP3059 et CMR15) et 7 souches (RD13.01, CFBP2957, TD13.01, TF31.08, PSS04, CFBP3059 et CIV 23) dont la virulence sur E6 est différente entre elles. Au vu de la variabilité de répartition des effecteurs dans les 12 souches étudiées et de la composition en ET3, la présence ou l'absence d'un seul effecteur n'apparaît pas corrélée à la virulence (**Tableau 7**).

2.2.4. L'analyse des répertoires complets d'effecteurs permet d'identifier des candidats

Nous avons également comparé les répertoires d'effecteurs des souches avirulentes (phénotype 0, 1, 2) et virulentes (phénotype 4 et 5) sur E6, en cherchant spécifiquement les effecteurs spécifiquement présents dans un *pool* et absents dans l'autre. *RipAX2* et *ripP1* semblent spécifiquement associés aux génomes avirulents (**Tableau 8**), bien que deux souches avirulentes (To10 et RUN1744) comportent *ripAX2*. Par ailleurs, *ripG1* semble associé à de la virulence, présent dans la majorité des souches virulentes (**Tableau 8**).

Tableau 8. Effecteurs de type III spécifiquement présents ou absents dans les génomes de souches avirulentes.

Famille	Description	≤ 2 sur E6 (6 génomes)	4 ≤ sur E6 (6 génomes)
RipAX2	Metallo-protéase avec un domaine de liaison zinc-dépendant	0.83	0.33
RipP1	(PopP1) acetyltransferase putative	0.83	0.67
RipAG		0.67	0.5
RipP2	(PopP2) Acetyltransferase	0.33	0.5
RipAL	Domaine Lipase	0.33	0.67
RipG1	Protéine GALA1 avec F-box LRR	0.33	0.83

3. Conclusion partielle

Dans l'ensemble, la phylogénie basée sur les gènes de ménage ne met pas en évidence une structuration claire des souches selon leur origine géographique. En effet, certaines souches de même phylotype ou proches géographiquement, ne sont pas forcément toujours regroupées sur l'arbre phylogénétique. Cette absence de corrélation nette entre l'origine géographique et la position sur l'arbre MLSA pourrait être expliquée par des événements de migration à longue distance des populations bactériennes médiés par les échanges de matériel génétique entre les différentes zones de productions des Solanacées [166].

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une distribution variable des 10 ET3 candidats au sein d'une collection de souches phylogénétiquement diverses et dont certaines proviennent d'une même zone géographique. Certains ET3 présentent peu (*ripAJ*) voire pas (*ripE1* et *ripP2*) de polymorphisme de taille alors que d'autres (*ripAU*) sont extrêmement polymorphes. De plus, *ripAJ* et *ripE1* sont les ET3 les plus partagés entre les différentes souches de notre collection alors que *ripP1* et *ripP2* sont les moins fréquemment retrouvés dans ces souches. La variabilité de ces effecteurs a également été décrite précédemment par [271, 376] grâce à une approche d'association génotype-phénotype. Ce premier criblage nous a permis de déterminer les répertoires d'effecteurs de 91 souches et de les classer en 11 groupes. Cependant, la confrontation entre les données phénotypiques et les données génotypiques ne permet pas d'associer un phénotype sur aubergine E6 à un répertoire d'ET3. Certaines souches possèdent un même répertoire d'ET3 mais présentent des phénotypes différents sur l'aubergine résistante E6. D'après cette étude, la virulence ou l'avirulence d'une souche n'apparaît pas être expliquée par son répertoire d'ET3. Cependant, cette conclusion doit être prise avec du recul car elle se limite à seulement 10 ET3 candidats alors qu'une souche de *R. solanacearum* peut en contenir jusqu'à 80 [352].

La phylogénie engendrée par l'analyse des séquences d'ET3 a révélé des cas d'incongruence avec la phylogénie des gènes de ménage, notamment sur *ripP1*, *ripAZ1* et *ripAX2*. Les différents cas d'incongruence relevés ici suggèrent des événements de recombinaison et de transferts horizontaux. L'existence d'événements de recombinaison et leur localisation pourrait être confirmée en effectuant des analyses de recombinaison à l'aide du logiciel RDP [460]. Les analyses de diversité nucléotidique

et de pression de sélection sur les séquences des différents effecteurs apporterait également un éclairage nouveau sur les contraintes évolutives portant sur ces gènes.

Pensec et coll. [376] ont émis l'hypothèse que, pour *R. solanacearum*, la présence, l'absence ou le polymorphisme d'un seul ET3 serait plus probablement responsable du phénotype d'une souche plutôt que son répertoire d'ET3. Dans cette perspective, nous avons adopté une approche fonctionnelle basée sur l'étude de la fonction d'avirulence des 10 ET3 candidats. Pour cette approche, une première hypothèse serait qu'un effecteur d'avirulence muté chez GM11000 provoquerait un passage à l'état virulent sur l'aubergine E6. Une deuxième hypothèse serait que l'injection d'un seul effecteur à la fois déclencherait les réactions de défense de la plante telles que la diminution de la croissance *in planta* des bactéries exprimant cet effecteur ou encore une réaction hypersensible (HR), caractérisée par un brunissement des zones infestées et par l'effondrement des tissus du mésophylle.

4. Publication

Cette partie a donné lieu à un court article accepté dans la revue « Genome Announcement », intitulé « **Draft Genome sequence of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*)** » Guinard J., Vinatzer A. B., Lefeuvre P., Poussier S., and Wicker E. (2015), *Publié le 28 Janvier 2016*.

Draft Genome Sequences of Nine Strains of *Ralstonia solanacearum* Differing in Virulence to Eggplant (*Solanum melongena*)

Jérémy Guinard,^{a,b} Boris A. Vinatzer,^c Stéphane Poussier,^a Pierre Lefeuvre,^b Emmanuel Wicker^b

Université de la Réunion, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), Saint Denis, Réunion Island, France^a; CIRAD, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), Pôle de Protection des Plantes, Saint Pierre, Réunion Island, France^b; Department of Plant Pathology, Physiology, and Weed Science, Virginia Tech, Latham Hall, Blacksburg, Virginia, USA^c

***Ralstonia solanacearum* displays variability in its virulence to solanaceous crops. We report here the draft genome sequences of eight phylotype I strains and one phylotype III strain differing in virulence to the resistant eggplant genotype AG91-25. These data will allow the identification of virulence- and avirulence-related genes.**

Received 12 October 2015 Accepted 8 December 2015 Published 28 January 2016

Citation Guinard J, Vinatzer BA, Poussier S, Lefeuvre P, Wicker E. 2016. Draft genome sequences of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). *Genome Announc* 4(1):e01415-15. doi:10.1128/genomeA.01415-15.

Copyright © 2016 Guinard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 Unported license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Emmanuel Wicker, wicker@cirad.fr.

Ralstonia solanacearum, the causal agent of bacterial wilt, is one of the most harmful plant-pathogenic bacteria worldwide (1), causing tremendous yield losses within *Solanaceae* and *Musaceae* (2, 3). The *R. solanacearum* species complex (RSSC) is composed of four phylotypes (I, II, III, and IV). Among these, the pandemic phylotype I displays population structure (demographic expansion) and genomic features (recombination traces) probably at the origin of its high evolutionary potential (4), allowing it to adapt to new host species or resistant accessions of a host species. Among *Solanaceae*, eggplant is the crop species that carries the highest levels of resistance to *R. solanacearum*. So far, AG91-25 is the first eggplant genotype whose bacterial wilt resistance has been genetically mapped and associated with one major resistance gene (*ers1*) (5). Some *R. solanacearum* strains are totally controlled by AG91-25, while other strains are able to overcome its resistance (6,

7). To investigate the molecular bases driving these virulence differences, we sequenced nine strains of *R. solanacearum* that displayed different virulence patterns on AG91-25 (virulent, avirulent, and provoking latent infection) (J. Guinard, unpublished data; and 6–8), paying particular attention to differences in the type III effector gene (T3E) content between strains. Of these nine strains, eight are of phylotype I and originate from Asia (RUN0969 and RUN0157), Africa (RUN0215 and RUN1744), the Indian Ocean (RUN3012, RUN3013, and RUN3014), and South America (RUN1985), whereas RUN0039 belongs to phylotype III and originates from West Africa.

Genomic DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega). The strains were sequenced to a depth of ~100× using the Illumina HiSeq 2500 technology (150-base paired-end reads with an average insert size of 450 bp). The reads

TABLE 1 Characteristics of the nine *R. solanacearum* strains

Strain	Genome	Alternative name	Accession no.	Phylotype	Sequevar ^a	<i>egl</i> -ST ^b	<i>mutS</i> -ST ^b	Host of isolation	Yr of isolation	Country	Pathoprofile ^c	Virulence on E6 ^d	No. of contigs	Genome size (bp)
RUN0039	RUN39	CFBP3059	LN899819	III	23	002	005	<i>S. melongena</i>	1990	Burkina Faso	B	4	389	5,416,545
RUN0215	RUN215	CFBP7058	LN899820	I	13	019	030	<i>Solanum nigrum</i>	2005	Cameroon	A	2	403	5,839,544
RUN0157	PSS4		LN899821	I	15	015	028	<i>Solanum lycopersicum</i>	1988	Taiwan	E	4	374	5,680,609
RUN3013	RD1301	RD13.01	LN899822	I	31	043	022	<i>S. melongena</i> cv. E8	2012	Réunion Island		1	728	5,781,097
RUN1744	RUN1744	CIV 23	LN899823	I	31	043	022	<i>S. melongena</i>	2010	Ivory Coast	F	5	318	5,684,645
RUN1985	RUN1985	CIR011-208	LN899824	I	17	030	022	<i>S. melongena</i>	2011	French Guiana		5	266	5,788,639
RUN3012	TD1301	TD13.01	LN899825	I	31	043	022	<i>S. melongena</i> cv. E8 (susceptible)	2012	Réunion Island		2	511	5,711,184
RUN3014	TF3108	TF31.08	LN899826	I	31	043	022	Latent infections on <i>S. melongena</i> cv. E6 (resistant)	2012	Réunion Island		2	309	5,687,005
RUN0969	TO10		LN899827	I	47	050	022	<i>S. lycopersicum</i>	2003	Thailand		4	347	5,566,589

^a Sequevars cluster strains whose *egl* partial sequence share ≥99% nucleotide identity (8).

^b *egl* and *mutS* sequence types (ST), as presented in N'Guessan et al. (7) and Deberdt et al. (8).

^c Pathoprofile is the pattern of interactions to tomato, eggplant, and pepper, as detailed by Lebeau et al. (6).

^d The number assigned to each strain × accession combination represents the phenotype score, defined by the combination of final wilting incidence and colonization index and calculated as defined by Lebeau et al. (6): 1, highly resistant; 2, moderately resistant; 3.1, partially resistant; 3.2, latent infection; 4, moderately susceptible; 5, highly susceptible.

were quality trimmed using HTQC (9) before being assembled using CLC Genomics Workbench version 7.0.3 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Genome assemblies were annotated automatically using the Web interface of the MicroScope platform (10). The nine genomes consist of 266 to 728 contigs. The genome sizes of the phylotype I strains range from 5.57 to 5.84 Mb, while the phylotype III genome is shorter, at 5.42 Mb. The overall G+C contents range from 66.86 to 67.05%. The draft genomes contain between 5,198 and 5,426 coding sequences, with 48 to 52 tRNA genes and 2 to 3 complete rRNA loci.

The genomes were submitted to the *Ralstonia* T3E website (<https://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/site/prj/T3Ev2/>) (11) for T3E identification and *rip*-based annotation. The phylotype I strains contain 67 to 73 effector genes and two to seven pseudogenes, which are in the range of those in the reference phylotype I genome GMI1000 (11). Conversely, the phylotype III RUN39 contains only 55 T3Es and seven pseudogenes, which constitutes a T3E repertoire smaller than that of the phylotype I and phylotype III reference strain CMR15 (12). We did not find a clear association between T3E repertoire and virulence on AG91-25. However, the prevalence of the genes *ripAX2*, *ripA1*, *ripC2*, *ripE2*, *ripS6*, and *ripP2* was different between avirulent and virulent strains.

Nucleotide sequence accession numbers. The nine genome sequences have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under the study accession number PRJEB11298. The genome accession numbers are summarized in Table 1.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the European Union (FEDER project) and the Conseil Régional de la Réunion, the French Ministry of Agriculture (Project CASDAR C-2013-09 “RESAUBER”), and the National Science Foundation (IOS-1354215). J. Guinard is supported by a Ph.D. grant from CIRAD and the University of Reunion Island.

FUNDING INFORMATION

European Union-Region Reunion FEDER provided funding to Jérémy Guinard, Pierre Lefeuvre, and Emmanuel Wicker. French Ministry of Agriculture CASDAR provided funding to Jérémy Guinard and Emmanuel Wicker under grant number C-2013-09. University of Reunion Island provided funding to Jérémy Guinard and Stephane Poussier. National Science Foundation (NSF) provided funding to Boris A. Vinatzer under grant number IOS-1354215.

REFERENCES

- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13:614–629. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>.
- Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29:65–87. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>.
- Elphinstone JG. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview, p 9–28. In Allen C, Prior P, Hayward AC (ed), *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. APS Publishing, Saint Paul, MN.
- Wicker E, Lefeuvre P, de Cambiaire J, Lemaire C, Poussier S, Prior P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J* 6:961–974. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.160>.
- Lebeau A, Gouy M, Daunay MC, Wicker E, Chiroleu F, Prior P, Frary A, Dintinger J. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor Appl Genet* 126:143–158. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1969-5>.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, Prior P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101:154–165. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-02-10-0048>.
- N’Guessan CA, Abo K, Fondio L, Chiroleu F, Lebeau A, Poussier S, Wicker E, Koné D. 2012. So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Côte d’Ivoire in Africa. *Phytopathology* 102:733–740. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-11-11-0300>.
- Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, Launay J, Norenskal M, Rivière P, Vigné F, Laplace D, Lebreton L, Wicker E. 2014. Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge on the “emerging ecotype.” *Phytopathology* 104:586–596. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0264-R>.
- Yang X, Liu D, Liu F, Wu J, Zou J, Xiao X, Zhao F, Zhu B. 2013. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics* 14:33. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-14-33>.
- Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fevre F, Longin C, Mornico D, Roche D, Rouy Z, Salvignol G, Scarpelli C, Thil Smith AA, Weiman M, Medigue C. 2013. MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data. *Nucleic Acids Res* 41:D636–D647. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1194>.
- Peeters N, Carrère S, Anisimova M, Plener L, Cazalé A, Genin S. 2013. Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics* 14:859. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-859>.
- Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A, Salvignol G, Mornico D, Mangenot S, Barbe V, Médigue C, Prior P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:1–16. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-379>.

Tableau 9. Liste des clones agro-infectieux utilisés dans cette étude.

Code Rip	Gene	Description	TAG	Plasmide	Souche d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
RipD	RSp0304	AvrPphD	HAS		
RipE1	RSc3369		HAS		
RipG1	RSp0914	proteïn GALA1 avec F-box LRR	YFP	pPR65	C58C1
RipG3	RSp0028	proteïn GALA3 avec F-box LRR	YFP	pPR66	C58C1
RipG4	RSc1800	proteïn GALA4 avec F-box LRR	YFP	pPR68	C58C1
RipG5	RSc1801	proteïn GALA5 avec F-box LRR	YFP	pPR176	C58C1
RipG6	RSc1356	proteïn GALA6 avec F-box LRR	YFP	pPR153	C58C1
RipG7	RSc1357	Proteïn GALA7 avec F-box LRR	YFP	pPR148	C58C1
RipN	RSp1130	Nudix hydrolase	RFP	pNP149	GV3101
RipP1	RSc0826	(PopP1) Putative acetyltransferase	CFP	pAM-PAT	GV3103
RipP2	RSc0868	(PopP2) Acetyltransferase	3HA	pAM-PAT	GV3103
RipP2-C321A	RSc0868	(PopP2) Acetyltransferase	3HA		
RipAF1	RSp0822	Putative ADP-ribosyltransférase	HAS		
RipAJ	RSc2101		HAS		
RipAX2	RSp0572	Metallo-protéase avec un domaine de liaison zinc dépendant	HAS		
RipAY	RSp1022		HAS		
RipTAL1	RSc1815	Protéine de type « Transcription Activator-Like » (AvrBs3)	HAS		

Tableau 10. Liste des mutants simples et multiples d'effecteurs de la souche GM11000 de *R. solanacearum* disponibles au LIPM de Toulouse.

Gène	Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature	Code mutants	Référence
RSp0028	GALA3	RipG3	GRS417	[353]
RSp0160	HLK3	RipH3	GRS287	
RSc1815	TAL	RipTAL	GRS216	[315]
RSp0304	Famille HopD1	RipD	GRS72	[315]
RSp0822	Famille HopF1	RipAF1	GRS142	[315]
RSp0877	PopA	RipX	GMI1687	[342]
RSc0826	PopP1	RipP1	GMI1658	[280]
RSc0868	PopP2	RipP2	GRS100	[76, 403]
RSc1839		RipS4	GRS70	
RSc2101		RipAJ	GRS412	Christian Boucher, données non publiées
RSc3369		RipE1	GRS103	
RSp0193		RipL	GRS176	
RSp1022		RipAY	GRS166	[315]
RSp0572	HopH protéase	RipAX2	GRS359	[315]
RSp1130	Nudix	RipN	GRS289	
RSp1384		RipAS	GRS291	
RSp1582		RipAZ1	GRS401	
RSp1460		RipAU	GRS517	
		RipX-RipAB-RipAC-RSp0842-RipTPS-RipW-RipR-RipS1-RipA2-RipAD-RipA4-RipA3-RipA4-RipAA	MEM22	
		RipG2, RipG4, RipG5, RipG6, RipG7, RipG1::Ω, RipG3::Ω	GRS447	[353, 360]
	Δall-GALA	RipA1-RipA2-RipA3-RipA4-RipA5	GRS499	
Mutants multiples	Δall-AWR	hrcV::ΩSper	GMI1694	[315]
		RipA2-RipG6-RipG7-RipH1-RipH2-RipH3	MEM37	
		RipS1-RipS2-RipS3-RipS4-RipS5-RipS6	MEM47	
		RipA2-RipAA-RipAB-RipAC-RipH1-RipH2-RipH3-RipR-RipW	MEM40	

PARTIE 3.2

Etude de la fonction d'avirulence des dix effecteurs candidats par mutagénèse et expression transitoire

1. Matériel et méthodes

1.1. Souches bactériennes

La quasi-totalité des ET3 de la souche GMI1000 de *R. solanacearum* a été clonée dans *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 et ces souches agro-infectieuses sont disponibles au LIPM à Toulouse (A. C. Cazalé et N. Peeters, comm. pers. 2014). Cependant, les ET3 *ripAZ1*, *ripAS* et *ripAU* ne sont pas clonés à l'heure actuelle (A. C. Cazalé, comm. pers. 2014) et leurs phénotypes d'interaction sur E6 et E8 n'ont, par conséquent, pas pu être testés. 17 souches d'*A. tumefaciens* ont été inoculées au cours de cette étude (**Tableau 9**). Ces souches ont été cultivées à 28°C sur du milieu solide YEB (BactoPeptone 5 g.L⁻¹, Extrait de bœuf 5 g.L⁻¹, saccharose 5 g.L⁻¹, extrait de levure 1 g.L⁻¹, MgSO₄ 0,5 g.L⁻¹; pH=7,2) ou Luria-Bertani Agro (extraits de levure 5 g.L⁻¹; bactotryptone 10 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹) avec les antibiotiques correspondants.

Par ailleurs, 18 mutants simples d'effecteurs de GMI1000 ainsi que 7 mutants multiples ont été utilisés dans cette étude, dont la souche GMI1694 mutée dans son système de sécrétion de type 3 [315]. Les mutants de *R. solanacearum* ont été cultivés à 28°C sur milieu complet B (Bacto-Peptone 10 g.L⁻¹, casaminoacides 1 g.L⁻¹, extraits de levure 1 g.L⁻¹, glucose 20 mM, TTC). Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : gentamycine 15 mg.L⁻¹, kanamycine 50 mg.L⁻¹, spectinomycine 40 mg.L⁻¹, rifampicine 100 mg.L⁻¹, carbénicilline 25 mg.L⁻¹, tétracycline 10 mg.L⁻¹. Les souches utilisées sont résumées dans le **Tableau 10**.

1.2. Phénotypage de la souche GMI1000 et de ses mutants

La souche GMI1000 et chacun de ses mutants d'effecteurs ont été mis en culture 2 jours avant inoculation dans un milieu liquide complet B sans antibiotique. Quatre plants de la variété résistante (E6) et quatre plants de la variété sensible (E8) ont été inoculés par scarification du système racinaire avec une solution bactérienne calibrée à 10⁸ U.F.C.ml⁻¹ (DO₆₀₀ = 0,1). Les symptômes ont été notés tous les jours pendant 14 jours sur une échelle de notation allant de 0 à 4, définie par Lebeau [385] et coll. (2011).

1.3. Expression transitoire d'effecteur de GMI1000 *in planta*

Après une culture d'une nuit en milieu LB liquide contenant les antibiotiques appropriés en demi-concentration, les clones agro-infectieux ont été centrifugés à 4000 rpm. Les culots bactériens

ont ensuite été re-suspendus dans un milieu d'infiltration (10 mM de MgCl₂, 10 mM d'acide morpholineethanesulfonique et 150 µM d'acétosyringone) et incubés pendant 2 heures à température ambiante dans l'obscurité. Les suspensions bactériennes ont ensuite été diluées à une densité optique (DO₆₀₀) de 0,4 à 0,5 puis infiltrées dans les feuilles des deux cultivars d'aubergine. Deux points d'infiltration sur deux feuilles différentes ont été réalisés pour chaque variété. Les plantes ont ensuite été placées dans des chambres de culture à 28°C avec une photopériode de 16h de lumière et 8h d'obscurité. Les symptômes ont été évalués à cinq dates de notation : 24 heures après inoculation (hai), 48 hai, 72 hai, 84 hai et 120 hai. Les phénotypes observés sur feuille ont été formalisés à l'aide d'une échelle de notation à 10 points, inspirée de l'échelle de chlorose/nécrose développée par Wroblewski et coll. [461], 0 : aucun symptôme ; 1 : chlorose ; 2 : chlorose légère ; 3 : chlorose plus ou moins sévère avec brunissement localisé au niveau des nervures ; 4 : chlorose plus ou moins sévère avec brunissement localisé au niveau des nervures sur la face supérieure et brunissement total sur la face inférieure ; 5 : chlorose plus ou moins sévère avec brunissement généralisé ; 6 : chlorose accompagnée d'un ou de deux *spots* nécrotiques ; 7 : chlorose et effondrement des tissus, avec présence éventuelle de brunissement ou de nécrose ; 8 : nécrose ; 9 : nécrose sévère.

2. Résultats

2.1. Individuellement, les ET3 de *R. solanacearum* n'induisent pas de réaction hypersensible par agro-infiltration des feuilles des aubergines résistante E6 et sensible E8 (Tableau 9)

Les souches agro-infectieuses contenant un seul ET3 de la souche GMI1000 ont été infiltrées dans les feuilles d'aubergine résistante (E6) ainsi que dans les feuilles d'aubergine sensible (E8). Des symptômes de faible intensité ont été observés sur les plantes résistantes (E6) et sensibles (E8) 24 hai, 48 hai et 72 hai. Ce n'est qu'à 120 hai (J+5) que l'on commence à observer quelques chloroses très légères. Aucune nécrose caractéristique de réaction de mort cellulaire n'est observée, quelle que soit la date d'observation. Il n'y a donc *a priori* pas d'HR après infiltration des différentes souches agro-infectieuses exprimant chacune un seul ET3 de GMI1000, même à 48 hai où l'expression de la protéine est censée être maximale (N. Peeters, comm. pers., 2014).

2.2. *RipAX2* est potentiellement impliqué dans l'avirulence de *R. solanacearum* sur E6

Les 10 mutants simples d'ET3 de la souche GMI1000 ont été inoculés par scarification racinaire. 4 plants d'aubergine résistante E6 et d'aubergine sensible E8 ont été inoculés par souche. La souche GMI1000 a aussi été inoculée en tant que témoin positif (E8 est sensible à GMI1000 alors que E6 y est résistante) [385]. Des mutants multiples d'ET3 ont aussi été inoculés afin de mettre en évidence une potentielle redondance fonctionnelle des effecteurs. Les taux de flétrissement finaux de la variété sensible sont très similaires entre les différents mutants testés : entre 75 et 100% des plants d'E8 ont flétri au bout de 12 jours après inoculation. Aucun symptôme n'a été observé sur les aubergines résistantes (E6) : ni pour la souche sauvage GMI1000, ni pour 18 mutants simples défectifs d'ET3, ni

même pour les 6 mutants multiples. Cependant, la souche GRS359 mutée dans l'ET3 *ripAX2* provoque un flétrissement final de 100% des plants d'aubergine résistante (E6). Les expérimentations menées pour valider la fonction d'avirulence de *ripAX2* sont détaillées dans un projet d'article présenté plus bas.

3. Conclusion partielle

Les résultats d'infiltration sur feuille d'aubergine sensible (E8) et d'aubergine résistante (E6) avec des souches agro-infectieuses sont très clairs : aucune réaction hypersensible n'est observable, quel que soit l'ET3 considéré. Ces résultats vont à l'encontre d'une potentielle réaction de type gène-pour-gène [44] s'exprimant au niveau des feuilles de l'aubergine E6. Cependant, les inoculations racinaires avec chacun des mutants ont montré que la mutation du gène *ripAX2*_{GMI1000} provoque une virulence nette de cette souche sur l'aubergine résistante E6. Bien que Pensec et coll., [376] avaient identifié *ripP2* comme le meilleur candidat pour une fonction d'avirulence, *ripAX2* avait aussi été identifié comme un bon candidat pour une fonction d'avirulence sur aubergine résistante E6. Cette étude confirme donc que *RipAX2* serait fortement impliqué dans l'avirulence de GMI1000 sur E6 et qu'il serait potentiellement reconnu par le gène majeur de résistance *ERs1* présent chez E6. Il apparaît maintenant nécessaire de confirmer cette fonction d'avirulence en répétant cet essai et en y associant une approche de complémentation fonctionnelle. Par ailleurs, l'hypothèse d'une diminution de la concentration bactérienne *in planta* due à la reconnaissance de *ripAX2* par les défenses de la plante sera aussi testée. La variation des réponses de la plante en fonction des différents allèles de *ripAX2* présents dans les populations naturelles de *R. solanacearum* sera aussi abordée.

PARTIE 3.3

L'effecteur de type trois ripAX2 confère de l'avirulence à la souche GMI1000 de *Ralstonia solanacearum* sur l'aubergine (*Solanum melongena*) AG91-25 possédant le gène majeur de résistance *Ers1*

1. Résumé

Afin d'estimer la durabilité d'une résistance, il est impératif de comprendre les mécanismes moléculaires de l'interaction entre une plante et son pathogène. Parmi les facteurs impliqués dans ce type d'interaction, les effecteurs – et en particulier les effecteurs de type trois (ET3) – jouent un rôle central. En effet, ils peuvent soit être reconnus par le système immunitaire de la plante, soit supprimer les réactions de défense de la plante [24]. Dans cette partie, nous avons cherché à définir l'implication de 10 effecteurs candidats dans l'avirulence de *R. solanacearum* sur la variété d'aubergine résistante AG91-25 (codée ci-après E6), possédant le gène majeur de résistance *Ers1* [426]. 18 souches dérivatives de GMI1000 mutées dans un effecteur à la fois, ainsi que 6 mutants multiples ont été inoculées sur E6. Le mutant déficient de *ripAX2* devient virulent sur E6, suggérant que cet ET3 a une fonction d'avirulence sur E6. Nos résultats semblent indiquer que la reconnaissance de *ripAX2* se produirait dans les tissus de l'hypocotyle plutôt que dans les tissus du mésophylle et donc que l'expression de la résistance est organe-spécifique. En effet, aucune réaction hypersensible ni aucune différence de charge bactérienne n'a été observée entre les souches pseudo-infectieuses exprimant différents allèles de *ripAX2* lors de leur infiltration dans la feuille. Parallèlement, nous avons analysé la variabilité allélique de *ripAX2* ainsi que son environnement génomique dans plusieurs souches ayant des profils de virulences différents sur E6. La diversité allélique et l'environnement génomique de ce gène d'effecteur ne semblent pas expliquer un profil de virulence/avirulence sur E6. Cette étude est une première étape vers la caractérisation de la potentielle interaction entre *ripAX2* et *Ers1*.

2. Publication

L'ensemble de ce travail a donné lieu à une publication scientifique en préparation pour une soumission à une revue internationale de rang A avec comité de lecture : *Molecular Plant Pathology*. « **The type III effector *ripAX2* confers avirulence of *Ralstonia solanacearum* to the eggplant (*Solanum melongena*) AG91-25, carrying the resistance gene *Ers1*** » J. Guinard, K. Wang, M. E. Mechan-Llontope, A. C. Cazalé, S. Genin, S. Poussier, B. A. Vinatzer, N. Peeterse and E. Wicker.

1 **The type III effector ripAX2 confers avirulence of *Ralstonia***
2 ***solanacearum* to the eggplant (*Solanum melongena*) AG91-25,**
3 **carrying the resistance gene *Ers1***

4

5 Jérémy Guinard^{ab}, Keke Wang^{cd}, Marco Enrique Mechan Llontop^e, Anne-Claire Cazalé^{cd},
6 Stéphane Genin^{cd}, Stéphane Poussier^a, Boris Vinatzer^e, Nemo Peeters^{cd1} and Emmanuel
7 Wicker^{b1}.

8

9 ^a Université de la Réunion, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu
10 Tropical (PVBMT), 15 avenue René Cassin, BP7151, F-97715 Saint Denis Cedex 9, Réunion,
11 France.

12 ^b CIRAD, UMR 53 Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT),
13 Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Réunion, France.

14 ^c INRA, UMR 441 Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM),
15 Castanet-Tolosan, France.

16 ^d CNRS, UMR2594 Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM),
17 Castanet-Tolosan, France

18 ^e Department of Plant Pathology, Physiology, and Weed Sciences, Virginia Tech, 537 Latham
19 Hall, West Campus Drive, Blacksburg, VA 24061.

20 ¹: These authors contributed equally to this work.

21

22 **¹Corresponding authors:**

23 Nemo Peeters,

24 LIPM, 24 chemin de Borde Rouge, CS 52627 Auzeville, 31326 Castanet-Tolosan Cedex,
25 France.

26 Phone: (+0033) 5 61 28 55 92

27 E-mail: nemo.peeters@toulouse.inra.fr

Chapitre III – Partie 3

28 Emmanuel Wicker,
29 CIRAD, Pôle de Protection des Plantes, 7 chemin de l'IRAT, F-97410 Saint Pierre, Reunion,
30 France.
31 Phone: (+262) 262 49 92 42; Fax: (+262) 262 49 92 93;
32 Email address: wicker@cirad.fr

33

34 **Word count:**

35	Summary:	206
36	Introduction:	1013
37	Results and Discussion:	2016
38	Conclusion:	217
39	Experimental procedures:	1791
40	Acknowledgment:	171
41	Table and figure legends	337
42	Total:	5751

43

44 **1. SUMMARY**

45 In order to understand plant resistance durability, it is essential to break the code of
46 the molecular basis governing plant-pathogen interaction. Among the numerous
47 factors involved, effectors – and especially type three effectors (T3E) – play a central
48 role in this interaction, being either recognized by plant immune system and/or
49 helping the pathogen to colonize the plant host. Here we investigated how several
50 T3E are involved in the avirulence of *R. solanacearum*, the bacterial wilt agent, on the
51 resistant eggplant (AG91-25; E6) carrying the major resistant gene *ERs1* (Lebeau *et*
52 *al.*, 2012). We observed that a *ripAX2* defective mutant of the GMI1000 strain was
53 virulent on E6, suggesting that this T3E has an avirulence function on E6. We also
54 pointed out that the resistance mechanisms seemed to occur in the hypocotyl region
55 rather than in the mesophyll. Indeed, our results showed neither hypertensive response
56 (HR) nor reduction of bacterial concentration in plant leaves. Moreover, we analyzed
57 the *ripAX2* variability and its genomic environment in *R. solanacearum* strains
58 displaying different levels of virulence on E6 and found no association with the
59 virulence/avirulence profile of the strains. This study is the first step towards the
60 characterization of the interaction between *ripAX2* and *ERs1* and paves the way for
61 deeper analysis.

62

63 **2. INTRODUCTION**

64 In agrosystems, plants are constantly challenged by a plethora of pathogens such
65 as bacteria, virus, fungi and nematodes. Monoculture as it is currently practiced in
66 modern agro-ecosystems not only leads to the reduction of plant genetic variability
67 but also to the increase of potential hosts for plant pathogens microorganisms
68 (Stukenbrock & McDonald, 2008). Among the different strategies to control plant
69 diseases, the use of plant resistant germplasm appears to be the best alternative, as it is
70 cost-effective and environmental friendly (Bousset *et al.*, 2011). However, an
71 increasing number of studies regularly report cases of resistance breakdown
72 (Kiyosawa, 1982, Zeigler *et al.*, 1994, Montarry *et al.*, 2006, Palloix *et al.*, 2009,
73 Moury, 2010, Daverdin *et al.*, 2012), which casts doubts about the durability of plant
74 resistance. Predicting this durability can be achieved by deciphering the evolutionary
75 potential of the pathogen (McDonald & Linde, 2002). However, unravelling the
76 molecular bases of the plant-microbe interaction is the critical preliminary step to
77 assess the evolutionary constraints on their stability and dynamics. The zig-zag model
78 of plant immune system distinguished two layers of immunity (Jones & Dangl, 2006).
79 The first layer, called “MAMP-triggered immunity” (MTI), is induced by the
80 recognition of microbial structural molecules called “Microbe Associated Molecular
81 Patterns” (MAMPs). The second layer, named “Effector-triggered Immunity” (ETI),
82 is a much more intense and rapid response than the MTI, induced by a direct or
83 indirect recognition of MTI-subverting effectors by the resistant protein of plant. This
84 model has recently been updated in an “Invasion Model” (Cook *et al.*, 2015) where
85 the two layers of immunity previously described (Jones & Dangl, 2006) coexist. This
86 new model proposed that MAMPs – as well as DAMPs (“Damage Associated
87 Molecular Patterns”) and effectors – should be gathered in a global term of “Invasion

Chapitre III – Partie 3

88 Pattern” (IP). An IP can either be recognized by plant receptors (IPRs for “IP
89 Receptors”) and/or trigger immune responses, called IPTRs (“IP-Triggered
90 Responses”) (Cook et al., 2015). Effectors, especially Type Three effectors (T3E) for
91 Proteobacteria, are the key components in this interaction since they can both subvert
92 and trigger the plant immune system (Cornelis, 2006). Indeed, when they are injected
93 into host cells, they alter some plant cell functions and structures, which can lead to
94 promote the pathogen invasion (Hogenhout *et al.*, 2009). However, T3E can also be
95 recognized as IPs by plant resistance proteins (Cook *et al.*, 1989). This recognition is
96 frequently characterized by a hypersensitive response (HR) at the infection site
97 (Greenberg & Yao, 2004), which can be compared to the programmed cell death in
98 animals and humans (Jones & Dangl, 2006). There is a growing interest in effectors
99 function, hence numerous studies have focused on identifying their role *in planta* and
100 their plant cell targets (Alfano & Collmer, 2004). Undeniably, these molecules may
101 represent central tools to identify, describe and develop durable resistant genes
102 (Vleeshouwers & Oliver, 2014, Clarke *et al.*, 2015). Dissecting T3E functions and
103 identifying their interactors has appeared to be a high output approach to probe plant
104 germplasm for new durable *R* genes.

105 Bacterial wilt – induced by the soilborne Proteobacterium
106 *Ralstonia solanacearum* – affects more than 54 botanical families, among which
107 several crops of major interest (tomato, potato, banana, groundnut, eucalyptus...)
108 (Kelman, 1954, Buddenhagen *et al.*, 1962, Hayward, 1964, Janse & Schans, 1998,
109 Wicker *et al.*, 2002, Wicker *et al.*, 2007). To this extent, searching and breeding for
110 plant resistance against *R. solanacearum* is critical for food safety in numerous
111 countries (Elphinstone, 2005). However, the genetic bases of plant resistance to this
112 major plant pathogen still remain unknown, except for the model species *Arabidopsis*

Chapitre III – Partie 3

113 *thaliana* (Deslandes *et al.*, 2002, Genin, 2010, Peeters *et al.*, 2013b, Peeters *et al.*,
114 2013a) and *Medicago truncatula* (Ben *et al.*, 2013, Vailleau *et al.*, 2007). Interactions
115 between strains of *R. solanacearum* and *Solanaceae* genotypes (tomato, eggplant and
116 pepper) have already been deeply investigated (Lebeau, 2010, N'Guessan, 2013) and
117 formalized into six patterns, called pathoprofiles (Lebeau *et al.*, 2011). This screening
118 established that the highest resistance levels against *R. solanacearum* were basically
119 found within the eggplant germplasm. The resistance of the accession AG91-25 (Ano
120 *et al.*, 1991, Ano *et al.*, 2002), also called MM960 (hereafter referred as E6), has
121 been mapped, which lead to the identification of the major resistant gene *ERs1*
122 (Lebeau *et al.*, 2012). Together with *RE-bw*, they are the only two cases of major
123 resistance genes to *Ralstonia solanacearum* described in crop species (Lebeau *et al.*,
124 2012, Xi'ou *et al.*, 2014). Recently, an orthologue of *ripAX2* in strain GM1000
125 (*ripAX2*_{GM1000}), *rip36* in RS1000 (*ripAX2*_{RS1000}) (Peeters *et al.*, 2013a) has been
126 shown to induce a strong HR on a wild relative of eggplant (*Solanum torvum* cv.
127 Torubamubiga), but not on the eggplant itself (*S. melongena* cv. Senryo-nigou)
128 (Nahar *et al.*, 2014). However, since no resistance gene has been characterized yet in
129 these two cultivars, the interactor to *ripAX2*_{RS1000} has not been identified yet.

130 In order to generally characterize the durability of AG91-25 resistance, it is now
131 necessary to understand the molecular basis of the interaction between
132 *R. solanacearum* and the AG91-25 eggplant immune system. A recent screening of
133 T3E was realized to look for association to virulence or avirulence on eggplant and
134 allowed the identification of several potential avirulence genes (Pensec *et al.*, 2015).
135 Among these T3Es, *ripP2* and *ripAX2* were the most highly associated with
136 avirulence on the E6 eggplant carrying the resistant gene *ERs1* (Pensec *et al.*, 2015).
137 As a first step of this work, the avirulence function of 18 T3E from *R. solanacearum*

Chapitre III – Partie 3

138 GMI1000 was assessed by single or multiple T3E knock-out experiments. At the end
139 of this assessment, we found out that *ripAX2* mutant specifically induced disease on
140 E6 compared to GMI1000. Thus, the present study mainly focused on *ripAX2* effector
141 and we aimed at investigating its contribution to the avirulence of GMI1000 on the
142 resistant eggplant, E6. Our specific objectives were (i) to investigate the allelic
143 variability of *ripAX2* alleles of strains showing different virulence profiles on E6, (ii)
144 to validate the contribution of the GMI1000 allele of *ripAX2* to avirulence on E6 and
145 (iii) to define a potential localization for GMI1000 recognition by E6.

146

147

148 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

149

150 **The mutation of *RipAX2*_{GMI1000} indicates an avirulence function of this T3E on**
151 **the E6 resistant eggplant**

152 In order to evaluate the avirulence function of the 18 different T3E of
153 *R. solanacearum* GMI1000, 10 plants of four weeks-old resistant (E6) and susceptible
154 eggplant (E8) were inoculated with GMI1000 single and multiple T3E mutants after
155 their roots had been scarified. Among the different T3E tested, only the *ripAX2*_{GMI1000}
156 mutant (GRS359) was virulent on resistant eggplant and wilted 100% of E6 plants. In
157 order to confirm these results, we performed the experiment once again, with the
158 knock-out mutant GRS359 (*GMI1000* Δ *ripAX2*), the complemented strain Rs714
159 (GRS359 complemented with *ripAX2*_{GMI1000}) and GMI1000 (Wild Type [WT],
160 positive control). When E8 plants were inoculated with GRS359 and the WT, 100%
161 plants wilted between six and seven days post-inoculation (dpi) (**Figure 1**). However,
162 infection kinetics of Rs714 – the complemented strain – was slightly slower, reaching
163 100% wilting only at the end of the experiment (14 dpi) (**Figure 1**). On E6 plants, no
164 wilting was observed after inoculation with GMI1000 and Rs714 over the 14 days
165 period, which indicates that, as expected, the complementation successfully restored
166 the E6 resistance phenotype. However, 100% of E6 wilted 8 days after inoculation
167 with GRS359 (*GMI1000* Δ *ripAX2*) (**Figure 1**). This experiment was repeated four
168 times and gave the same results.

169 Altogether, these results clearly indicate that *ripAX2*_{GMI1000} is required for avirulence
170 on resistant eggplant E6 and it is tempting to speculate that *ripAX2* may interact with
171 the major resistant gene *ERs1* (Lebeau et al., 2012). This avirulence function of
172 *ripAX2* was also recorded on wild eggplant (*S. torvum*) but not on the Senryou-nigou

Chapitre III – Partie 3

173 cultivar of eggplant (Nahar et al., 2014). A straightforward conclusion would be that
174 this interaction seems to be governed by a gene-for-gene interaction (Flor, 1971),
175 even though no characteristic symptom of HR was observed. Albeit *ERsI* has been
176 hypothesized as being a single resistance gene (Lebeau et al., 2011), we may not
177 demonstrate this statement until *ERsI* has been cloned. Indeed, *ERsI* is located in a
178 3 cM zone, corresponding to around 3 Mb (Lebeau et al., 2012) (S. Salgon pers.
179 comm., 2015), so it should be considered as a *locus* rather than as a distinct gene. The
180 fine genetic mapping of this resistance gene/QTL is currently in progress (S. Salgon,
181 PhD thesis). *RipAX2* is the second eggplant-avirulence gene, the first one being *ripP2*
182 recognized by *RE-bw* (Xi'ou et al., 2014). So far, only few *R. solanacearum* T3Es
183 have been identified as avirulent factors : *ripP2* on *Arabidopsis thaliana* (Deslandes et
184 al., 2002), *ripP1* on tobacco (*Nicotiana glutinosa*) and petunia (*Petunia*) cv. St40
185 (Lavie et al., 2002), *ripAA* on tobacco (Carney & Denny, 1990, Robertson et al.,
186 2004, Poueymiro et al., 2009), and finally *ripA2* and *ripA5* on *A. thaliana* and
187 *Nicotiana tabacum* (Sole et al., 2012).

188

189 **Leaf infiltration of *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas syringae* pv.** 190 ***tomato* strains containing *R. solanacearum ripAX2* alleles do not trigger** 191 **resistance in E6**

192 Recognition of avirulent T3Es by plant resistance proteins activates the
193 Effector-Triggered-Immunity (ETI ; (Jones & Dangl, 2006)). This recognition triggers
194 signaling cascade of biochemical responses among which the HR can be visually
195 monitored. *A. tumefaciens* strains containing different T3Es from *R. solanacearum*
196 GMI1000 were infiltrated within E6 and E8 leaves at a concentration of 10^8 CFU.mL⁻¹.
197 However, no HR or HR-like symptom was observed on E6 and E8 cultivars, even

Chapitre III – Partie 3

198 with the *A. tumefaciens* clone containing *ripAX2*_{GMI1000}. Only weak chlorosis was
199 observed at 120 hours post inoculation (hpi), which might be due to the infiltration
200 buffer. These results indicated that E6 did not recognize any of T3E when infiltrated
201 in the leaf. The recognition of a T3E by the plant immune system can also cause a
202 decrease of *in planta* bacterial growth. We infiltrated E6 and E8 plants with
203 *P. syringae* pv. *tomato* D36E strains containing different alleles of *ripAX2*. The
204 *P. syringae* pv. *tomato* D36E strain is mutated in all its 36 T3E (Bao *et al.*, 2014),
205 thus only the incorporated T3E alleles are expressed in our experiments. Three
206 *ripAX2* alleles were used in this study (*ripAX2*_{Molk2}, *ripAX2*_{GMI1000} and *ripAX2*_{RUN1900})
207 as well as *ripAX2*_{Molk2} containing a shift in the open reading frame (*ripAX2*_{Molk2-OF}),
208 leading to the production of a nonfunctional proteins. For the first experiment
209 (infiltration performed with a bacterial suspension of OD₆₀₀ = 0.1), *in planta*
210 concentration of these four strains were similar when inoculated on E8 and E6,
211 reaching between 10⁶ and 5.10⁶ CFU/cm² of leaves (**Figures 2A and 2C**). Student
212 t-tests indicated non-significant difference of *in planta* concentration between strains
213 inoculated on E6 or on E8 ($p > 0.16$). The second experiment was performed with a
214 bacterial suspension of OD₆₀₀ = 0.03. Bacterial concentration *in planta* was similar for
215 the four strains inoculated on E6 and E8 (between 10⁵ and 10⁶ C.F.U.g of stem⁻¹)
216 (**Figures 2B and 2D**). However, Student t-tests indicated significant differences on
217 E8 between the strains 4881 (*ripAX2*_{Molk2-OF}) and 4887 (*ripAX2*_{GMI1000}) ($p = 0.0059^{**}$)
218 and between the strains 4881 (*RipAX2*_{Molk2-OF}) and 4890 (*ripAX2*_{RUN1900})
219 ($p = 0.0119^{*}$). But since no repetition was performed at the same concentration, these
220 results are questionable. The results on E6 suggested that there is no significant
221 difference of *in planta* bacterial growth among strains with the three functional alleles
222 of *ripAX2* and the negative control strain (strain 4881).

Chapitre III – Partie 3

223 The *ripAX2*_{RS1000} allele, which shares 100% similarity with the *ripAX2*_{GMI1000}
224 allele (Peeters et al., 2013a), caused HR when infiltrated in eggplant leaves
225 (*S. torvum*) but did not induce any HR on eggplant cv. Senryo-nigou (Nahar et al.,
226 2014). Furthermore, no significant difference was observed in bacterial multiplication
227 when both *ripAX2* mutant and WT strains were infiltrated on eggplant leaves (Nahar
228 et al., 2014). We obtained the same results (neither HR nor HR-like) when we
229 infiltrated E6 resistant eggplant leaves, both with GMI1000 naturally expressing
230 *ripAX2* and the complemented mutant. The absence of HR in resistant leaves and of
231 difference in bacterial load in leaves may firstly be explained by a T3E functional
232 redundancy (Mukaihara *et al.*, 2010). Another explanation could be that the
233 recognition of *ripAX2* by E6 resistant factors is organ-specific and does not happen in
234 the mesophyll.

235

236 **Internal Growth Curves suggest an organ-specific control of GMI1000 by E6** 237 **resistant eggplant**

238 In order to test the hypothesis that the *ripAX2* specific recognition may occur in the
239 stem, we performed Internal Growth Curves (IGCs). At 4 dpi, bacterial concentration
240 in E8 reached 10^9 C.F.U. g of stem⁻¹ for both WT and *ripAX2* mutated strain GRS359.
241 Complemented strain Rs719 was detected at lower but still high concentrations
242 (10^8 C.F.U.g of stem⁻¹). Latent infections (colonization without wilt symptoms) were
243 also detected in resistant eggplant for GMI1000 ($5 \cdot 10^4$ C.F.U.g of stem⁻¹), for
244 GRS359 (10^4 C.F.U.g of stem⁻¹) and for Rs719 (10^3 C.F.U.g of stem⁻¹) (**Figure 3A**).
245 At 7 dpi, the three strains reached approximately the same *in planta* concentration of
246 10^{10} C.F.U.g of stem⁻¹ in the susceptible eggplant (E8) (**Figure 3B**). Strains of
247 *R. solanacearum* containing *ripAX2* (GMI1000 and Rs719) were kept in check within

Chapitre III – Partie 3

248 E6 eggplants in the stem (in the hypocotyl region) or lower. As expected, the bacterial
249 concentrations for Rs719 (10^3 C.F.U. g of stem⁻¹) was lower than the WT, by two
250 orders of magnitude. These results may indicate a strong stem-specific recognition of
251 *ripAX2* (possibly by *ERs1*), inducing a dramatic reduction of bacterial load. We
252 cannot exclude that the high recognition response may be due to a strong
253 *ripAX2*_{GMI1000} expression from the *ripG7* promoter. However, *in planta* bacterial
254 concentrations reached 10^8 C.F.U.g of stem⁻¹ for the *ripAX2*-defective strain GRS359
255 and were 3 and 5 orders of magnitude higher than the respective bacterial loads of the
256 WT and the complemented mutant. Based on these results, we can suggest that
257 *ripAX2* is essential during the recognition process of GMI1000 by the E6 eggplant.
258 This result also highlighted a possible organ-specific control of *R. solanacearum* in
259 the hypocotyl region. This organ specificity has already been observed by Ben et al.
260 (Ben et al., 2013) in the interaction between *Medicago truncatula* and
261 *R. solanacearum*. Authors found out that, for the resistant plant F83005.5, *in planta*
262 concentrations of *R. solanacearum* was 5 times higher in the stem than in the root,
263 thus concluding that hypocotyl is a critical zone for reducing bacterial growth
264 (Vailleau et al., 2007, Ben et al., 2013). The organ specificity of plant resistance was
265 also observed within the pathosystem *Brassica napus* against *Verticillium*
266 *longisporum* by using real-time PCR (Eynck et al., 2009). Indeed, substantial invasion
267 was recorded for the susceptible cultivar ‘Falcon’ in both stem and root organs while
268 the resistant cultivars ‘SEM05-500256’ did not harbor any fungal DNA in the stem
269 (Eynck et al., 2009).

270 This organ specificity of the resistance could be further experimented by studying
271 the localization of the *ripAX2*/*ERs1* interaction by fluorescence microscopy (*ripAX2*
272 fused to a GFP-tag), combined with the analysis of systemic spread of the pathogen

Chapitre III – Partie 3

273 using qPCR on E6 root, stem and hypocotyl. We could also consider looking into
274 functional variability of *ripAX2* orthologs in different *R. solanacearum* strains,
275 avirulent and virulent to E6. Such approach could give us insights about the *ripAX2*
276 allele-plant response correlations and could allow us to identify residues that are
277 critical for avirulence to eggplant. Nahar et al. (2013) showed that the zinc-binding
278 domain HExxH, and especially its glutamic acid located at position n°149, is critical
279 for avirulence on *S. torvum* (Nahar et al., 2014). Wang et al. (2015) showed that
280 different orthologues of *ripG7* have differential contributions to pathogenicity on
281 *M. truncatula* (Wang et al., 2015). *RipAX2*_{GMI1000} seemed to have a cytoplasmic
282 nuclear and nucleolus localization (N. Peeters, unpublished data, 2015) and appeared
283 to be positively controlled by HpaB, a chaperone protein of *R. solanacearum* (F.
284 Lonjon, pers. comm., 2015).

285

286 **Strain virulence does not seem to be associated with allelic variability of *ripAX2*** 287 **or with its genomic environment**

288 We took advantage of 9 newly sequenced strains (Guinard et al., 2015b) presenting
289 different virulence profiles on E6 to investigate whether *ripAX2* variability and its
290 genomic environment (5 genes upstream and downstream *ripAX2*) were associated to
291 the virulence or avirulence of *R. solanacearum* strains on E6. The three strains from
292 La Réunion (RUN3012, RUN3013 and RUN3014) (Guinard et al., 2015a), and the
293 strain from Cameroun (RUN0215) harbored the same *ripAX2* allele as GMI1000 and
294 were also avirulent on E6 (Guinard et al., 2015b). The strains RUN0039, RUN0157
295 (PSS4) and RUN1985 originating respectively from Burkina Faso, Taiwan and
296 French Guyana, did not possess *ripAX2* and were highly virulent on E6 (Lebeau et al.,
297 2011, Deberdt et al., 2014). In the light of this observation, it is tempting to speculate

Chapitre III – Partie 3

298 that the absence of *ripAX2* in these strains leads to virulence of these strains on E6.
299 Another example was the virulent strain, RUN0969 (To10), originating from
300 Thailand, that harbored a truncated version of *ripAX2* (312 bp instead of 657 bp). This
301 truncated *ripAX2*, likely to produce a non-functional protein, might not be recognized
302 by the resistance gene, which can lead to the virulence of RUN0969 on E6. Compared
303 to GMI1000, RUN0969 strain exhibits an extra transposase and an extra putative
304 DNA-methylase in the upstream genomic region of *ripAX2*, whilst presenting an extra
305 hemagglutinin hemolysin-related protein in the downstream genomic region (**Figure**
306 **4**). Despite these observations, we also identified identical *ripAX2* alleles in strains
307 differing in virulence on E6 : RUN1744 (originated from Ivory Coast), a highly
308 virulent strain on E6 (N'Guessan *et al.*, 2012), which has the same *ripAX2* allele as
309 GMI1000, an avirulent strain on E6 (Lebeau *et al.*, 2011). Although the *ripAX2* allele
310 is identical between these two strains, the genomic environment surrounding *ripAX2*
311 was totally different between GMI1000 and RUN1744. For both strains, most of the
312 upstream genes of *ripAX2* were conserved protein of unknown function, except for
313 GMI1000 which has a transposable insertion element and RUN1744 which has a
314 fragment of a putative DNA-methylase protein. Downstream genes of RUN1744
315 consist of an oxydo-reductase enzyme and a hemagglutinin hemolysin-related protein
316 (**Figure 4**). It is tempting to speculate that these differences in the *ripAX2* genomic
317 environment observed in these two strains might influence the expression level of
318 *ripAX2*, leading to different virulent profiles on E6.

319 **4. CONCLUSION**

320 In this study, we have shown that *ripAX2* is an avirulent factor on E6 resistant
321 eggplant and a promising candidate as a bacterial interactor with *ERs1*. However, this
322 statement needs to be further investigated thanks to the generation of NILs (Nearly
323 Inbred Lines) carrying or not *ERs1* or by cloning this gene. In the light of our results,
324 we can also suggest that the control of *R. solanacearum* strains by the E6 resistant
325 eggplant happens in the hypocotyl region. The resistant eggplant (E6) seemed to be
326 susceptible to root penetration, but not to systemic colonization of the stem. However,
327 further experiments need to be performed to confirm this hypothesis.

328 Meanwhile, it could also be interesting to study residues under selective pressure in
329 order to understand which residues are critical for recognition of *ripAX2* by *ERS1*.
330 The zinc-dependent binding domain "HEXXH" has been identified as a critical
331 residue for avirulence of *ripAX2* on *S. torvum* (Nahar et al., 2014). More precisely, the
332 glutamic acid at position n°149 is critical for the recognition of *ripAX2* by the plant
333 immune system. Thus, it seems necessary to know whether this residue is critical for
334 recognition of *ripAX2* by *ERS1* and if *ripAX2* gene is under positive selection.
335 Ultimately, this approach could potentially identify residues involved of in resistance
336 breakdown.

337 **5. EXPERIMENTAL PROCEDURE**

338

339 **Plant material**

340 Two eggplant accessions (*Solanum melongena*) showing different resistance patterns
341 against *R. solanacearum* were used: the resistant eggplant AG91-25, also called
342 MM960 (hereafter named “E6”), and the susceptible eggplant MM738 (hereafter
343 named “E8”) (Wu *et al.*, 2009, Ano *et al.*, 2002 , Ano *et al.*, 1991, Doganlar *et al.*,
344 2002). Eggplant seeds were sown four weeks before inoculation and were then
345 transplanted into 7x7x6cm black plastic pots one week after sowing. Four weeks-old
346 plants were transferred in growth chamber at 90% relative humidity, with a day/night
347 thermoperiod of 30°/24°C and a 12h light/12h dark photoperiod .

348

349 **GMI1000 mutants construction and plant infection assays**

350 For the first screening step of the wild type (WT) *R. solanacearum* strain GMI1000
351 mutants we used 18 single- and 6 multiple-T3E mutants from previously published
352 studies (Deslandes *et al.*, 2002, Gijsegem *et al.*, 2002, Cunnac *et al.*, 2004, Angot *et*
353 *al.*, 2006, Peeters *et al.*, 2013a) and available at the LIPM (INRA, Castanet-Tolosan,
354 France) (**Table S1**). In a second step, in order to investigate the avirulence function of
355 *ripAX2* (previously called RSp0572), we used two strains derived from the WT strain
356 *R. solanacearum* GMI1000 (phylotype I). GRS359 was previously created (Cunnac *et*
357 *al.*, 2004) using pCZ367, a pUC18-derived vector used for insertional mutagenesis
358 and containing a gentamicin resistance gene cassette (GMI1000 RSp0572::Ω, Gm^r).
359 The GMI1000-derived clone Rs714 was basically a clone of GRS359, complemented
360 with the WT gene *ripAX2*_{GMI1000}. It was generated using pRCG plasmid (Monteiro *et*
361 *al.*, 2012, Lohou *et al.*, 2014) and contains the *GALA7* promoter followed by

Chapitre III – Partie 3

362 *ripAX2_{GMI1000}* gene, a single/triple HA epitope tag and finally a gentamicin resistance
363 cassette (**Table S1**). Strains were streaked out of -80°C freezer on Kelman media
364 (Kelman, 1954) either without antibiotics or supplemented with 10 µg.mL⁻¹
365 gentamycin. Plates were incubated two days at 28°C before plant infection assays.
366 In order to monitor the disease symptoms, bacteria were streaked on Kelman media
367 (Kelman, 1954), re-suspended in Tris buffer (Sigma-Adrich, St Louis) and then
368 diluted to reach a final concentration of 10⁸ C.F.U.mL⁻¹ (OD₆₀₀ = 0.1). Plants were
369 infected with *R. solanacearum* strains by roots scarification, as previously described
370 (Lebeau et al., 2011). Briefly, roots were cut using a razor blade and plants were
371 inoculated with 5 mL of a bacterial suspension calibrated at 10⁸ C.F.U.mL⁻¹. Each
372 time, 10 plants were inoculated and four biological replicates were performed.
373 Disease development was scored using a 0 to 4 disease index-scale – as previously
374 published (Lebeau et al., 2011) – everyday during 14 days.
375 For Internal Growth Curve (IGC), E6 and E8 eggplants were grown on jiffy-7 ®
376 peat-pellets. Inoculation was realized by cutting the jiffy in half and drenching it in a
377 10⁸ C.F.U.mL⁻¹ suspension. One cm of stem was harvested immediately above the
378 cotyledons at 4 and 7 dpi. Stem samples were surface-sterilized with 70% ethanol for
379 1 min, rinsed three times in sterile water and dried out. Stems were ground using a
380 pestle and a mortar and different dilutions were plated on the semi-selective medium
381 SMSA (Elphinstone *et al.*, 1996) amended with appropriate antibiotics, by using an
382 EasySpiral® Pro system (InterScience, Angers). For each time point, stem samplings
383 from three different plants were performed. The experiment was repeated twice with
384 the same results. As we did not know whether IGC data followed a normal
385 distribution or not, we performed a non-parametric Mann-Whitney test to evaluate
386 whether results from biological repetitions were different for each strain.

387

388 **Transient expression of T3E using *Agrobacterium tumefaciens* constructs**

389 Eighteen *A. tumefaciens* strains, each containing one T3E gene from WT strain
390 GMI1000, were used in this study. These strains were constructed by A. C. Cazalé
391 (LIPM) ; their characteristics are summed up in **Table S2**. However, *A. tumefaciens*
392 strains containing *ripAZ1*, *ripAS* or *ripAU* (associated to avirulence on E6 by (Pensec
393 et al., 2015)) were not available at the LIPM for transient expression. After one night
394 in LB liquid containing appropriate antibiotics at half-concentration, bacteria were
395 centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes at 4°C. The pellet was then re-suspended in
396 infiltration solution (MgCl₂ 10 mM, morpholinethanesulfonic acid (MES) 10 mM,
397 150 µl acetosyringone) and shaken for at least two hours in darkness. Bacterial cells
398 were infiltrated at an OD₆₀₀ = 0.4 to 0.5 (equivalent to 4-5.10⁸ CFU.ml⁻¹) using a
399 needless syringe at the abaxial part of leaves. Infiltrated plants were stored at 28°C at
400 a photoperiod of 16h light/8h darkness. HR-like symptoms were evaluated at 24h
401 post-inoculation (hpi), 48 hpi, 72 hpi and 84 hpi using the 10 score-Wroblewski scale
402 (Wroblewski *et al.*, 2009).

403

404 **Construction of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* D36E strains containing**
405 **different *ripAX2* alleles and plant assays**

406 *Cloning R. solanacearum T3Es into the pENTR expression vector*

407 Primers for initial amplification of candidate genes were designed using Primer3
408 website (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) and summarized in
409 **Table S3**. Extra CACC nucleotides were added before the ATG codon on forward
410 primers, in order to produce blunt-end PCR product. These 4 base pair overhang the
411 GTGG sequence in each pENTR™ TOPO® vector (Invitrogene, Waltham, MA,

Chapitre III – Partie 3

412 USA). Reverse primers were designed to end right before the stop codon. PCR
413 reaction to test primers specificity was realized with ImmoMix™ kit (Bioline,
414 London, UK), by mixing 5.5 µl of water, 7.5 µl of ImmoMix™ master mix, 0.5 µl of
415 10 mM stock reverse and forward primer (final concentration 0.07 mM) and 1.5 µl of
416 DNA. The PCR program consisted of 10 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 15 sec,
417 58°C for 30 sec, 72°C for 2 min and a final step at 72°C for 10 min. Once the product
418 obtained was at the expected size, PCR with high fidelity enzyme was realized using
419 KOD hot start master mix (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). The PCR mix and
420 program were performed following the manufacturer instructions. The PCR products
421 were then loaded in 1% gel agarose and electrophoresis was performed 45 min at 90
422 V. Bands at the expected size were then extracted using AccuPrep® gel extraction kit
423 (Bioneer, Alameda, CA, USA). The PCR product was mixed up with 1 µl of sterile
424 water (HyClone® water, Thermo scientific, Waltham, MA, USA), 1 µl of Salt
425 Solution (pENTR™/TOPO Kit®, Invitrogen) and 1 µl of pENTR™ TOPO® vector.
426 TOPO® reaction was gently mixed and incubated for 1 h at room temperature. 3 µl of
427 the reaction were then added into a tube of One Shot® chemically competent
428 *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen) and stored in ice for 30 min. Then cells were
429 heat-shocked by incubation for 45 sec at 42°C in a waterbath. 250 µl of SOC media or
430 LB liquid without antibiotic was added to the cell suspension and incubated for 1 h at
431 37°C and at 200 rpm. Strains were then streaked on LB media supplemented with
432 kanamycin (50 µg.mL⁻¹) and incubated overnight at 37°C. Then, single colonies were
433 picked up and re-streaked on LB media with kanamycin (50 µg.mL⁻¹) and incubated
434 overnight at 37°C. A colony PCR was finally realized using M-13 forward primer and
435 gene-specific reverse primer (**Table S3**) to confirm the good orientation of the insert.
436 PCR conditions and reaction mix composition are described above.

Chapitre III – Partie 3

437

438 *Plasmid extraction and digestion*

439 Plasmids with the correct insert were extracted from LB-kanamycin (50 µg/mL)
440 overnight cultures using *AccuPrep*® Plasmid MiniPrep DNA Extraction Kit
441 (Bionieer) and following the manufacturer's protocol. Then, plasmids were sequenced
442 (Virginia Bioinformatic Institute, Blacksburg, VA, USA) with M13 forward and
443 reverse gene-specific primers (**Table S3**). Sequences were then aligned with the
444 corresponding reference gene using SeqMan software (DNASar, Lasergene). Once
445 the absence of mutation and the correct orientation of the gene were confirmed,
446 bacteria were stored in 50 % glycerol at -80°C.

447

448 *Generation of Pseudomonas syringae pv. tomato D36E strains*

449 Destination vector pEDV6 was used for *P. syringae* pv. tomato D36E transformation
450 (Bao et al., 2014). The empty vector pEDV6 was extracted from 24 h old suspensions
451 of *E. coli* DH5α, as previously described. Lambda Recombination (LR) reactions
452 were then realized including the destination (pEDV6) and entry vectors (pENTR)
453 with the insert diluted to the same concentration (1:1 ratio, usually between 50 and
454 150 ng/µl). 1 µl of entry clone was mixed with 1 µl of destination vector (pEDV6),
455 2 µl of LR clonase II enzyme mix (Life technologies) and 8 µl of TE buffer. After 2h
456 of incubation at room temperature, 2 µl of the reaction were used to transform 50 µl
457 of *E. coli* DH5α chemically competent cells (Life technologies), as described above.
458 After transformation, cells were plated on LB plates containing gentamycin
459 (15 µg.mL⁻¹) and incubated at 37°C overnight. Colonies were re-streaked on the same
460 media and scanned by PCR for the presence of the insert. PCR reaction was
461 performed using a pEDV6 vector-specific forward primer (*avrRps4* (pEDV6)-F) and a

Chapitre III – Partie 3

462 gene-specific reverse primer (**Table S3**), and the ImmoMix™ kit (Bioline). Colonies
463 with the correct insert were then stored at -80°C in 50 % glycerol stocks.

464 Strains of *E. coli* DH5 α containing *ripAX2* of *R. solanacearum* were plated with
465 *E. coli* strain RK600 (helper) and *P. syringae* pv. tomato D28E (DC3000 lacking
466 T3E) (Bao et al., 2014) on King's B medium (King *et al.*, 1954) using 1 mL loop and
467 incubated overnight at 28°C. Then, single colonies were picked up and re-streak on
468 KB supplemented with nitrofurantoin (100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) and tetracyclin (15 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$).
469 Isolated colonies were grown overnight on KB media with nitrofurantoin (100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
470 and tetracycline (15 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) and stored at -80°C in 50% glycerol stocks.

471

472 *Leaf infiltration conditions, phenotyping and IGC of Pto D36E containing different*
473 *ripAX2 alleles*

474 E6 and E8 plants were infiltrated with these strains as previously described for
475 *A. tumefaciens* with slight modifications. Infiltration solution was realized with a
476 bacterial suspension calibrated at OD₆₀₀ = 0.4 in 10 mM MgSO₄. *P. syringae* pv.
477 *tomato* DC3000 was used as a negative control. Two days after infiltration, three leaf
478 discs from three different leaves were punched in the green area (no cell death), using
479 a 200 μl pipette tip (corresponding to 0.32m² area). Leaf punches were homogenized
480 in 1.2 mL VWR® library tube (Radnor, PA, USA) containing three 2 mm-beads and
481 200 μl of 10 mM MgSO₄. Samples were placed in a BeadBeater (Biospec Products,
482 Bartlesville, OK, USA) and shaken 3*30 sec. Three dilutions were realized (1/1000;
483 1/10000; 1/100000) and 10 μl of each dilution were dripped in 1/6th KB plate
484 containing appropriate antibiotics. Two days after streaking, the number of colonies
485 was counted to calculate CFU.cm⁻² for each leaf punches. Meanwhile, HR-like
486 symptoms were monitored as previously described for *A. tumefaciens* infiltration.

487

488 **Comparative genomics of ripAX2 environment**

489 The 9 *R.solanacearum* genomes sequenced and annotated (Guinard et al 2015b) were
490 submitted to the RalstoT3E website to assess the respective positions of all T3E. The
491 presence of a ripAX2 ortholog and the genomic environment of each ripAX2 ortholog
492 were visually described using the Geneious software v. 8.1 (Biomatters).

493

494 **6. ACKNOWLEDGEMENT**

495

496 We thank Edith Lallemand-Mamosa, Patrick Barberis, Sylvain Lebon and
497 Jean-Michel Baptiste for their significant technical support. We are grateful to
498 Marie-Christine Daunay (INRA d'Avignon, France) for the production of E6 and E8
499 seeds. We thank Allan Collmer (Cornell University, Ithaca, NY, USA) who kindly
500 provided *Pst D36E* strains and John McDowell (VirginiaTech University, Blacksburg,
501 VA, USA) who provided the pEDV6 plasmid. Jérémy Guinard PhD grant was
502 financially supported by a fellowship from both CIRAD and the University of la
503 Réunion, by the projects "GENETOM3" and "BSV2.1" (FEDER project financed by
504 the European Union and Région Réunion), by the CASDAR project RESAUBER
505 ("Sustainable management of eggplant resistances to bacterial wilt", French Ministry
506 of Agriculture) and by the Agreenium Foundation through the EIR-A program. This
507 work was also supported by the ANR-07-JCJC-0133 project managed by NP and by
508 the French Laboratory of Excellence project "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-
509 IDEX-0002-02). This work was also supported by the National Science Foundation
510 (IOS-1354215) of the United States of America. The authors declare no conflict of
511 interest.

512 7. REFERENCES

- 513 Alfano, J. R. and Collmer, A. (2004) Type III secretion system effector proteins: double
514 agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **42**, 385-
515 414.
- 516 Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., *et al.* (2006)
517 *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors
518 to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14620-
519 14625.
- 520 Ano, G., Anais, G. and Chidiac, A. (2002) Creation and use of disease-resistant varieties in
521 Guadeloupe [France]. - Creation de varietes resistantes aux maladies en
522 Guadeloupe [France]. Elements indispensables de diversification agricole.
523 *Phytoma*, 36-37.
- 524 Ano, G., Hebert, Y., Prior, P. and Messiaen, C. M. (1991) A New Source of Resistance to
525 Bacterial Wilt of Eggplants Obtained from a Cross - *Solanum-Aethiopicum* L X
526 *Solanum-Melongena* L. *Agronomie*, **11**, 555-560.
- 527 Bao, Z., Stodghill, P. V., Myers, C. R., Lam, H., Wei, H.-L., Chakravarthy, S., *et al.* (2014)
528 Genomic plasticity enables phenotypic variation of *Pseudomonas syringae* pv.
529 tomato DC3000. *PloS one*, **9**.
- 530 Ben, C., Debellcb, F., Berges, H. n., Bellec, A., Jardinaud, M. o., Anson, P., *et al.* (2013)
531 MtQRRS1, an Rlocus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to
532 *Ralstonia solanacearum*. *new phytologist*, **199**, 758-772.
- 533 Bousset, L., Brun, H., Chèvre, A.-M. and Delourme, M. (2011) Quel lien entre
534 l'épidémiologie, la création variétale et le potentiel de durabilité des résistances?
535 Illustration chez le phoma du colza.
- 536 Buddenhagen, I. W., Sequeira, L. and Kelman, A. (1962) Designation of races in
537 *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, **52**, 726.
- 538 Carney, B. F. and Denny, T. P. (1990) A cloned avirulence gene from *Pseudomonas*
539 *solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host
540 species level. *Journal of bacteriology*, **172**, 4836-4843.
- 541 Clarke, C. R., Studholme, D. J., Hayes, B., Runde, B., Weisberg, A., Cai, R., *et al.* (2015)
542 Genome-Enabled Phylogeographic Investigation of the Quarantine Pathogen
543 *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 and Screening for Sources of Resistance
544 Against Its Core Effectors. *Phytopathology*, **105**, 597-607.
- 545 Cook, D., Barlow, E. and Sequeira, L. (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas*
546 *solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphisms with
547 DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Molecular*
548 *Plant-Microbe Interactions*, **2**, 113-121.
- 549 Cook, D. E., Mesarich, C. H. and Thomma, B. P. (2015) Understanding Plant Immunity as a
550 Surveillance System to Detect Invasion. *Phytopathology*, **53**, 541.
- 551 Cornelis, G. R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Reviews Microbiology*, **4**,
552 811-825.
- 553 Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C. and Genin, S. (2004) Inventory and
554 functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*:
555 identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through
556 the type III secretion system. *Molecular Microbiology*, **53**, 115-128.
- 557 Daverdin, G., Rouxel, T., Gout, L., Aubertot, J.-N., Fudal, I., Meyer, M., *et al.* (2012) Genome
558 structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a
559 fungal phytopathogen.
- 560 Deberdt, P., Guyot, J., Coranson-Beaudu, R., Launay, J., Noreskal, M., Riviere, P., *et al.*
561 (2014) Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands
562 knowledge on the "emerging ecotype". *Phytopathology*, **104**, 586-596.

Chapitre III – Partie 3

- 563 Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D., Bittner, E., P., *et al.* (2002)
564 Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the
565 recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes.
566 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,
567 **99**, 2404-2409.
- 568 Doganlar, S., Frary, A., Ku, H. M. and Tanksley, S. D. (2002) Mapping quantitative trait loci
569 in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome /*
570 *National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches*
571 *Canada*, **45**, 1189-1202.
- 572 Elphinstone, J. G. (2005) The current bacterial wilt situation: a global overview. In:
573 *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. (Allen, C.,
574 Prior, P. and Hayward, A. C., eds.). Saint Paul, MN, USA: APS Press, pp. 9-28.
- 575 Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K. and Stead, D. E. (1996) Sensitivity of different
576 methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts.
577 *Bulletin Oepp (Organisation Europeenne et Mediterraneenne Pour la Protection*
578 *des Plantes)*, **26**, 663-678.
- 579 Eynck, C., Koopmann, B., Karlovsky, P. and Von Tiedemann, A. (2009) Internal resistance
580 in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen
581 *Verticillium longisporum*. *Phytopathology*, **99**, 802-811.
- 582 Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual review of*
583 *phytopathology*, **9**, 275-296.
- 584 Genin, S. (2010) Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in
585 *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, **187**, 920-928.
- 586 Gijsegem, F. v., Vasse, J., Rycke, R. d., Castello, P. and Boucher, C. (2002) Genetic
587 dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV
588 and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Molecular Microbiology*,
589 **44**, 935-946.
- 590 Greenberg, J. T. and Yao, N. (2004) The role and regulation of programmed cell death in
591 plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology*, **6**, 201-211.
- 592 Guinard, J., Latreille, A., Guérin, F., Poussier, S. and Wicker, E. (2015a) A new multilocus
593 variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for fine-tune
594 monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylotype I
595 populations. *BMC Microbiology*.
- 596 Guinard, J., Vinatzer, B. A., Poussier, S., Lefeuvre, P. and Wicker, E. (2015b) Draft Genome
597 sequence of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to
598 eggplant (*Solanum melongena*). *Genome Announcement*, **accepted**.
- 599 Hayward, A. C. (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied*
600 *Bacteriology*, **27**, 265-277.
- 601 Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R. and Kamoun, S. (2009) Emerging
602 concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular plant-*
603 *microbe interactions*, **22**, 115-122.
- 604 Janse, J. D. and Schans, J. (1998) Experiences with the diagnosis and epidemiology of
605 bacterial brown rot (*Ralstonia solanacearum*) in The Netherlands. *Bulletin Oepp*
606 *(Organisation Europeenne et Mediterraneenne Pour la Protection des Plantes)*, **28**,
607 65-67.
- 608 Jones, J. D. and Dangl, J. L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- 609 Kelman, A. (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to
610 colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, **44**, 693-695.
- 611 King, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954) Two simple media for the demonstration
612 of pyocyanin and fluorescin. *The journal of laboratory and clinical medicine*, **44**,
613 301-307.
- 614 Kiyosawa, S. (1982) Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant
615 disease resistance. *Annual review of phytopathology*, **20**, 93-117.

Chapitre III – Partie 3

- 616 Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N. and Boucher, C. (2002) *PopP1*, a new
617 member of the *YopJ/AvrRxv* family of type III effector proteins, acts as a host-
618 specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*.
619 *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **15**, 1058-1068.
- 620 Lebeau, A. (2010) Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia*
621 *solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité
622 bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués
623 chez l'aubergine. In: *Faculté des Sciences et Technologies*. Saint Denis de la
624 Réunion: Université de la Réunion.
- 625 Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., *et al.* (2011)
626 Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources
627 respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex.
628 *Phytopathology*, **101**, 154-165.
- 629 Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., *et al.* (2012) Genetic
630 mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in
631 eggplant. *Theoretical and Applied Genetics*, **126**, 143-158.
- 632 Lohou, D., Turner, M., Lonjon, F., Cazalcb, A., Peeters, N., Genin, S., *et al.* (2014) HpaP
633 modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a
634 substrate specificity switch domain essential for virulence. *Molecular plant*
635 *pathology*, **15**, 601-614.
- 636 McDonald, B. A. and Linde, C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary
637 potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 349-379.
- 638 Montarry, J., Corbiere, R., Lesueur, S., Glais, I. and Andrivon, D. (2006) Does selection by
639 resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems? *Journal of*
640 *Evolutionary Biology*, **19**, 522-531.
- 641 Monteiro, F., Sole, M., Dijk, I. v. and Valls, M. (2012) A chromosomal insertion toolbox for
642 promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in
643 *Ralstonia solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, **25**, 557-568.
- 644 Moury, B. (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of Potato virus Y.
645 *Molecular plant pathology*, **11**, 161-168.
- 646 Mukaihara, T., Tamura, N. and Iwabuchi, M. (2010) Genome-Wide Identification of a
647 Large Repertoire of *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Proteins by a New
648 Functional Screen. *Molecular plant-microbe interactions*, **23**, 251-262.
- 649 N'Guessan, A. C. (2013) Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de
650 *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien, en Côte d'Ivoire. In:
651 *UFR BioSciences*. Abidjan: Université de Cocody-Abidjan, pp. 217.
- 652 N'Guessan, A. C., Koné, D. and Wicker, E. (2012) Etude de la structure des populations
653 ivoiriennes de *Ralstonia solanacearum* par analyse multilocus VNTR (MLVA). In:
654 *10èmes Rencontres Plantes-Bactéries*. Aussois, France: IRD/SFP/INRA/CIRAD,
655 pp. 8.
- 656 Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., *et al.* (2014)
657 *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a
658 hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*.
659 *Molecular Plant Pathology*, **15**, 297-303.
- 660 Palloix, A., Aymé, V. and Moury, B. (2009) Durability of plant major resistance genes to
661 pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and
662 consequences for breeding strategies. *New Phytologist*, **183**, 190-199.
- 663 Peeters, N., Carrere, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazale, A. C. and Genin, S. (2013a)
664 Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set
665 in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC Genomics*, **14**, n.p.
- 666 Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F. and Valls, M. (2013b) *Ralstonia solanacearum*, a
667 widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant*
668 *Pathology*, **14**, 651-662.

Chapitre III – Partie 3

- 669 Pensec, F., Lebeau, A., Daunay, M.-C., Chiroleu, F., Guidot, A. and Wicker, E. (2015)
670 Towards the identification of Type III effectors associated to *Ralstonia*
671 *solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology*.
- 672 Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A. C., *et al.*
673 (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum*
674 GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Molecular plant-microbe*
675 *interactions*, **22**, 538-550.
- 676 Robertson, A. E., Wechter, W. P., Denny, T. P., A., F. B. and A., K. D. (2004) Relationship
677 between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and
678 bacterial wilt incidence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 1376-1384.
- 679 Sole, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K., Jones, J. D. G., Deslandes, L., *et al.* (2012) The *awr*
680 gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors
681 displaying virulence and avirulence activities. *Molecular plant-microbe*
682 *interactions*, **25**, 941-953.
- 683 Stukenbrock, E. H. and McDonald, B. A. (2008) The origins of plant pathogens in agro-
684 ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **46**, 75-100.
- 685 Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M. F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., *et al.* (2007)
686 Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia*
687 *solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular plant-*
688 *microbe interactions*, **20**, 159-167.
- 689 Vleeshouwers, V. G. and Oliver, R. P. (2014) Effectors as tools in disease resistance
690 breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens.
691 *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **27**, 196-206.
- 692 Wang, K., Remigi, P., Anisimova, M., Lonjon, F., Kars, I., Kajava, A., *et al.* (2015) Functional
693 Assignment to Positively Selected Sites in the Core Type III Effector RipG7 from
694 *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant Pathol*.
- 695 Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., *et al.*
696 (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies)
697 exhibiting a new pathogenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*,
698 **73**, 6790-6801.
- 699 Wicker, E., Grassart, L., Mian, D., Coranson Beaudu, R., Dufeal, D., Guilbaud, C., *et al.*
700 (2002) *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp,
701 new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies).
702 *Bacterial Wilt Newsletter*, **17**, 20-21.
- 703 Wroblewski, T., Caldwell, K. S., Piskurewicz, U., Cavanaugh, K. A., Xu, H., Kozik, A., *et al.*
704 (2009) Comparative large-scale analysis of interactions between several crop
705 species and the effector repertoires from multiple pathovars of *Pseudomonas*
706 and *Ralstonia*. *many ref.*, **150**, 1733-1749.
- 707 Wu, F. N., Eannetta, N. T., Xu, Y. M. and Tanksley, S. D. (2009) A detailed synteny map of
708 the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers.
709 *Theoretical and Applied Genetics*, **118**, 927-935.
- 710 Xi'ou, X., Bihao, C., Guannan, L., Jianjun, L., Qinghua, C., Jin, J., *et al.* (2014) Functional
711 Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (RE-bw) in
712 Eggplant. *Plant Mol Biol Rep*, 1-16.
- 713 Zeigler, R. S., Nelson, J. and Levy, R. (1994) Lineage exclusion: a proposal for linking blast
714 population analysis for resistance breeding. In: *Rice Blast Disease,, Los Banos,*
715 *Laguna (Philippines), 1994.* CAB InternationalInternational Rice Research
716 Institute.

717

718

719 **8. FIGURE LEGENDS**

720

721 **Figure 1.** Virulence assay of different GMI1000-derived strains. Four weeks old resistant
722 (E6) and susceptible eggplants (E8) were root inoculated with *R. solanacearum* GMI1000
723 (WT), the single *ripAX2* mutant strain (GRS359) and GRS359 strain complemented with
724 *ripAX2*_{GMI1000} (Rs719). The experiment was performed four times, presenting the same results.
725 **(A)** Disease symptoms of resistant (E6) and susceptible eggplants (E8) inoculated with
726 *R. solanacearum* strains. Pictures were taken 12 days after inoculation. All susceptible
727 cultivars inoculated with the three strains wilted whereas only resistant eggplant inoculated
728 with GRS359 presented disease symptoms. **(B)** Bacterial wilting symptoms evolution on E6
729 and E8 plants. Plants were inoculated by root scarification and disease symptoms were scored
730 every day according to Lebeau et al. scale (Lebeau et al., 2011).

731 **Figure 2.** *In planta* bacterial growth of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strain D36E
732 containing different *ripAX2* alleles. Strain numbers correspond to the strains containing the
733 different alleles of *ripAX2*: 4878: *ripAX2*_{Molk2}; 4881: *ripAX2*_{Molk2-OF}; 4887: *ripAX2*_{GMI1000};
734 4890: *ripAX2*_{RUN1900}. MM738 corresponds to the susceptible eggplant (E8) and MM960
735 corresponds to the resistant eggplant (E6). **(A)** and **(C)** correspond to the first infiltration
736 performed with a bacterial suspension of OD₆₀₀ = 0.1 ; **(B)** and **(D)** corresponding to a second
737 infiltration realized with a bacterial suspension of OD₆₀₀ = 0.03.

738 **Figure 3.** *In planta* bacterial growth of strains containing the *ripAX2*_{GMI1000} allele or not.
739 Resistant (E6) and susceptible eggplants (E8) were inoculated by roots scarification with
740 *R. solanacearum* wild type strains (GMI1000), the mutant strain in *ripAX2* (GRS359) and the
741 complemented mutant strain (Rs719). **(A)** Internal Growth Curve of *R. solanacearum* strains
742 at 4 days after inoculation **(B)** Internal Growth Curve at 7 days after inoculation with the
743 same strains. Experiments were performed twice and gave the same results.

Chapitre III – Partie 3

744 **Figure 4.** Schematic representation of the genomic environment (5 genes upstream and 5
745 genes downstream) of *ripAX2* in different strains of *R. solanacearum*. The red box represents
746 *ripAX2* gene. Frag. = fragment.

747

748 **9. SUPPORTING TABLES LEGENDS**

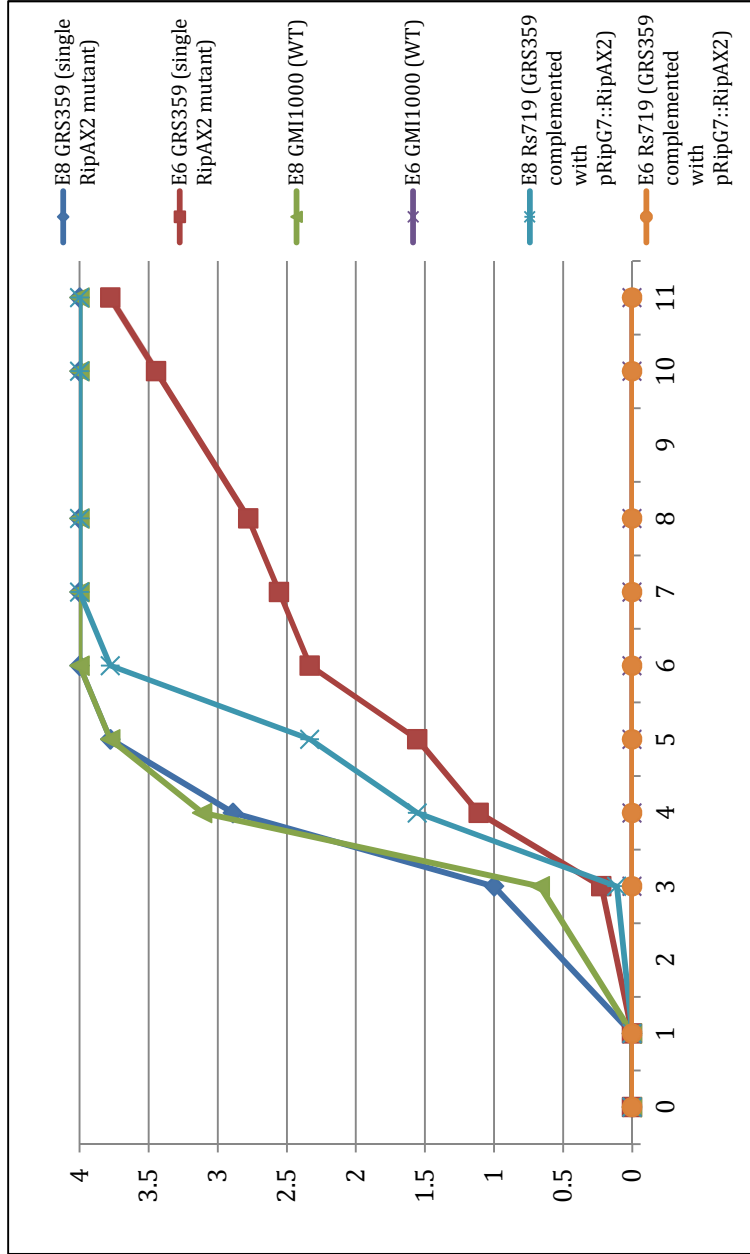
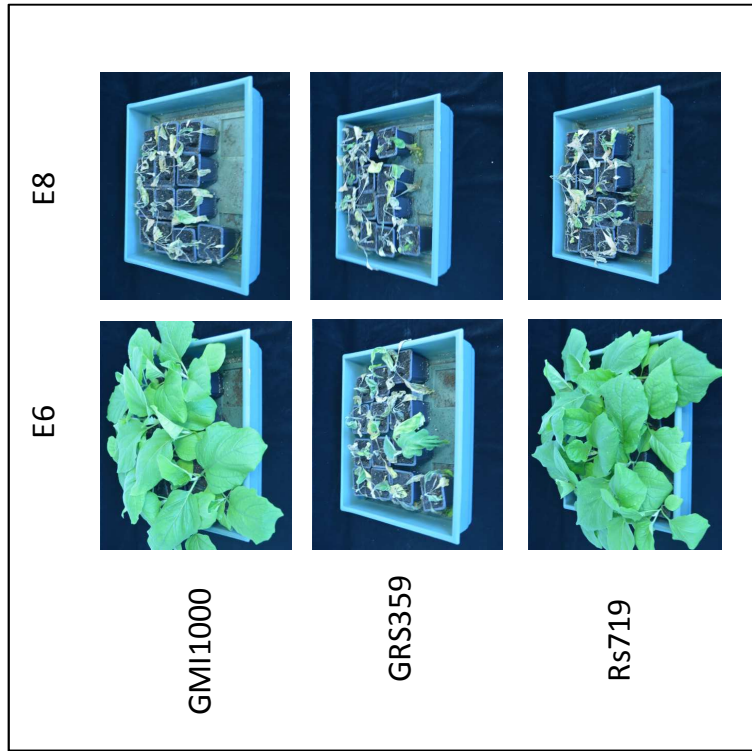
749

750 **Table S1.** List of *Ralstonia solanacearum* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains used
751 and plasmid constructed in this study.

752 **Table S2.** List of primers used in this study.

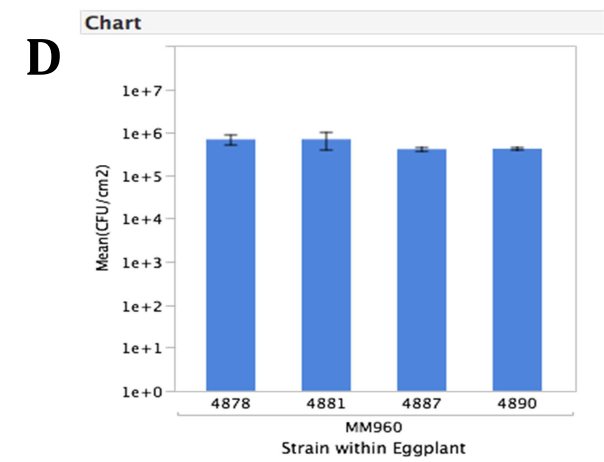
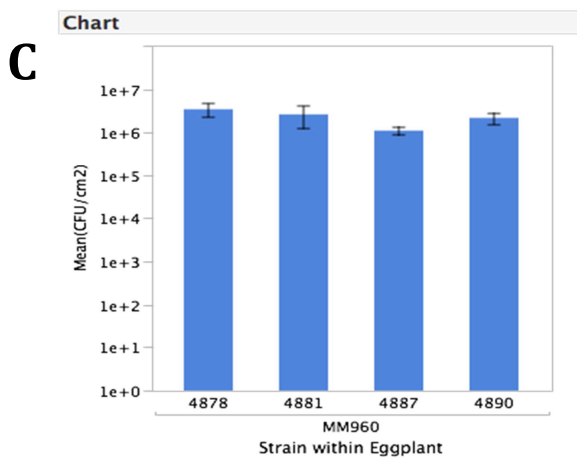
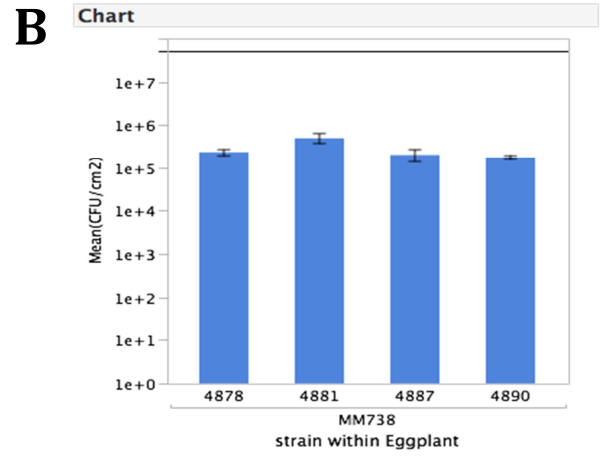
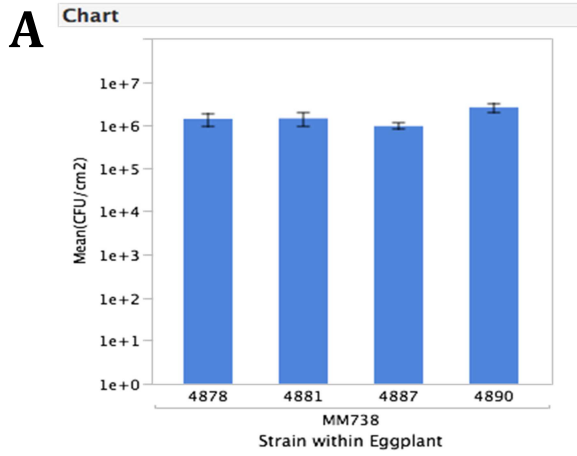
753 **Table S3.** List of *Agrobacterium tumefaciens* strains containing *R. solanacearum* GMI1000
754 effectors used in this study.

Chapitre III – Partie 3

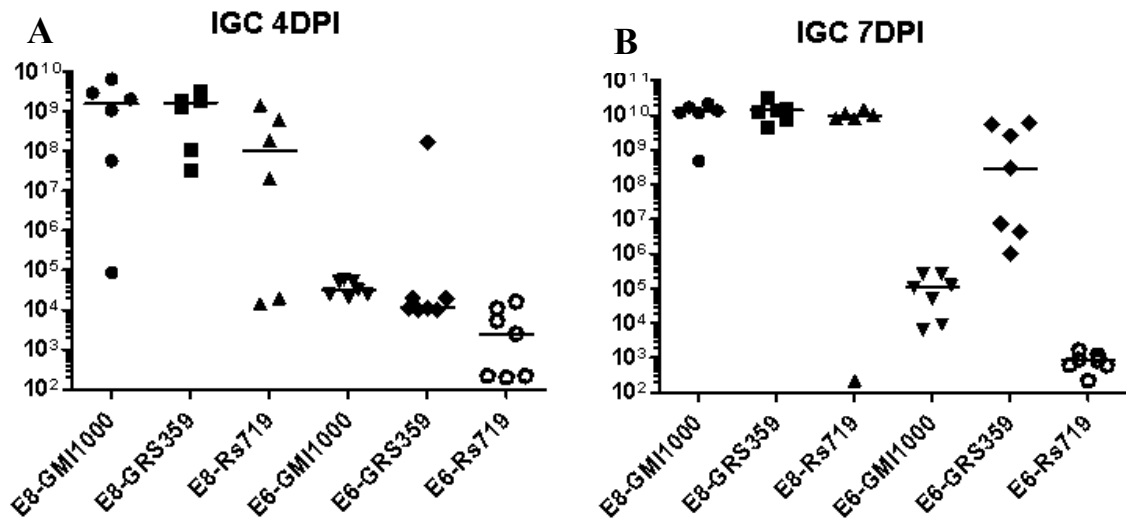


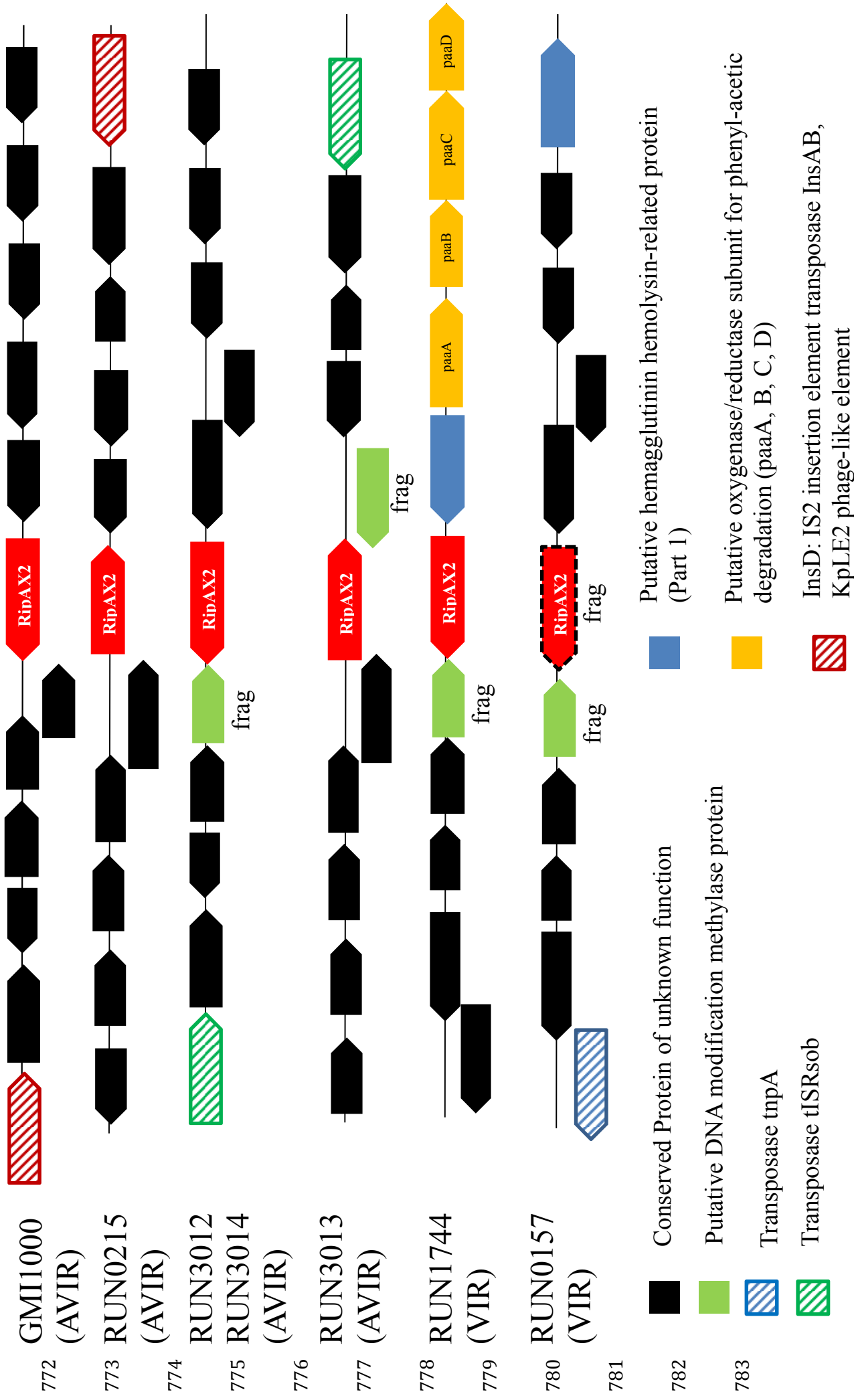
Chapitre III – Partie 3

756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770



771





Chapitre III – Partie 3

Species	Strains	Characteristics	References
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Wild type strain, Rif	
	DC3000	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{GMI1000}), Rif ^r , Gm ^r	This study
	DC3000	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{GMI1000}), Rif ^r , Gm ^r	This study
	DC3000	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{RUN1900}), Rif ^r , Gm ^r	This study
	D36E	mutated in its 36 effectors	Bao et al., 2014
	D36E	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{GMI1000}), Strep ^r , Gm ^r	This study
	D36E	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{MOLK2}), Strep ^r , Gm ^r	This study
	D36E	pEDV6(<i>ripAX2</i> _{RUN1900}), Strep ^r , Gm ^r	This study
<i>Ralstonia solanacearum</i>	GMI1000	Wild type strain	Boucher et al., 1987
	GRS359	GMI1000 mutated in <i>ripAX2</i> gene	Cunnac et al., 2004
	Rs719	GRS359(Δ <i>ripAX2</i> _{GMI1000}) complemented with pNP329(<i>prpG7::ripAX2</i> _{GMI1000})	This study
	GRS417	GMI1000 mutated in <i>ripG3</i> (RSp0028)	Angot et al., 2006
	GRS287	GMI1000 mutated in <i>ripH3</i> (RSp0160)	
	GRS216	GMI1000 mutated in <i>ripTAL</i> (RSc1815)	Cunnac et al., 2004
	GRS72	GMI1000 mutated in <i>ripD</i> (RSp0304)	Cunnac et al., 2004
	GRS142	GMI1000 mutated in <i>ripAF1</i> (RSp0822)	Cunnac et al., 2004
	GMI1687	GMI1000 mutated in <i>ripX</i> (RSp0877)	Gijsegem et al., 2002
	GMI1658	GMI1000 mutated in <i>ripP1</i> (RSc0826)	Peeters et al., 2013
	GRS100	GMI1000 mutated in <i>ripP2</i> (RSc0868)	Deslandes et al., 2002
	GRS70	GMI1000 mutated in <i>ripS4</i> (RSc1839)	
	GRS412	GMI1000 mutated in <i>ripAJ</i> (RSc2101)	Christian Boucher, unpublished data
	GRS103	GMI1000 mutated in <i>ripE1</i> (RSc3369)	
	GRS176	GMI1000 mutated in <i>ripL</i> (RSp0193)	
	GRS166	GMI1000 mutated in <i>ripAY</i> (RSp1022)	Cunnac et al., 2004
	GRS289	GMI1000 mutated in <i>ripN</i> (RSp1130)	
	GRS291	GMI1000 mutated in <i>ripAS</i> (RSp1384)	
	GRS401	GMI1000 mutated in <i>ripAZ1</i> (RSp1582)	
	GRS517	GMI1000 mutated in <i>ripAU</i> (RSp1460)	
	MEM22	GMI1000 mutated in <i>ripX-ripAB-ripAC-RSp0842-ripTPS-ripW-ripR-ripS1-ripA2-ripAD-ripA4-ripA3-ripA4-ripAA</i>	
	GRS447	GMI1000 mutated in <i>ripG2-ripG4-ripG5, ripG6-ripG7-ripG1::Ω-ripG3::Ω</i>	Angot et al., 2006
	GRS499	GMI1000 mutated in <i>ripA1-ripA2-ripA3-ripA4-ripA5</i>	
	MEM37	GMI1000 mutated in <i>ripA2-ripG6-ripG7-ripH1-ripH2-ripH3</i>	
	MEM47	GMI1000 mutated in <i>ripS1-ripS2-ripS3-ripS4-ripS5-ripS6</i>	
	MEM40	GMI1000 mutated in <i>ripA2-ripAA-ripAB-ripAC-ripH1-ripH2-ripH3-ripR-ripW</i>	

784

785

Chapitre III – Partie 3

Rip code	Gene	Description	TAG	Plasmid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain
<i>RipD</i>	RSp0304	AvrPphD	HAS		
<i>RipE1</i>	RSc3369		HAS		
<i>RipG1</i>	RSp0914	F-box LRR protein <i>GALA1</i>	YFP	pPR65	C58C1
<i>RipG3</i>	RSp0028	F-box LRR protein <i>GALA3</i>	YFP	pPR66	C58C1
<i>RipG4</i>	RSc1800	F-box LRR protein <i>GALA4</i>	YFP	pPR68	C58C1
<i>RipG5</i>	RSc1801	F-box LRR protein <i>GALA5</i>	YFP	pPR176	C58C1
<i>RipG6</i>	RSc1356	F-box LRR protein <i>GALA6</i>	YFP	pPR153	C58C1
<i>RipG7</i>	RSc1357	F-box LRR protein <i>GALA7</i>	YFP	pPR148	C58C1
<i>RipN</i>	RSp1130	Nudix hydrolase	RFP	pNP149	GV3101
<i>RipP1</i>	RSc0826	(<i>PopP1</i>); putative acetyltransferase	CFP	pAM-PAT	GV3103
<i>RipP2</i>	RSc0868	Acetyltransferase	3HA	pAM-PAT	GV3103
<i>RipP2-C321A</i>	RSc0868	Acetyltransferase	3HA		
<i>RipAF1</i>	RSp0822	Putative ADP-ribosyltransferase	HAS		
<i>RipAZ1</i>	RSp1582		3HA		
<i>RipAJ</i>	RSc2101		HAS		
<i>RipAX2</i>	RSp0572	zinc-dependent binding domain	HAS		
<i>RipAY</i>	RSp1022		HAS		
<i>RipTAL1</i>	RSc1815	Transcription Activator-Like protein (AvrBs3)	HAS		
<i>RipAS</i>	RSp1384				Not available
<i>RipAU</i>	RSp1460				Not available
<i>RipS4</i>	RSc1839	SKWP4			Not available

Chapitre III – Partie 3

Target	Primer name	Sequence 5'-3'	TM (°C)	Expected size (bp)	Hybridation temperature	Cycle number	Use
<i>ripAX2</i>	<i>ripAX2_GMI1000_F</i>	5'-CACCATGCTTATACAGACACAGTACCCTGGGTTTTTAC-3'	61.82	650	57	35	Cloning into pEDV-6 vector
	<i>ripAX2_GMI1000_R</i>	5'-TTATGCCGTTGCCGTTGGCTTG-3'	62.98				
M13 sites	M13_F	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	51.51	Effector size + M13 priming sites	58	30	Verification insert insertion in pENTR vector, sequencing
	M13_R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	44.37				
avrRps4 sites	avrRps4(pEDV6)_F	5'-TTCAAACCAAGTTCAGTAAATTTCCA-3'	57.26	Effector size + avrRps4 priming sites	58	35	Verification insert insertion in pEDV-6 vector, sequencing
	avrRps4(pEDV6)_R	5'-GTGACGATGAGCCAATTTGA-3'	58.07				

786

787

CHAPITRE 4:
DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette thèse avait pour objectif d'estimer la durabilité de la résistance de l'aubergine AG91-25 (ou E6), vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*, l'agent causal du flétrissement bactérien. Cette variété possède la particularité de contenir le gène majeur de résistance *ERS1* dans son génome, lui permettant de résister à différentes souches de *R. solanacearum* [426]. Cependant, les travaux de l'équipe ont très tôt établi que cette résistance était contournée par des souches pré-existantes dans l'environnement, notamment en Côte d'Ivoire [219], en Guyane française [428] ainsi qu'en Thaïlande, en Indonésie et à Taïwan [425].

Nous avons donc choisi d'estimer la durabilité de la résistance d'E6 à plusieurs échelles. **A l'échelle globale**, l'objectif était d'identifier les gènes codant les effecteurs de type III impliqués dans l'avirulence sur E6, et les forces évolutives agissant sur leur variabilité (distribution, polymorphisme nucléotidique), par une approche de génétique comparative et évolutive. **A l'échelle de la parcelle de culture**, nous nous sommes attachés à caractériser la dynamique évolutive d'une population naturelle de *R. solanacearum* sous pression de sélection de l'aubergine, et spécifiquement de la résistance d'E6. Plus précisément, nous avons tenté d'identifier les mécanismes en jeu dans la dynamique évolutive qui permet à une population pathogène de s'adapter à une espèce végétale ou un génotype particulier. **Finalement, à l'échelle de la plante**, nous avons cherché à caractériser la fonction d'avirulence spécifique des effecteurs candidats sur l'aubergine E6. L'originalité de ce travail de thèse, par rapport aux travaux réalisés précédemment dans l'équipe, est l'association d'une approche de génétique des populations avec une approche de génétique évolutive et fonctionnelle.

1) Quel est l'implication des effecteurs candidats dans l'interaction *R. solanacearum* vs aubergine E6?

Une étude précédente réalisée dans l'équipe a permis d'identifier 10 gènes codant des effecteurs associés à de l'avirulence sur aubergine résistante (E6 et E1), piment (P8) et tomate (T5) [376]. Ces effecteurs présentent une grande variabilité de distribution et de polymorphisme entre eux dans notre large collection de souches. Par exemple, les effecteurs *ripAJ* et *ripE1* sont présents chez la quasi-totalité des souches étudiées, avec un polymorphisme nucléotidique supérieur pour *ripE1* par rapport à *ripAJ*. Plusieurs autres études ont aussi constaté la large distribution de *ripAJ* et *ripE1* dans les souches de *R. solanacearum* au plan mondial et ont identifié ces effecteurs comme appartenant au *core-effectome* de *R. solanacearum* [275, 280, 281, 376]. Le site web « Ralstonia T3E », regroupant les génomes de *R. solanacearum* actuellement disponibles dans les bases de données internationales, montre aussi que ces effecteurs sont les plus partagés entre les 36 souches de *R. solanacearum* dont les génomes ont été séquencés [280]. L'expression et l'injection de *ripE1* par un clone agro-infectieux (expression transitoire) provoque une faible réaction hypersensible (HR) sur l'aubergine E1 (MM853)

[281] mais ne semble pas contribuer à l'avirulence sur E6 (MM960) (cette étude). La forte conservation de *ripAJ* et *ripEI* suggère qu'ils contribueraient à la *fitness* bactérienne. Il est aussi possible que ces effecteurs aient été conservés chez *R. solanacearum* car les plantes-hôtes n'ont pas développé de résistance efficace contre eux [281]. Etant donné que l'inoculation racinaire avec les mutants de ces effecteurs ne provoque pas de flétrissement bactérien, *ripAJ* et *ripEI* pourraient être impliqués dans la *fitness in planta*, ou dans une autre phase du cycle de vie de *R. solanacearum*.

À l'inverse, d'autres effecteurs – tels que *ripP1*, *ripP2* et *ripAX2* – sont moins fréquemment retrouvés dans notre collection de souches. Ce sont aussi eux qui présentent la phylogénie ET3 la moins congruente avec la phylogénie basée sur des gènes de ménage. Ces incongruences phylogénétiques chez *R. solanacearum* sont généralement dus à des transferts horizontaux [286] et/ou à de la recombinaison [166]. Les incongruences obtenues dans notre étude étayant la thèse d'un transfert horizontal de ces gènes d'effecteurs, proposée par Peeters et coll. : ces trois gènes d'effecteurs auraient été acquis par intégration de séquences prophagiques dans le génome de *R. solanacearum* [280, 367]. Toutefois leur polymorphisme est contrasté, *ripP2* étant très polymorphe alors que *ripP1* et *ripAX2* présentent peu de polymorphisme. Ces variations de taille observées dans notre étude, peuvent être dues à des réarrangements génomiques variés (insertion d'IS, délétion...), et ont déjà été rapportées chez les effecteurs (i) de *R. solanacearum* [369] et (ii) de différentes espèces de *Xanthomonas* [384]. Ces résultats soulignent aussi l'une des limites de notre approche : un polymorphisme trop important dans les régions flanquantes ou dans sa séquence codante d'un gène effecteur ne permettra pas son amplification par PCR et donc biaisera le résultat de présence/absence. D'un point de vue global, ces résultats confirment ceux précédemment obtenus dans l'équipe proposant ces trois effecteurs comme les meilleurs candidats d'avirulence sur E6 [376], aussi confirmés par les données de séquençages des 9 génomes de *R. solanacearum* nouvellement obtenus. Nos résultats confirment également les résultats obtenus par d'autres équipes mais sur différentes plantes : *ripP2* a été identifié comme ayant une fonction d'avirulence sur *Arabidopsis thaliana* [76], *ripP1* et a été identifié comme un facteur d'avirulence sur le pétunia (*Petunia hybrida*) cv. St40 [367] et *ripAX2* a montré une fonction d'avirulence sur *S. torvum* [375]. Cependant, leur rôle au plan fonctionnel reste inconnu à l'heure actuelle sauf pour *ripP2*. La fonction moléculaire de cet effecteur (allèle *ripP2*_{GMI1000}) a été largement étudiée et il a été démontré comme interagissant spécifiquement avec RRS1-R chez *Arabidopsis thaliana* Nd1 [76, 352, 405, 407] et avec le gène *RE-bw* chez l'aubergine cv. E-31 [430]. Cet effecteur a été identifié par Pensec et coll. comme étant le meilleur candidat pour une fonction d'avirulence sur E6 et un potentiel interacteur avec le gène de résistance *ERs1* [376]. *RipP1*, quant à lui, est reconnu par les gènes de résistance du tabac (*Nicotiana glutinosa*) où il provoque une HR [358] et *ripAX2* induit une HR sur *S. torvum* [375].

Nos résultats ne nous ont cependant pas permis d'associer un répertoire d'effecteurs à un phénotype sur aubergine résistante E6, confirmant les résultats précédemment obtenus dans l'équipe lors d'une étude d'association phénotype-génotype [376]. Les mêmes résultats ont été obtenus chez

Xanthomonas citri pv. *citri* où la gamme d'hôtes de ce pathogène n'est pas uniquement déterminée par les répertoires d'effecteurs [387]. Nos résultats vont cependant à l'encontre de la théorie « répertoire-pour-répertoire » [384]. Cette étude a démontré que, chez les espèces *Xanthomonas*, incluant *Xanthomonas axonopodis*, *X. arboricola* et *X. oryzae*, la composition en répertoire d'effecteurs et la spécificité d'hôte des souches étaient hautement corrélées [384, 386, 462].

2) L'aubergine E6 présente une résistance durable au champ et semble influencer sur le niveau d'inoculum infectieux

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à une pression de sélection d'un hôte résistant, nous avons mis en place un essai expérimental de 3 années dans une parcelle naturellement infestée par *R. solanacearum* phylotype I [202]. Deux cycles de culture ont été réalisés par an (soit 5 cycles en 3 ans) et chaque cycle est composé de 3 microparcelles d'aubergines résistante E6 et de 3 microparcelles d'aubergine sensible E8.

L'ensemble de nos résultats montrent que la variété résistante d'aubergine E6, possédant le gène majeur de résistance *ERsI* [426], a un fort impact sur les populations bactériennes présentes au sein de nos parcelles. Les résultats de suivi de l'incidence de la maladie au champ montrent une absence de contournement de la résistance d'E6 par nos populations parcellaires de *R. solanacearum*. Au début de cette étude, nous nous attendions à observer un contournement rapide de la résistance car une résistance conférée par un seul gène de résistance présente généralement un fort risque de contournement [109, 119, 120]. On peut ainsi supposer que le fond génétique de l'aubergine E6 a un très fort effet sur la durabilité d'*ERsI*. D'après les premiers résultats de la nouvelle cartographie génétique en cours de réalisation dans l'équipe (thèse de S. Salgon), la résistance d'E6 ne semblerait être conférée que par *ERsI*. Une résistance conférée par un seul facteur de résistance a déjà été mise en évidence chez d'autres plantes. Chez *Brassica oleracea*, le gène de résistance *FocBo1* s'est révélé particulièrement efficace face à *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, agent du jaunissement du chou. Cette résistance reste effective depuis 1927, date de sa première introduction [81, 82]. Chez le blé, le déploiement successif du gène de résistance *Lr34*, [83, 84] puis, plus récemment, de *Lr67* [85], ont permis le contrôle total de la rouille de la feuille du blé (*Puccinia triticina*) en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et en Australie.

Alors que le premier cycle de culture d'aubergine résistante nous a permis de détecter des infections latentes dans les tiges de l'aubergine E6, *R. solanacearum* n'a plus été détectée dans les cycles suivants, que ce soit dans les tiges d'E6, dans la rhizosphère, ou même dans le sol où ont été implantées les aubergines résistantes. L'hypothèse la plus probable face à ce résultat est qu'E6 a fortement diminué la taille de l'inoculum infectieux du sol, diminuant ainsi la probabilité d'apparition de variants virulents capables d'infecter puis de se vasculariser dans E6.

Lorsque les bactéries d'infections latentes isolées de l'aubergine E6 ont été inoculées en conditions contrôlées sur ce même cultivar, jusqu'à 40% de plants d'E6 ont flétri. Ces résultats démontrent que ces souches d'infection latentes possèdent la capacité de faire flétrir E6 mais que cette capacité ne s'exprime pas au champ, contribuant à la résistance globale de l'aubergine E6. Ces résultats confirment le postulat que les expérimentations en conditions contrôlées (en laboratoire) favorisent le développement de l'agent pathogène au détriment de la plante-hôte. Ces bactéries capables de provoquer des infections latentes sur l'aubergine résistante (E6) n'ont pas subi de *trade-off* pour leur agressivité sur l'aubergine sensible (E8), étant même plus agressives sur E8 que des souches isolées d'E8. Nos résultats vont donc à l'encontre des observations de Montarry et coll. [463] sur *Phytophthora infestans*. A l'échelle du champ, les populations de *P. infestans* issues d'un cultivar sensible de pomme de terre (Bintje) sont plus agressives que les souches issues d'un hôte partiellement résistant (Désiré) [125]. [464] ont aussi obtenu ces résultats en étudiant une population européenne de *P. infestans* issue d'un cultivar modérément résistant (Désirée) et d'un cultivar sensible (Bintje). Nous ne pouvons exclure que nos conditions expérimentales en chambre climatique, favorables au développement de *R. solanacearum*, entravent la détection d'un potentiel *trade-off* subi par ces souches en conditions naturelles. Il serait intéressant dans l'avenir de comparer les *fitness* de ces souches d'infections latentes, par des tests de compétition *in vitro* et *in planta* avec des souches isolées d'E8.

Désormais la question des mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance accrue d'E6 au champ se pose. Au vu de la forte chute d'inoculum dans le sol, l'une des hypothèses serait qu'E6 produirait des composés répulsifs ou antimicrobiens au niveau du système racinaire qui auraient la capacité de modifier (réduire) de manière importante la composition de la microflore tellurique. Ces exsudats racinaires jouent un rôle primordial dans la défense des plantes face à *R. solanacearum* [202] et leur implication dans la résistance d'E6 mériterait d'être considéré dans un programme de recherche spécifique.

Afin de renforcer l'hypothèse de l'effet suppressif de l'aubergine E6 sur l'inoculum tellurique de notre champ, nous avons démarré un sixième cycle de culture d'aubergine résistante (E6) et d'aubergine sensible (E8) mi-septembre, en inversant les microparcelles d'aubergine résistante et d'aubergine sensible ; l'aubergine sensible est maintenant implantée sur 3 microparcelles au potentiel infectieux très diminué, tandis que l'aubergine résistante est implantée sur 3 microparcelles fortement infestées. A l'heure actuelle, soit 8 semaines après implantation du cycle 6, une seule plante d'E8 a flétri et s'est révélée colonisée par *R. solanacearum*, tandis qu'aucun plant d'E6 n'a flétri. Cet indexage biologique en plein champ confirme la chute de l'inoculum infectieux dans le sol.

3) L'aubergine sensible E8 a aussi un effet significatif sur la diversité et la structuration génétique de la population parcellaire de *R. solanacearum* phylotype I

Grâce au nouveau schéma MLVA à 8 loci développé au cours de cette thèse, nous avons pu étudier la structuration spatiale et temporelle de la population parcellaire de *R. solanacearum* infectant l'aubergine sensible. Bien que la variété E8 soit connue pour sa grande sensibilité à *R. solanacearum* [219, 385], nos résultats suggèrent que cette variété a quand même un impact sur les populations de *R. solanacearum*. Au fur et à mesure des cycles de culture d'aubergine E8, nous avons observé une chute importante de la diversité génétique des populations bactériennes associée à une augmentation de la fréquence d'apparition de deux haplotypes majoritaires, et une forte augmentation d'incidence de la maladie entre le cycle 1 et le cycle 2. Au vu de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse qu'une adaptation locale des populations pathogènes à l'hôte sensible E8 a eu lieu entre le cycle 1 et le cycle 2. Lorsqu'une population pathogène et une population d'hôte existent dans un même écosystème, ou dans un même agrosystème, ils sont qualifiés de sympatriques [465]. Lorsque la population d'agents pathogènes présente de meilleures performances sur les hôtes sympatriques, elle est considérée comme localement adaptée à cet hôte [466]. Ce processus évolutif implique un important avantage sélectif. Cependant, les analyses en conditions contrôlées ne vont pas dans ce sens et ne semblent pas indiquer de gain en agressivité ou en infectivité des souches issues du cycle 2 par rapport au cycle 1. Cependant l'absence apparente d'adaptation locale est peut-être juste due au crible que nous avons utilisé. Cette adaptation locale est peut-être lisible sur un paramètre de *fitness* que nous n'avons pas mesuré.

4) L'aubergine sensible E8 semble aussi influencer sur la structuration spatiale des populations

D'après nos analyses d'isolement par la distance (IBD), les populations de *R. solanacearum* ne sont pas géographiquement structurées pour le cycle 0 et le cycle 1 (pas d'IBD significatif) tandis que cette structuration spatiale semble s'accroître durant les cycles 2 et 4 (IBD significatif). Ces résultats suggèrent des échanges génétiques fréquents pendant les deux premiers cycles de culture, qui se raréfient ensuite lors des cycles suivants ; cette apparition puis cette disparition de l'isolement par la distance d'IBD pourrait aussi être le signe d'une chute constante de la taille efficace (N_e) des populations au cours des successions culturales. Lorsque l'on s'intéresse à l'IBD à l'échelle des microparcelles, la plupart des populations de *R. solanacearum* ne semblent pas être structurées d'un point de vue géographique à l'intérieur des microparcelles. Ces résultats laissent penser qu'il pourrait y avoir échange de matériel génétique au sein des microparcelles. L'absence d'IBD détectée dans notre étude confirme les résultats obtenus par des études précédentes sur des populations de Côte d'Ivoire [427] et de Trinidad [442] de *R. solanacearum* : la distance géographique n'est pas corrélée à la distance génétique chez cette bactérie. Toutefois, il est à noter que ces deux études ont été réalisées à une échelle différente de la nôtre : à l'échelle régionale pour les populations de Côte d'Ivoire [427]

et à l'échelle insulaire pour les populations de Trinidad [442], alors que notre étude a été effectuée à l'échelle parcellaire. Notre étude n'est pas le seul cas à ne pas avoir détecté d'IBD significatifs. Chez d'autres bactéries phytopathogènes, tel que chez *Xanthomonas citri* pv. *citri* [144] (*Xcc*) ou encore chez *Erwinia amylovora* [190], les auteurs n'ont pas non plus identifié un IBD significatif. En étudiant la structure génétique de populations américaines de *Monilinia vaccinii-corymbosi*, même constat : les auteurs n'ont pas identifié d'IBD significatif [467]. Cependant, pour d'autres agents pathogènes, une forte corrélation entre la distance génétique et la distance géographique a été observée : chez *Phytophthora ramorum* aux Etats-Unis [468] ou encore chez *Helicobacter pylori* au niveau mondial [469].

A l'échelle microparcellaire, les niveaux de déséquilibre de liaison multilocus et entre paires de loci suggèrent que les populations parcellaires seraient essentiellement clonales. Au niveau épidémiologique, la dissémination de la maladie au sein des microparcelles est contrastée en fonction des cycles. Cependant, pour chaque microparcelle d'aubergine sensible, un voire plusieurs clones serait à l'origine de l'apparition de foyer de maladies. Ces clones se dissémineraient ensuite d'une plante malade vers une plante saine avoisinante par contact racinaire. Finalement, les foyers de maladies sembleraient coalescer, détruisant toutes les plantes d'aubergine sensible dans nos microparcelles. Ce résultat renforce le constat fait par de précédentes études aux Etats-Unis [233] et en Nouvelle-Zélande [242] : *R. solanacearum* possède la capacité à se disséminer de « plante à plante » au sein d'un même champ. Cette étude de l'épidémiologie du flétrissement bactérien confirme le caractère épidémique de l'infection de *R. solanacearum* au sein de notre parcelle expérimentale.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer une structure épidémique clonale [131] des populations de *R. solanacearum* au sein du champ. La population « Vallon 2009 » était aussi clonale, mais la population « Vallon 1999 » a été identifiée comme recombinante. La construction des réseaux d'haplotypes par « *minimum spanning tree* » nous a permis d'identifier un unique complexe clonal (CC) qui serait en cours de diversification dans la parcelle. Ce CC est composé d'haplotypes reliés majoritairement entre eux par des SLV (Single Locus Variants), voire des DLV (Double Locus Variants). De plus, un faible nombre de *singletons* est détecté ce qui est typique des situations épidémiques. La mise en œuvre d'une approche de type ABC (Approximate Bayesian Computation) pourrait nous permettre d'inférer les paramètres démographiques les plus probables pour chaque cycle [470, 471]. L'utilisation de l'ABC en génétique des populations connaît actuellement un fort engouement lié au fait qu'il permet notamment d'estimer le scénario évolutif d'une population [470, 471]. Cette approche a été utilisée en phytopathologie sur le chancre asiatique des agrumes où les auteurs ont mis en évidence qu'une première population de *X. citri* pv. *citri* a envahi le Mali puis cette population est devenue la source d'une invasion secondaire au Burkina Faso [447]. Pour la tordeuse orientale du pêcher (*Grapholita molesta*), l'approche ABC a permis d'identifier la Chine comme origine de ce ravageur et de confirmer l'influences des événements climatiques, géologiques et humains sur la structure actuelle de cette population [472].

5) L'effecteur RipAX2 est un facteur majeur d'avirulence sur E6 (AG91-25)

A l'échelle de la plante, les résultats obtenus lors de cette étude par mutagenèse de *ripAX2* démontrent la fonction d'avirulence de *ripAX2* sur E6. Cette fonction d'avirulence a aussi été mise en évidence sur *Solanum torvum* cv. Torubamubiga mais pas sur l'aubergine (Senryo nigou) [375]. Cependant, bien que la tolérance de cette espèce à *R. solanacearum* ait été caractérisée [473-475], aucun facteur de résistance de la plante n'a été cartographié, le génome n'a pas été séquencé et aucun gène de virulence n'a été identifié. Dans ces conditions, il apparaît difficile de proposer un voire des gènes de résistance interagissant avec *ripAX2* ainsi que de potentielles cibles végétales de cet effecteur.

L'avantage de l'aubergine E6 est que le gène majeur de résistance *ERs1* a été identifié et cartographié [426] et sa localisation est en cours de réalisation dans l'équipe (thèse de S. Salgon). Il est ainsi tentant de formuler l'hypothèse que RipAX2 interagit avec ERs1 de la même façon que RipP2 interagit avec RRS1-R [76]. Cette hypothèse est différente de celle précédemment formulée par Pensec et coll. [376], proposant une interaction entre ERs1 et RipP2, identifié comme le meilleur candidat d'avirulence sur E6 [376]. De récents résultats, non publiés à l'heure actuelle, renforcent notre démenti : un BLAST du gène *RRS1-R* ne donne pas de résultat sur le génome de l'aubergine E6 (S. Salgon and C. Sauvage, comm. pers. 2015). L'absence de HR sur feuilles d'E6 infiltrées avec *ripP2* semble aussi aller dans ce sens.

Il est communément admis que la reconnaissance d'un effecteur bactérien par une protéine R végétale déclenche bien souvent une cascade de signalisations conduisant à une HR et caractérisé par un brunissement des zones infestées et par l'effondrement des tissus du mésophylle. La quantification *in planta* de la concentration bactérienne est un autre moyen d'estimer la reconnaissance d'un effecteur. La reconnaissance de RipAX2 par E6 serait organe-spécifique : elle ne se ferait pas dans les tissus foliaires mais plutôt dans les tissus caulinaires, plus particulièrement dans la région hypocotylaire. L'absence de reconnaissance de RipAX2 dans les tissus du mésophylle a aussi été observée sur l'aubergine cv. Senryo nigou [375] : les auteurs n'ont constaté aucune différence significative entre les souches de *R. solanacearum* exprimant ou non *ripAX2* [375]. Notre étude n'est pas la seule à identifier une spécificité d'organe pour le contrôle de *R. solanacearum* et des exemples dans la littérature internationale confirment la pertinence de cette hypothèse : chez *Medicago truncatula*, un établissement de la résistance au niveau de l'hypocotyle a été observé [416, 417]. La résistance du cultivar SEM 05-500256 du colza confine *Verticillium longisporum* à la base de la plante, dans la partie hypocotylaire de la tige [476]. Face à *Plasmodiophora brassicae*, les variétés résistantes de *Brassica rapa* expriment spécifiquement le gène *Crr1a* dans l'hypocotyle, circonscrivant le pathogène à la base de la tige [477].

PERSPECTIVES

Vers la caractérisation fonctionnelle de ripAX2 ?

L'effecteur ripAX2 est très clairement associé à une fonction d'avirulence sur l'aubergine résistante E6. Les résultats que nous avons obtenus avec cet effecteur pendant cette thèse sont très encourageants et prometteurs quant à l'interaction avec l'aubergine E6. L'hypothèse d'une spécificité d'organe mériterait d'être approfondie. Afin d'obtenir des résultats plus robustes, il serait nécessaire de répéter les tests de charge bactérienne avec GMI1000 et ses souches dérivatives (mutant dans l'effecteur *ripAX2* et la souche complémentée) et ce, à l'intérieur de différents organes végétaux (e.g., le système racinaire, l'hypocotyle et la tige). Une quantification plus précise de la concentration bactérienne dans la plante pourrait aussi être réalisée par PCR quantitative.

Notre étude soulève de nombreuses questions, d'un point de vue fonctionnel mais aussi d'un point de vue évolutif. Décrypter les fonctions moléculaires de cet effecteur apparaît pertinent pour comprendre les mécanismes et les processus évolutifs conduisant à la résistance d'E6. Bien que ripAX2 soit un candidat prioritaire pour une interaction avec ERs1, ceci n'est qu'une spéculation et des expérimentations supplémentaires sont nécessaires. Nous pouvons par exemple envisager la génération de NILs (Nearly Inbred Lines) possédant ou non le gène de résistance *ERs1* puis les inoculer avec des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ou *Pseudomonas syringae* contenant *ripAX2*. Cependant au vu de résultats d'infiltration sur feuille, il faudra avant cela optimiser et établir un protocole clair afin d'éviter tout biais lié à la spécificité d'organe de l'interaction potentielle entre *ripAX2* et *ERs1*. Une autre solution serait de cloner le gène de résistance *ERs1* mais cette approche se heurte à un problème majeur : bien qu'*ERs1* soit cartographié, sa position physique dans le génome de l'aubergine E6 n'est pas connue avec précision. Seule sa position génétique est connue [426] et *ERs1* se situe dans une zone de 3 cM (correspondant environ à 3 Mpb). Une fois ce gène de résistance cloné, il sera envisageable d'adopter une approche de type « double-hybride » afin de valider l'interaction protéine-protéine entre l'effecteur RipAX2 et la protéine de résistance [478]. Cette démarche pourrait être couplée à une expérimentation de « Bimolecular Fluorescence Complementation » (BiFC ; [479], une approche similaire à l'approche « double-hybride » utilisée pour caractériser RE-bw [433].

La question du potentiel évolutif de *ripAX2* est aussi importante : un effecteur sous forte pression de sélection diversifiante mutera plus probablement et donc potentiellement capable de contourner la résistance d'E6. De plus amples analyses, comme le calcul du nombre de mutations non-synonymes par rapport au nombre de mutations synonymes, permettront d'identifier si cet effecteur est sous pression sélection diversifiante ou purificatrice, et quels sont les nucléotides critiques pour la reconnaissance par la plante. Le motif de fixation du Zinc HExxH a été identifié comme un résidu critique pour l'interaction entre RipAX2 et *S. torvum* [375] ; plus précisément, l'acide glutamique en

position 149 est critique pour la reconnaissance de RipAX2 par le système immunitaire de la plante. Il apparaît nécessaire de savoir si ce résidu est critique pour la reconnaissance de RipAX2 par ERs1.

Une approche d'évolution expérimentale par passage en série sur E6 pourrait aussi être envisagée [480]. Cette stratégie nous permettra d'avoir accès à l'évolution *in vivo* de *ripAX2* dans des populations de *R. solanacearum* soumises aux pressions de sélection exercées par les gènes de résistance de l'aubergine E6. A partir d'un voire de plusieurs allèles de *ripAX2* avirulents, il serait possible d'identifier les mécanismes de mutations conduisant au passage à l'état virulent de *ripAX2*.

Vers une gestion durable de la résistance à R. solanacearum?

Les meilleurs moyens de lutte sont les luttes prophylactiques et réglementaires, regroupant l'ensemble des mesures préventives pour éviter l'introduction de la bactérie dans une zone d'où elle est encore absente. Cependant, au vu de l'importance des échanges de matériel végétal entre les différentes zones agronomiques existantes, ces luttes n'apparaissent pas suffisantes. Le cas de la contamination des eaux de la Tamise détectée par Parkinson et coll. [188] illustre très bien cette limite malgré le fait que *R. solanacearum* soit classée comme un pathogène de quarantaine au Royaume-Uni (<https://secure.fera.defra.gov.uk/phiw/riskRegister/index.cfm>), *R. solanacearum* a été détecté dans plusieurs champs en aval de la Tamise. D'un point de vue global, avant l'implantation de culture d'aubergine dans une nouvelle zone géographique, il apparaît nécessaire de rechercher la présence de *R. solanacearum*, sur les hôtes principaux comme sur les hôtes alternatifs (morelle noire par exemple). Une stratégie raisonnée de déploiement des cultivars résistants d'aubergine pourrait alors être réalisée en se basant sur les profils de virulence de ces souches sur la *core*-TEP (et plus particulièrement sur E6) ainsi que sur leur composition en effecteurs.

À l'échelle du champ, il a été démontré qu'E6 est extrêmement résistante à nos populations parcellaires de *R. solanacearum*. Dans le but d'une éradication « naturelle », l'une des solutions pour un champ infesté serait l'utilisation de cette variété afin de réduire drastiquement la pression d'inoculum dans le sol. Il serait aussi intéressant d'étudier l'effet d'autres variétés résistantes d'aubergine sur les populations telluriques de *R. solanacearum*. Associée à des cultures suppressives tels que *Crotalaria spectabilis*, *Raphanus sativus* et *Allium fistulosum* [391, 448] dans un système de rotation de culture, il est probable que l'on réussisse à éliminer *R. solanacearum* d'un champ contaminé. La culture de cultivars en mélange apparaît aussi comme un moyen de contrôler la dissémination du flétrissement bactérien. Mélanger différents hôtes présentant types de résistance (quantitative et qualitative) réduirait l'occurrence de la maladie ainsi que la capacité d'évolution de la population pathogène [481, 482]. Cette stratégie a déjà été employée avec succès contre des champignons phytopathogènes [90-92].

CHAPITRE 5 :
RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. McDonald BA, Linde C: **Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance.** *Annual Review of Phytopathology* 2002, **40**(1):349-379.
2. Van Den Bosch F, Gilligan CA: **Mesures of durability of resistance.** *Phytopathology* 2003, **93**(5):616-625.
3. Jones JD, Dangl JL: **The plant immune system.** *Nature* 2006, **444**(7117):323-329.
4. Pritchard L, Birch PR: **The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on?** *Molecular plant pathology* 2014, **15**(9):865-870.
5. Cook DE, Mesarich CH, Thomma BP: **Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion.** *Phytopathology* 2015, **53**(1):541.
6. Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G: **The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception.** *The Plant Cell* 2006, **18**(2):465-476.
7. Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J: **Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**(44):15811-15816.
8. Fernandez RF, Kunz DA: **Bacterial cyanide oxygenase is a suite of enzymes catalyzing the scavenging and adventitious utilization of cyanide as a nitrogenous growth substrate.** *Journal of bacteriology* 2005, **187**(18):6396-6402.
9. Gómez-Gómez L, Felix G, Boller T: **A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana.** *The Plant Journal* 1999, **18**(3):277-284.
10. Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T: **Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin.** *The Plant Journal* 1999, **18**(3):265-276.
11. Shiu S-H, Bleecker AB: **Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling.** *Science Signaling* 2001, **2001**(113):re22.
12. Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JD, Felix G, Boller T: **A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence.** *Nature* 2007, **448**(7152):497-500.
13. Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP: **The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007, **104**(29):12217-12222.
14. Roux M, Zipfel C: **Receptor Kinase Interactions: Complexity of Signalling.** In: *Receptor-like Kinases in Plants*. Springer; 2012: 145-172.
15. Nicaise V, Roux M, Zipfel C: **Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm.** *many ref* 2009, **150**(4):1638-1647.
16. Monaghan J, Zipfel C: **Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane.** *Current opinion in plant biology* 2012, **15**(4):349-357.
17. Tena G, Boudsocq M, Sheen J: **Protein kinase signaling networks in plant innate immunity.** *Current opinion in plant biology* 2011, **14**(5):519-529.
18. Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu S-H, Boller T: **Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities.** *Plant molecular biology* 2007, **64**(5):539-547.
19. Clarke CR, Hayes BW, Runde BJ, Wicker E, Vinatzer BA: **Eggplant and related species are promising genetic resources to dissect the plant immune response to Pseudomonas syringae and Xanthomonas euvesicatoria and to identify new resistance determinants.** *Mol Plant Pathol* 2014, **15**(8):814-822.

20. Vinatzer BA, Monteil CL, Clarke CR: **Harnessing Population Genomics to Understand How Bacterial Pathogens Emerge, Adapt to Crop Hosts, and Disseminate.** *Phytopathology* 2014, **52**(1):19.
21. Cai R, Lewis J, Yan S, Liu H, Clarke CR, Campanile F, Almeida NF, Studholme DJ, Lindeberg M, Schneider D: **The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity.** *PLoS Pathog* 2011, **7**(8):e1002130.
22. Hauck P, Thilmony R, He SY: **A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(14):8577-8582.
23. Kim H-S, Desveaux D, Singer AU, Patel P, Sondek J, Dangl JL: **The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(18):6496-6501.
24. Hogenhout SA, Van der Hoorn RA, Terauchi R, Kamoun S: **Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms.** *Molecular plant-microbe interactions* 2009, **22**(2):115-122.
25. Kamoun S: **Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed.** *Current opinion in plant biology* 2007, **10**(4):358-365.
26. Kamoun S: **A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes.** *Annu Rev Phytopathol* 2006, **44**:41-60.
27. Boch J, Bonas U: **Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function.** *Annual review of phytopathology* 2010, **48**:419-436.
28. van der Hoorn RA, Kamoun S: **From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors.** *The Plant Cell* 2008, **20**(8):2009-2017.
29. Dangl JL, Jones JD: **Plant pathogens and integrated defence responses to infection.** *nature* 2001, **411**(6839):826-833.
30. McDowell JM, Woffenden BJ: **Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications.** *TRENDS in Biotechnology* 2003, **21**(4):178-183.
31. Greenberg JT, Yao N: **The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions.** *Cellular microbiology* 2004, **6**(3):201-211.
32. Keen N: **Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions.** *Annual review of genetics* 1990, **24**(1):447-463.
33. Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B: **Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance.** *The EMBO journal* 2000, **19**(15):4004-4014.
34. Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng Dong X, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y: **Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(13):8024-8029.
35. Dodds PN, Lawrence GJ, Catanzariti A-M, Teh T, Wang C-I, Ayliffe MA, Kobe B, Ellis JG: **Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**(23):8888-8893.
36. Ueda H, Yamaguchi Y, Sano H: **Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants.** *Plant molecular biology* 2006, **61**(1):31-45.
37. Luderer R, Rivas S, Nürnberger T, Mattei B, Van den Hooven HW, Van der Hoorn RA, Romeis T, Wehrfritz J-M, Blume B, Nennstiel D: **No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*.** *Molecular plant-microbe interactions* 2001, **14**(7):867-876.

38. van der Biezen EA, Jones JD: **The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals.** *Current Biology* 1998, **8**(7):R226-R228.
39. Anderson JP, Gleason CA, Foley RC, Thrall PH, Burdon JB, Singh KB: **Plants versus pathogens: an evolutionary arms race.** *Functional Plant Biology* 2010, **37**(6):499-512.
40. Rouxel T, Balesdent MH: **Avirulence genes.** *eLS* 2010.
41. Janeway CA, Yagi J, Conrad PJ, Katz ME, Jones B, Vroegop S, Buxser S: **T-Cell Responses to MIs and to Bacterial Proteins that Mimic its Behavior#.** *Immunological reviews* 1989, **107**(1):61-88.
42. Medzhitov R, Janeway CA: **Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition.** *Cell* 1997, **91**(3):295-298.
43. Palloix A, Aymé V, Moury B: **Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies.** *New Phytologist* 2009, **183**:190-199.
44. Flor HH: **Current status of the gene-for-gene concept.** *Annual review of phytopathology* 1971, **9**(1):275-296.
45. Plank Jvd: **Plant diseases: epidemics and control.** *Plant diseases: epidemics and control* 1963.
46. Lipka U, Fuchs R, Lipka V: **Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews.** *Current opinion in plant biology* 2008, **11**(4):404-411.
47. Senthil-Kumar M, Mysore KS: **Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects.** *Annual review of phytopathology* 2013, **51**:407-427.
48. Michelmore RW, Christopoulou M, Caldwell KS: **Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future.** *Annual review of phytopathology* 2013, **51**:291-319.
49. Mysore KS, Ryu C-M: **Nonhost resistance: how much do we know?** *Trends in plant science* 2004, **9**(2):97-104.
50. Kumar RMN, Prasad KS, Chandan S, Prasad N: **Synthesis and characterization of thiazole containing Schiff base: antimicrobial activity.** *Der Pharmacia Lettre* 2014, **6**(3):281-285.
51. Heath MC: **Hypersensitive response-related death.** In: *Programmed Cell Death in Higher Plants*. Springer; 2000: 77-90.
52. Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA: **The COOH terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F-and G-actin binding domains with bundling activity.** *The Journal of cell biology* 1994, **124**(3):325-340.
53. Alfano JR, Collmer A: **The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death.** *Journal of bacteriology* 1997, **179**(18):5655.
54. Kwon C, Bednarek P, Schulze-Lefert P: **Secretory pathways in plant immune responses.** *many ref* 2008, **147**(4):1575-1583.
55. Dixon RA, Ferreira D: **Genistein.** *Phytochemistry* 2002, **60**(3):205-211.
56. Hükelhoven R: **Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility.** *Annu Rev Phytopathol* 2007, **45**:101-127.
57. Ausubel FM: **Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?** *Nature immunology* 2005, **6**(10):973-979.
58. Lindeberg M, Cunnac S, Collmer A: **Pseudomonas syringae type III effector repertoires: last words in endless arguments.** *Trends in microbiology* 2012, **20**(4):199-208.
59. Robinson R: **Disease resistance terminology.** *Review of applied Mycology* 1969, **48**(11-12).
60. Wilson IW, Schiff CL, Hughes DE, Somerville SC: **Quantitative trait loci analysis of powdery mildew disease resistance in the Arabidopsis thaliana accession Kashmir-1.** *Genetics* 2001, **158**(3):1301-1309.
61. VALE FXR, Parlevliet J, ZAMBOLIM L: **Concepts in plant disease resistance.** *Fitopatologia Brasileira* 2001, **26**(3):577-589.

62. Quenouille J, Montarry J, Palloix A, Moury B: **Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown.** *Molecular plant pathology* 2013, **14**(2):109-118.
63. Parlevliet J, Leijn M, Van Ommeren A: **Accumulating polygenes for partial resistance in barley to barley leaf rust, Puccinia hordei. II. Field evaluation.** *Euphytica* 1985, **34**(1):15-20.
64. Nelson R: **Genetics of horizontal resistance to plant diseases.** *Annual Review of Phytopathology* 1978, **16**(1):359-378.
65. Van der Plank J: **Pathogenic races, host resistance, and an analysis of pathogenicity.** *Netherlands journal of plant pathology* 1969, **75**(1-2):45-52.
66. Parlevliet J, Zadoks J: **The integrated concept of disease resistance: a new view including horizontal and vertical resistance in plants.** *Euphytica* 1977, **26**(1):5-21.
67. Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW: **Plant disease resistance genes: current status and future directions.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2012, **78**:51-65.
68. Boyes DC, Nam J, Dangl JL: **The Arabidopsis thaliana RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, **95**(26):15849-15854.
69. Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG: **The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N.** *The Plant Cell* 1995, **7**(8):1195-1206.
70. Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL: **Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit.** *Neuron* 1996, **16**(6):1179-1188.
71. Jones JD: **Putting knowledge of plant disease resistance genes to work.** *Current Opinion in Plant Biology* 2001, **4**(4):281-287.
72. Song W-Y, Wang G-L, Chen L-L, Kim H-S, Pi L-Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W-X, Zhu L-H: **A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.** *Science* 1995, **270**(5243):1804-1806.
73. Wang W, Wen Y, Berkey R, Xiao S: **Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8. 2 to the interfacial membrane encasing the fungal haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew.** *The Plant Cell* 2009, **21**(9):2898-2913.
74. Veronese P, Ruiz MT, Coca MA, Hernandez-Lopez A, Lee H, Ibeas JI, Damsz B, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA: **In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy.** *many ref* 2003, **131**(4):1580-1590.
75. Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH: **Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy.** *The plant cell* 2011, **23**(1):4-15.
76. Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng D, Bittner E, P, Beynon J, Marco Y, Feng D: **Resistance to Ralstonia solanacearum in Arabidopsis thaliana is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, **99**(4):2404-2409.
77. Johal GS, Briggs SP: **Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize.** *Science* 1992, **258**(5084):985-987.
78. Johnson R: **Durability of disease resistance in crops: some closing remarks about the topic and the symposium.** In: *Durability of Disease Resistance*. Springer; 1993: 283-300.
79. Mundt CC: **Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests.** *Infection, Genetics and Evolution* 2014, **27**:446-455.
80. Rousselle-Bourgeois F, Rousselle P: **Amélioration génétique.** *La pomme de terre, Rousselle, P, Robert, Y, and Crosnier, JC (eds)* 1996.
81. Walker J: **Inheritance of Fusarium resistance in cabbage.** *J Agric Res* 1930, **40**:721-745.
82. Pu Z-j, Shimizu M, Zhang Y-j, Nagaoka T, Hayashi T, Hori H, Matsumoto S, Fujimoto R, Okazaki K: **Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene in Brassica oleracea.** *Mol Breeding* 2012, **30**(2):809-818.

83. McIntosh R, Brown G: **Anticipatory breeding for resistance to rust diseases in wheat.** *Annual review of phytopathology* 1997, **35**(1):311-326.
84. Kolmer J, Leonard K: **Genetic selection and adaptation of Cochliobolus heterostrophus to corn hosts with partial resistance.** *Phytopathology (USA)* 1986.
85. Hiebert CW, Thomas JB, McCallum BD, Humphreys DG, DePauw RM, Hayden MJ, Mago R, Schnippenkoetter W, Spielmeier W: **An introgression on wheat chromosome 4DL in RL6077 (Thatcher* 6/PI 250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (Lr67).** *Theoretical and applied genetics* 2010, **121**(6):1083-1091.
86. Crill P: **An assessment of stabilizing selection in crop variety development.** *Evolution of The Gene Rotation Concept for Rice Blast Control* 1982:67.
87. Manwan I, Sama S, Rizvi S: **Use of varietal rotation in the management of tungro disease in Indonesia.** *Indonesian Agricultural Research & Development Journal* 1985, **7**(3-4):43-48.
88. Mundt C: **Techniques to manage pathogen co-evolution with host plants to prolong resistance.** *Rice Pest Science and Management PS Teng, KL Heong, and K Moody, eds Int Rice Res Inst, Los Banos, Philippines* 1994:193-205.
89. Browning JA, Frey KJ: **Multiline cultivars as a means of disease control.** *Annual review of phytopathology* 1969, **7**(1):355-382.
90. Garrett K, Mundt C: **Epidemiology in mixed host populations.** *Phytopathology* 1999, **89**(11):984-990.
91. Finckh M, Gacek E, Goyeau H, Lannou C, Merz U, Mundt C, Munk L, Nadziak J, Newton A, de Vallavieille-Pope C: **Cereal variety and species mixtures in practice, with emphasis on disease resistance.** *Agronomie* 2000, **20**(7):813-837.
92. Mundt C: **Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management.** *Annual review of phytopathology* 2002, **40**(1):381-410.
93. Wolfe M: **The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance.** *Annual review of phytopathology* 1985, **23**(1):251-273.
94. Schafer J, Roelfs A: **Estimated relation between numbers of urediniospores of Puccinia graminis f. sp. tritici and rates of occurrence of virulence.** *Phytopathology (USA)* 1985.
95. Wheeler H: **Plant pathogenesis:** Springer-Verlag.; 1975.
96. Singh RP, Hodson DP, Huerta-Espino J, Jin Y, Bhavani S, Njau P, Herrera-Foessel S, Singh PK, Singh S, Govindan V: **The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production.** *Annual review of phytopathology* 2011, **49**:465-481.
97. Fukuoka S, Saka N, Mizukami Y, Koga H, Yamanouchi U, Yoshioka Y, Hayashi N, Ebana K, Mizobuchi R, Yano M: **Gene pyramiding enhances durable blast disease resistance in rice.** *Scientific reports* 2015, **5**.
98. Kiyosawa S: **Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance.** *Annual review of phytopathology* 1982, **20**(1):93-117.
99. Burel F, Baudry J, Butet A, Clergeau P, Delettre Y, Le Coeur D, Dubs F, Morvan N, Paillat G, Petit S: **Comparative biodiversity along a gradient of agricultural landscapes.** *Acta oecologica* 1998, **19**(1):47-60.
100. Galuzo I: **Landscape epidemiology (epizootiology).** *Advances in veterinary science and comparative medicine* 1975, **19**:73.
101. Plantegenest M, Le May C, Fabre F: **Landscape epidemiology of plant diseases.** *Journal of the Royal Society Interface* 2007, **4**(16):963-972.
102. Knott D: **Using race-specific resistance to manage the evolution of plant pathogens.** *Journal of Environmental quality* 1972, **1**(3):227-231.
103. Reddy M, Rao M: **Resistance Genes and Their Deployment for Control of Leaf Rust of Wheat*.** *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)* 1979, **39**(2):359-365.
104. Fabre F, Rousseau E, Mailleret L, Moury B: **Durable strategies to deploy plant resistance in agricultural landscapes.** *New Phytologist* 2012, **193**(4):1064-1075.

105. Meentemeyer RK, Cunniffe NJ, Cook AR, Filipe JA, Hunter RD, Rizzo DM, Gilligan CA: **Epidemiological modeling of invasion in heterogeneous landscapes: spread of sudden oak death in California (1990-2030)**. *Ecosphere* 2011, **2**(2):art17.
106. Papaix J, Goyeau H, Du Cheyron P, Monod H, Lannou C: **Influence of cultivated landscape composition on variety resistance: an assessment based on wheat leaf rust epidemics**. *New Phytologist* 2011, **191**(4):1095-1107.
107. Lannou C: **Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens**. *Annual Review of Phytopathology* 2012, **50**:319-338.
108. Johnson R: **A critical analysis of durable resistance**. *Annual review of phytopathology* 1984, **22**(1):309-330.
109. Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H: **Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes**. *Annual review of phytopathology* 2001, **39**(1):187-224.
110. Janzac B, Fabre F, Palloix A, Moury B: **Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances**. *Molecular plant pathology* 2009, **10**(5):599-610.
111. Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M: **Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus***. *New Phytologist* 2010, **185**(1):285-299.
112. Fournet S, Kerlan M, Renault L, Dantec J, Rouaux C, Montarry J: **Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence**. *Plant pathology* 2013, **62**(1):184-193.
113. Flor H: **Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications**. *Phytopathology* 1955, **45**(12):680-685.
114. Statler G: **Mutations affecting virulence in *Puccinia recondita***. *Phytopathology* 1985, **75**(5):565-567.
115. Estoup A, Angers B: **Theoretical and empirical considerations**. *Adv Mol Ecol* 1998, **306**:55.
116. Priestley R: **Detection of increased virulence in populations of wheat yellow rust**. *Plant disease epidemiology* 1978:63-70.
117. Thomas CM, Nielsen KM: **Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria**. *Nature reviews microbiology* 2005, **3**(9):711-721.
118. Harrison BD: **Virus variation in relation to resistance-breaking in plants**. *Euphytica* 2002, **124**(2):181-192.
119. Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M: **Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge**. *Virus research* 2004, **100**(1):31-39.
120. Moury B, Fereres A, García-Arenal F, Lecoq H: **Sustainable management of plant resistance to viruses**. *Recent Advances in Plant Virology* 2011:219-336.
121. Daverdin G: **Evolution moléculaire sous pression de sélection et implication dans la reconnaissance avr_{lm3}/rlm₃ du gène d'avirulence avr_{lm4-7} chez *Leptosphaeria maculans***. Université Paris Sud-Paris XI; 2011.
122. Daverdin G, Rouxel T, Gout L, Aubertot J-N, Fudal I, Meyer M, Parlange F, Carpezat J, Balesdent M-H: **Genome structure and reproductive behaviour influence the evolutionary potential of a fungal phytopathogen**. 2012.
123. Cruz CMV, Bai J, Oña I, Leung H, Nelson RJ, Mew T-W, Leach JE: **Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**(25):13500-13505.
124. Zeigler RS, Nelson J, Levy R: **Lineage exclusion: a proposal for linking blast population analysis for resistance breeding**. In: *Rice Blast Disease,, Los Banos, Laguna (Philippines), 1994: 1994*. CAB International/International Rice Research Institute.
125. Montarry J, Corbiere R, Lesueur S, Glais I, Andrivon D: **Does selection by resistant hosts trigger local adaptation in plant-pathogen systems?** *Journal of Evolutionary Biology* 2006, **19**(2):522-531.

126. Guérin F, Le Cam B: **Breakdown of the scab resistance gene Vf in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis***. *Phytopathology* 2004, **94**(4):364-369.
127. Crow JF: **Basic concepts in population, quantitative, and evolutionary genetics**: WH Freeman and Company; 1986.
128. Burdon J: **The structure of pathogen populations in natural plant communities**. *Annual review of phytopathology* 1993, **31**(1):305-323.
129. Smith JM, Feil EJ, Smith NH: **Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria**. *Bioessays* 2000, **22**(12):1115-1122.
130. Ørskov I, Ørskov F: **Serology of *Escherichia coli* fimbriae**. 1983.
131. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG: **How clonal are bacteria?** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1993, **90**(10):4384-4388.
132. Guttman DS, Stavrinos J: **Population genomics of bacteria**. *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease* 2010:121-151.
133. Bandelt H-J, Dress AW: **A canonical decomposition theory for metrics on a finite set**. *Advances in mathematics* 1992, **92**(1):47-105.
134. Feil EJ: **Small change: keeping pace with microevolution**. *Nature Reviews Microbiology* 2004, **2**(6):483-495.
135. Roumagnac P, Gagnevin L, Pruvost O, Achtman M: **Insights into structure and evolution of bacterial species that are revealed by molecular methods**. *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies* 2007:475-494.
136. Milgroom MG, Peever TL: **Population biology of plant pathogens**. *Plant Disease* 2003, **87**(6):608-617.
137. Kahlisch L, Henne K, Draheim J, Brettar I, Höfle MG: **High-resolution in situ genotyping of *Legionella pneumophila* populations in drinking water by multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis using environmental DNA**. *Applied and environmental microbiology* 2010, **76**(18):6186-6195.
138. Laroucau K, Thierry S, Vorimore F, Blanco K, Kaleta E, Hoop R, Magnino S, Vanrompay D, Sachse K, Myers GS: **High resolution typing of *Chlamydomphila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA)**. *Infection, Genetics and Evolution* 2008, **8**(2):171-181.
139. Pourcel C, Hormigos K, Onteniente L, Sakwinska O, Deurenberg RH, Vergnaud G: **Improved MLVA assay for *Staphylococcus aureus* providing a highly informative genotyping technique together with strong phylogenetic value**. *J Clin Microbiol* 2009: epub ahead of print.
140. Archie EA, Luikart G, Ezenwa VO: **Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology**. *Trends in Ecology & Evolution* 2009, **24**(1):21-30.
141. Brown J: **The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens**. *New Phytologist* 1996, **133**(1):183-195.
142. Ngoc L, Verniere C, Vital K, Guerin F, Gagnevin L, Brisse S, AH-YOU N, Pruvost O: **Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri***. *Mol Ecol Resour* 2009, **9**(1):125-127.
143. Pruvost O, Magne M, Boyer K, Leduc A, Tourterel C, Drevet C, Ravigné V, Gagnevin L, Guérin F, Chiroleu F: **A MLVA genotyping scheme for global surveillance of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* suggests a worldwide geographical expansion of a single genetic lineage**. *PloS one* 2014, **9**(6):e98129.
144. Vernière C, Bui Thi Ngoc L, Jarne P, Ravigné V, Guérin F, Gagnevin L, Le Mai N, Chau NM, Pruvost O: **Highly polymorphic markers reveal the establishment of an invasive lineage of the citrus bacterial pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* in its area of origin**. *Environmental microbiology* 2014, **16**(7):2226-2237.
145. Della Coletta-Filho H, Takita MA, de Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA: **Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis**. *Applied and environmental microbiology* 2001, **67**(9):4091-4095.

146. Gironde S, Manceau C: **Housekeeping gene sequencing and multilocus variable-number tandem-repeat analysis to identify subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* that correlate with host specificity.** *Applied and environmental microbiology* 2012, **78**(9):3266-3279.
147. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Biotechnology Series* 1992:17-17.
148. Van Belkum A: **Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA).** *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007, **49**(1):22-27.
149. Maiden MC: **Multilocus sequence typing of bacteria.** *Annu Rev Microbiol* 2006, **60**:561-588.
150. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA: **Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1998, **95**(6):3140-3145.
151. Urwin R, Maiden MC: **Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology.** *Trends in microbiology* 2003, **11**(10):479-487.
152. Almeida NF, Yan SC, Cai RM, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW, Schuenzel EL, Lacy GH, Sun XA, Jones JB *et al*: **PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes.** *Phytopathology* 2010, **100**(3):208-215.
153. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL: **Re-evaluating prokaryotic species.** *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**(9):733-739.
154. Hanage WP, Fraser C, Spratt BG: **Sequences, sequence clusters and bacterial species.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2006, **361**(1475):1917-1927.
155. Sarkar SF, Guttman DS: **Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen.** *Applied and Environmental Microbiology* 2004, **70**(4):1999-2012.
156. Goss EM, Kreitman M, Bergelson J: **Genetic diversity, recombination and cryptic clades in *Pseudomonas viridiflava* infecting natural populations of *Arabidopsis thaliana*.** *Genetics* 2005, **169**(1):21-35.
157. Yan S, Liu H, Mohr TJ, Jenrette J, Chiodini R, Zaccardelli M, Setubal JC, Vinatzer BA: **Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain.** *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**(10):3171-3181.
158. Bartoli C, Berge O, Monteil CL, Guilbaud C, Balestra GM, Varvaro L, Jones C, Dangl JL, Baltrus DA, Sands DC: **The *Pseudomonas viridiflava* phylogroups in the *P. syringae* species complex are characterized by genetic variability and phenotypic plasticity of pathogenicity-related traits.** *Environmental microbiology* 2014, **16**(7):2301-2315.
159. Scally M, Schuenzel EL, Stouthamer R, Nunney L: **Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity.** *Applied and environmental microbiology* 2005, **71**(12):8491-8499.
160. Feng J, Schuenzel EL, Li J, Schaad NW: **Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*.** *Phytopathology* 2009, **99**(8):913-920.
161. Young J, Park D-C, Shearman H, Fargier E: **A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*.** *Systematic and Applied Microbiology* 2008, **31**(5):366-377.
162. Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Essakhi S, Manceau C, Jacques M-A: **Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing.** *Applied and environmental microbiology* 2015:AEM. 00050-00015.

163. Milijašević-Marčić S, Gartemann K-H, Frohwitter J, Eichenlaub R, Todorović B, Rekanović E, Potočnik I: **Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia.** *European journal of plant pathology* 2012, **134**(4):697-711.
164. Jacques M-A, Durand K, Orgeur G, Balidas S, Fricot C, Bonneau S, Quillévéré A, Audusseau C, Olivier V, Grimault V: **Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.** *Applied and environmental microbiology* 2012, **78**(23):8388-8402.
165. Castillo JA, Greenberg JT: **Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*.** *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**(4):1225-1238.
166. Wicker E, Lefeuvre P, Cambiaire Jc, Lemaire C, Poussier S, Prior P: **Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA.** *ISME Journal* 2012, **6**(5):961-974.
167. Hamza AA, Robene-Soustrade I, Jouen E, Lefeuvre P, Chiroleu F, Fisher-Le Saux M, Gagnevin L, Pruvost O: **MultiLocus Sequence Analysis- and Amplified Fragment Length Polymorphism-based characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species.** *Systematic and Applied Microbiology* 2012, **35**(3):183-190.
168. Miesfeld R, Krystal M, Amheim N: **A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human δ and β globin genes.** *Nucleic acids research* 1981, **9**(22):5931-5948.
169. Spritz RA, Jagadeeswaran P, Choudary PV, Biro PA, Elder JT, Manley J, Gefter M, Forget B, Weissman S: **Base substitution in an intervening sequence of a beta+thalassemic human globin gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1981, **78**(4):2455-2459.
170. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: **Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA.** *Nature* 1985, **314**(6006):67-73.
171. Ellegren H: **Microsatellites: simple sequences with complex evolution.** *Nature reviews genetics* 2004, **5**(6):435-445.
172. Vergnaud G, Denoeud F: **Minisatellites: mutability and genome architecture.** *Genome Research* 2000, **10**(7):899-907.
173. Weber JL, Wong C: **Mutation of human short tandem repeats.** *Hum Mol Genet* 1993, **2**(8):1123-1128.
174. Levinson G, Gutman GA: **Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution.** *Molecular biology and evolution* 1987, **4**(3):203-221.
175. Kimura M, Crow JF: **The number of alleles that can be maintained in a finite population.** *Genetics* 1964, **49**(4):725.
176. Kimura M, Ohta T: **Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1978, **75**(6):2868-2872.
177. Crow JF, Kimura M: **An introduction to population genetics theory.** *An introduction to population genetics theory* 1970.
178. Slatkin M: **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies.** *Genetics* 1995, **139**(1):457-462.
179. Cornuet J-M, Piry S, Luikart G, Estoup A, Solignac M: **New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals.** *Genetics* 1999, **153**(4):1989-2000.
180. Schlötterer C: **Evolutionary dynamics of microsatellite DNA.** *Chromosoma* 2000, **109**(6):365-371.
181. Estoup A, Tailliez C, Cornuet J-M, Solignac M: **Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae).** *Molecular Biology and Evolution* 1995, **12**(6):1074-1084.

182. Estoup A, Jarne P, Cornuet JM: **Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis.** *Molecular ecology* 2002, **11**(9):1591-1604.
183. Zhao S, Poulin L, Rodriguez-R LM, Serna NF, Liu S-Y, Wonni I, Szurek B, Verdier V, Leach JE, He Y-Q: **Development of a variable number of tandem repeats typing scheme for the bacterial rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*.** *Phytopathology* 2012, **102**(10):948-956.
184. Poulin L, Grygiel P, Magne M, Gagnevin L, Rodriguez-R L, Serna NF, Zhao S, El Rafii M, Dao S, Tekete C: **New multilocus variable-number tandem-repeat analysis tool for surveillance and local epidemiology of bacterial leaf blight and bacterial leaf streak of rice caused by *Xanthomonas oryzae*.** *Applied and environmental microbiology* 2015, **81**(2):688-698.
185. Buddenhagen I, Kelman A: **Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*.** *Annual Review of Phytopathology* 1964, **2**:203-230.
186. Kelman A: **The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium.** *Phytopathology* 1954, **44**:693-695.
187. N'Guessan CA, Brisse S, Le Roux-Nio A-C, Poussier S, Koné D, Wicker E: **Development of variable number of tandem repeats typing schemes for *Ralstonia solanacearum*, the agent of bacterial wilt, banana Moko disease and potato brown rot.** *Journal of Microbiological Methods* 2013, **92**(1):366-374.
188. Parkinson N, Bryant R, Bew J, Conyers C, Stones R, Alcock M, Elphinstone J: **Application of Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Typing to Discriminate *Ralstonia solanacearum* Strains Associated with English Watercourses and Disease Outbreaks.** *Applied and Environmental Microbiology* 2013, **79**(19):6016-6022.
189. Arrieta-Ortiz ML, Rodríguez-R LM, Pérez-Quintero ÁL, Poulin L, Díaz AC, Rojas NA, Trujillo C, Benavides MR, Bart R, Boch J: **Genomic survey of pathogenicity determinants and VNTR markers in the cassava bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* strain CIO151.** 2013.
190. Bühlmann A, Dreo T, Rezzonico F, Pothier JF, Smits TH, Ravnikaar M, Frey JE, Duffy B: **Phylogeography and population structure of the biologically invasive phytopathogen *Erwinia amylovora* inferred using minisatellites.** *Environmental microbiology* 2014, **16**(7):2112-2125.
191. Cesbron S, Pothier J, Gironde S, Jacques M-A, Manceau C: **Development of multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) for *Xanthomonas arboricola* pathovars.** *Journal of microbiological methods* 2014, **100**:84-90.
192. Zaluga J, Stragier P, Van Vaerenbergh J, Maes M, De Vos P: **Multilocus Variable-Number-Tandem-Repeats Analysis (MLVA) distinguishes a clonal complex of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains isolated from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Belgium.** *BMC microbiology* 2013, **13**(1):126.
193. Barton NH, Hewitt G: **Analysis of hybrid zones.** *Annual review of Ecology and Systematics* 1985:113-148.
194. Wright S: **The genetical structure of populations.** *Annals of eugenics* 1949, **15**(1):323-354.
195. Wright S: **The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating.** *Evolution* 1965:395-420.
196. Balloux F, Lugon-Moulin N: **The estimation of population differentiation with microsatellite markers.** *Molecular ecology* 2002, **11**(2):155-165.
197. Lewontin R, Kojima K-i: **The evolutionary dynamics of complex polymorphisms.** *Evolution* 1960:458-472.
198. Selander RK, Levin BR: **Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations.** *Science* 1980, **210**(4469):545-547.
199. Selander R, Musser J: **Population genetics of bacterial pathogenesis.** *THE BACTERIA: A TREATISE ON STRUCTURE AND FUNCTION* 1990 1990.

200. Feil EJ, Smith JM, Enright MC, Spratt BG: **Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data.** *Genetics* 2000, **154**(4):1439-1450.
201. Hayward AC: **Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*.** *Journal of Applied Bacteriology* 1964, **27**:265-277.
202. Poussier S: **Exploration de la diversité génétique de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien. Détection et dynamique des populations dans les réservoirs d'inoculum.** *PhD thesis.* Rennes: Rennes I; 2000.
203. Buddenhagen IW, Elsasser TA: **An insect-spread bacterial wilt epiphytotic of bluggoe banana.** *Nature* 1962, **194**(4824):164-165.
204. Buddenhagen I, Elsasser TA: **An Insect-Spread Bacterial Wilt Epiphytotic of Bluggoe Banana.** *Nature* 1962, **194**(4824):164-165.
205. Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P: ***Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential.** *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**(21):6790-6801.
206. Elphinstone JG: **The current bacterial wilt situation: a global overview.** In: *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.* Edited by Allen C, Prior P, Hayward AC. Saint Paul, MN, USA: APS Press; 2005: 9-28.
207. Madden LV, Wheelis M: **The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops.** *Annual Review of Phytopathology* 2003, **41**:155-176.
208. Xu J, Pan Z, Prior P, Xu J, Zhang Z, Zhang H, Zhang L, He L, Feng J: **Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China.** *European journal of plant pathology* 2009, **125**(4):641-653.
209. She XM, He ZF, Luo FF, Li HP: **First report of bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on *Ageratum conyzoides* in China.** *Plant Disease* 2013, **97**(3):418-419.
210. Chandrashekara KN, Prasannakumar MK, Deepa M, Vani A, Khan ANA: **Prevalence of races and biotypes of *Ralstonia solanacearum* in India.** *Journal of Plant Protection Research* 2012, **52**(1):53-58.
211. Sagar V, Somani AK, Arora RK, Sharma S, Chakrabarti SK, Tiwari SK, Chaturvedi R, Singh BP: **Status of Bacterial Wilt of Potato in the Malwa Region of Madhya Pradesh in India.** *Journal of Plant Pathology* 2013, **95**(2):321-328.
212. Ramesh R, Achari GA, Gaitonde S: **Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting solanaceous vegetables from India reveals the existence of unknown or newer sequencers of Phylotype I strains.** *European Journal of Plant Pathology* 2014, **140**(3):543-562.
213. Zulperi D, Sijam K: **First Report of *Ralstonia solanacearum* Race 2 Biovar 1 Causing Moko Disease of Banana in Malaysia.** *Plant disease* 2014, **98**(2):275-275.
214. Zulperi D, Sijam K, Mior Ahmad Z, Awang Y, Sulaiman Rashid T: **Occurrence of *Ralstonia solanacearum* Race 2 Biovar 1 Associated with Moko Disease of Banana (*Musa paradisiaca* cv. Nipah) in Malaysia.** *Journal of phytopathology* 2014, **162**(10):697-702.
215. Wu Y, Cheng A, Lin C, Chen C: **First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* on Roselle in Taiwan.** *Plant disease* 2013, **97**(10):1375-1375.
216. Fajinmi AA, Fajinmi OB: **An overview of bacterial wilt disease of tomato in Nigeria.** *Agricultural Journal* 2010, **5**(4):242-247.
217. Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, Prior P: **Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon.** *Plant disease* 2009, **93**(11):1123-1130.
218. Thera AT, Jacobsen BJ, Neher OT: **Bacterial Wilt of Solanaceae Caused by *Ralstonia solanacearum* Race 1 Biovar 3 in Mali.** *Plant disease* 2010, **94**(3):372-372.
219. N'Guessan CA, Abo K, Fondio L, Chiroleu F, Lebeau A, Poussier S, Wicker E, Kone D: **So near and yet so far: the specific case of *Ralstonia solanacearum* populations from Cote d'Ivoire in Africa.** *Phytopathology* 2012, **102**(8):733-740.

220. Lemessa F, Zeller W: **Isolation and characterisation of *Ralstonia solanacearum* strains from Solanaceae crops in Ethiopia.** *Journal of Basic Microbiology* 2007, **47**(1):40-49.
221. Sikirou R, Beed F, Ezin V, Gbehounou G, Miller SA, Wydra K: **First report of bacterial wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) caused by *Ralstonia solanacearum* in Benin.** *Plant disease* 2009, **93**(5):549.
222. Mian D, Coranson Beaudu R, Dufeal D, Grassart L, Mention P: **Status report on *Ralstonia solanacearum* on anthurium in Martinique [France]. - *Ralstonia solanacearum* sur anthurium a la Martinique [France]. Une bacteriose inquietante.** *Phytoma* 2002 43-45.
223. Romero GC, Estevez de Jensen C, Palmateer AJ: **First report of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* biovar 1 in Puerto Rico.** *Plant Health Progress* 2013:n.p.
224. Tebaldi ND, Leite LN, Marque JMd, Furlanetto MCA, Mota LCBM: **Occurrence of *Ralstonia solanacearum* on olive tree in Brazil.** *9 ref* 2014, **40**(2):n.p.
225. Fonseca N, Guimaraes L, Hermenegildo P, Teixeira R, Lopes C, Alfenas A: **Molecular characterization of *Ralstonia solanacearum* infecting *Eucalyptus* spp.** *Forest pathology* 2014, **44**(2):107-116.
226. Andrade FWRd, Amorim EPdR, Eloy AP, Rufino MJ: **Occurrence of banana diseases in the state of Alagoas.** *9 ref* 2009, **35**(4):305-309.
227. Sanchez Perez A, Mejia L, Fegan M, Allen C: **Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection.** *Plant pathology* 2008, **57**(2):320-331.
228. Santiago TR, Grabowski C, Mizubuti ESG: **First report of bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* on *Eucalyptus* sp. in Paraguay.** *New Disease Reports* 2014, **29**(2):n.p.
229. Siri MI, Sanabria A, Pianzola MJ: **Genetic Diversity and Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* Strains Causing Bacterial Wilt of Potato in Uruguay.** *Plant disease* 2011, **95**(10):1292-1301.
230. Daly P: **Vegetable crops in New Caledonia: a report on diseases and pests.** *Phytoma* 1999(519):28-31.
231. Bocsanczy AM, Achenbach UC, Mangravita-Novo A, Yuen JM, Norman DJ: **Comparative effect of low temperature on virulence and twitching motility of *Ralstonia solanacearum* strains present in Florida.** *Phytopathology* 2012, **102**(2):185-194.
232. Norman D, Zapata M, Gabriel DW, Duan YP, Yuen JMF, Mangravita-Novo A, Donahoo RS: **Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America.** *Phytopathology* 2009, **99**(9):1070-1077.
233. Wimer AF, Rideout SL, Freeman JH: **Temporal and spatial distribution of tomato bacterial wilt on Virginia's eastern shore.** *HortTechnology* 2011, **21**(2):198-201.
234. Cruz L, Eloy M, Quirino F, Carrinho H: ***Ralstonia solanacearum* biovar 1 associated with a new outbreak of potato brown rot in Portugal.** *21 ref* 2008, **47**(2):87-91.
235. Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Alvarez B, Lopez MM, Biosca EG: **Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river : recovery of stressed cells at low temperatures.** *Applied and Environmental Microbiology* 2005, **71**(1):140-148.
236. Loreti S, Fiori M, De Simone D, Falchi G, Gallelli A, Schiaffino A, Ena S: **Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, on tomato in Italy.** *Plant pathology* 2008, **57**(2):368-368.
237. Milijasevic-Marcic S, Todorovic B, Potocnik I, Rekanovic E, Stepanovic M, Mitrovic J, Duduk B: ***Ralstonia solanacearum* - a new threat to potato production in Serbia.** *Pesticidi i Fitomedicina* 2013, **28**(4):229-237.
238. Denny TP: **Plant pathogenic *Ralstonia* species.** In: *Plant-associated bacteria.* Edited by Gnanamanickam SS. Dordrecht, the Netherlands: Springer; 2006: 573-644.
239. Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten JK, Allen C: **Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium.** *Phytopathology* 2005, **95**(2):136-143.

240. Prior P, Beramis M, Chillet M, Schmit J: **Preliminary studies for tomato bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith) resistance mechanism.** *Symbiosis* 1990, **9**:393-400.
241. Yao J, Allen C: **Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of Bacteriology* 2006, **188**(10):3697-3708.
242. Kelman A, Sequeira L: **Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum*.** *Phytopathology* 1965, **55**:304-309.
243. Vasse J, Danoun S, Trigalet A: **Microscopic studies of root infection in resistant tomato cultivar Hawaii7996.** In: *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.* Edited by Allen C, Prior P, Hayward AC. St Paul: APS Press; 2005: 285-291.
244. McGarvey JA, Denny TP, Schell MA: **Spatial-temporal and quantitative analysis of growth and EPS I production by *Ralstonia solanacearum* in resistant and susceptible tomato cultivars.** *Phytopathology* 1999, **89**(12):1233-1239.
245. Genin S, Boucher C: **Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*.** *Annual Review of Phytopathology* 2004, **42**:107-134.
246. Genin S: **Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*.** *New Phytologist* 2010, **187**(4):920-928.
247. Alvarez B, Vasse J, Courtois VI, Trigalet DD, Lopez MM, Trigalet A: **Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species.** *Phytopathology* 2008, **98**(1):59-68.
248. Collmer A, Schneider DJ, Lindeberg M: **Lifestyles of the effector rich: genome-enabled characterization of bacterial plant pathogens.** *many ref* 2009, **150**(4):1623-1630.
249. Sequeira L: **Bacterial wilt: the missing element in International banana improvement programs.** In: *Bacterial wilt disease: Molecular and ecological aspects.* Edited by Prior P, Allen C, Elphinstone J. Heidelberg, Paris: Springer - INRA Editions; 1998: 6-14.
250. Hayward AC: **Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*.** *Annual Review of Phytopathology* 1991, **29**:65-87.
251. van Overbeek LS, Bergervoet JHW, Jacobs FHH, van Elsas JD: **The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2.** *Phytopathology* 2004, **94**(5):463-469.
252. Hayward AC: **The hosts of *Pseudomonas solanacearum*.** In: *Bacterial wilt -The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.* Edited by Hayward ACH, G.L. Wallingford: CAB International; 1994: 9-24.
253. Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Prior P: **Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies).** *Plant pathology* 2009, **58**(5):853-861.
254. Poussier S, Thoquet P, Trigalet-Demery D, Barthet S, Meyer D, Arlat M, Trigalet A: **Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene.** *Molecular Microbiology* 2003, **49**(4):991-1003.
255. Gillings MR, Fahy P: **Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex.** In: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*.* Edited by Hayward AC, Hartman GL. Wallingford, United Kingdom: CAB International; 1994: 95-112.
256. Fegan M, Prior P: **How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex".** In: *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.* Edited by Allen C, Prior P, Hayward AC. Madison: APS Press; 2005: 449-462.
257. Buddenhagen IW, Sequeira L, Kelman A: **Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*.** *Phytopathology* 1962, **52**:726.
258. Cohan FM, Perry EB: **A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity.** *Current Biology* 2007, **17**(10):R373-R386.

259. Milling A, Meng FH, Denny TP, Allen C: **Interactions with hosts at cool temperatures, not cold tolerance, explain the unique epidemiology of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2.** *Phytopathology* 2009, **99**(10):1127-1134.
260. He LY, Sequeira L, Kelman A: **Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China.** *Plant Disease* 1983, **67**:1357-1361.
261. Cohan FM: **Bacterial species and speciation.** *Systematic biology* 2001, **50**(4):513-524.
262. Cook D, Barlow E, Sequeira L: **Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* : detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1989, **2**(3):113-121.
263. Taghavi M, Hayward C, Sly LI, Fegan M: **Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences.** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996, **46**(1):10-15.
264. Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward AC, Fegan M: **Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex.** *Systematic and Applied Microbiology* 2000, **23**(4):479-486.
265. Opina N, Tavner F, Hollway G, Wang J-F, Li T-H, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF *et al*: **A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*).** *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 1997, **5**:19-30.
266. Didelot X, Falush D: **Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data.** *Genetics* 2007, **175**(3):1251-1266.
267. Prior P, Fegan M: **Recent development in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*.** In: *Proceedings of the First International Symposium on tomato diseases.* Edited by Momol T, Jones JB, vol. 695: ISHS-Acta Horticulturae; 2005: 127-136.
268. Prior P, Fegan M: **Diversity and molecular detection of *Ralstonia solanacearum* race 2 strains by multiplex PCR.** In: *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.* Edited by Allen C, Prior P, Hayward AC. Madison: APS Press; 2005: 405-414.
269. Fegan M: **Bacterial wilt diseases of banana: evolution and ecology.** In: *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex.* Edited by Allen C, Prior P, Hayward AC. Saint Paul, MN, USA: APS Press; 2005: 379-386.
270. Vanechoutte M, Kämpfer P, De Baere T, Falsen E, Verschraegen G: ***Wautersia* gen.nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb.nov.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004, **54**:317-327.
271. Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S, Boucher C: **Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis.** *Journal of Bacteriology* 2007, **189**(2):377-387.
272. Remenant B, de Cambiaire JC, Cellier G, Jacobs JM, Mangenot S, Barbe V, Lajus A, Vallenet D, Medigue C, Fegan M *et al*: **The genomes of the insect-transmitted plant pathogens *Ralstonia syzygii* and Blood Disease Bacterium reveal a recent evolutionary origin within the *R. solanacearum* species.** *PLoS One* 2011, **6**(9):e24356.
273. Remenant B, Coupat-Goutaland B, Guidot A, Cellier G, Wicker E, Allen C, Fegan M, Pruvost O, Elbaz M, Calteau A *et al*: **Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence.** *BMC Genomics* 2010, **11**(379):1-16.
274. Safni I, Cleenwerk I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U: **Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *R. solanacearum* and *R. syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* , *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp.**

- indonesiensis subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. celebesensis subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotypes I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014, **64**:3087-3103.
275. Ailloud F, Lowe T, Cellier G, Roche D, Allen C, Prior P: **Comparative genomic analysis of *Ralstonia solanacearum* reveals candidate genes for host specificity.** *BMC Genomics* 2015, **16**(1):270.
276. Ailloud F: **Le pouvoir pathogène chez *Ralstonia solanacearum* phylotype II génomique intégrative et paysages transcriptomiques en relation avec l'adaptation à l'hôte.** La Réunion; 2015.
277. Waller J, Sitepu D: **Sumatra disease of cloves in Indonesia.** *PANS Pest Articles & News Summaries* 1975, **21**(2):141-147.
278. Garrity A: **Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, **55**:2235-2238.
279. Coll NS, Valls M: **Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system.** *Microbial biotechnology* 2013, **6**(6):614-620.
280. Peeters N, Carrere S, Anisimova M, Plener L, Cazale AC, Genin S: **Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex.** *BMC Genomics* 2013, **14**(859):n.p.
281. Clarke CR, Studholme DJ, Hayes B, Runde B, Weisberg A, Cai R, Wroblewski T, Daunay MC, Wicker E, Castillo JA *et al*: **Genome-Enabled Phylogeographic Investigation of the Quarantine Pathogen *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 and Screening for Sources of Resistance Against Its Core Effectors.** *Phytopathology* 2015, **105**(5):597-607.
282. Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Mukhtar MS, Cherkis K, Roach J, Grant SR, Jones CD, Dangl JL: **Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates.** *PLoS pathog* 2011, **7**(7):e1002132.
283. Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L *et al*: **Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*.** *Nature (London)* 2002, **415**(6871):497-502.
284. Lefeuvre P, Harkins GW, Lett JM, Briddon RW, Chase MW, Moury B, Martin DP: **Evolutionary Time-Scale of the Begomoviruses: Evidence from Integrated Sequences in the Nicotiana Genome.** *Plos one* 2011, **6**(5).
285. Gabriel DW, Allen C, Schell M, Denny TP, Greenberg JT, Duan YP, Flores CZ, Huang Q, Clifford JM, Presting G *et al*: **Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2.** *48 ref 2006*, **19**(1):69-79.
286. Guidot A, Coupat B, Fall S, Prior P, Bertolla F: **Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays.** *ISME Journal* 2009, **3**(5):549-562.
287. Li Z, Wu S, Bai X, Liu Y, Lu J, Liu Y, Xiao B, Lu X, Fan L: **Genome Sequence of the Tobacco Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of bacteriology* 2011 Nov 2011, **193**(21):6088-6089.
288. Xu J, Zheng H, Liu L, Pan Z, Prior P, Tang B, Xu J, Zhang H, Tian Q, Zhang L *et al*: **Complete Genome Sequence of the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Strain Po82.** *Journal of Bacteriology* 2011, **193**(16):4261-4262.
289. Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, Gojobori T: **Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes.** *Nat Genet* 2004, **36**(7):760-766.
290. Bertolla F, Frostegard A, Brito B, Nesme X, Simonet P: **During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1999, **12**(5):467-472.
291. Coupat B, Chaumeille-Dole F, Fall S, Prior P, Simonet P, Nesme X, Bertolla F: **Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred.** *FEMS Microbiology Ecology* 2008, **66**(1):14-24.

292. Coupat-Goutaland B, Bernillon D, Guidot A, Prior P, Nesme X, Bertolla F: ***Ralstonia solanacearum* virulence increased following large interstrain gene transfers by natural transformation.** *Molecular plant-microbe interactions* 2011, **24**(4):497-505.
293. Genin S, Denny TP: **Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex.** *Annual Review of Phytopathology* 2012, **50**:67-89.
294. Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S: **A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes.** *The EMBO journal* 2000, **19**(10):2304-2314.
295. Tans-Kersten J, Huang H, Allen C: ***Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183**(12):3597-3605.
296. Liu H, Kang Y, Genin S, Schell M, Denny T: **Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system.** *Microbiol* 2001 **147**(pt.12):3215-3229.
297. Clock SA, Planet PJ, Perez BA, Figurski DH: **Outer membrane components of the Tad (tight adherence) secretin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.** *Journal of bacteriology* 2008, **190**(3):980-990.
298. Tans Kersten J, Huang HY, Allen C: ***Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato.** *Journal of Bacteriology* 2001, **183**(12):3597-3605.
299. Denny TP, Baek S-R: **Genetic evidence that extracellular polysaccharide is a virulence factor of *Pseudomonas solanacearum*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1991, **4**(2):198-206.
300. Orgambide G, Montrozier H, Servin P, Roussel J, Trigalet-Demery D, Trigalet A: **High heterogeneity of the exopolysaccharides of *Pseudomonas solanacearum* strain GMI 1000 and the complete structure of the major polysaccharide.** *Journal of Biological Chemistry* 1991, **266**(13):8312-8321.
301. Alvarez AM: **Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases.** *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:339-366.
302. Schell MA: **Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network.** *Annual Review of Phytopathology* 2000, **38**:263-292.
303. Genin S, Boucher C: ***Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome.** *Molecular Plant Pathology* 2002, **3**(3):111-118.
304. Denny TP, Saile E, Flavier AB, Clough SJ, Ganova-Raeva LM, Schell MA: **The role of extracellular polysaccharide and regulated gene expression in invasion and colonization of tomato by *Ralstonia solanacearum*.** *Bulletin Orib/Srop IOBC/WPRS* 1998, **21**(9):263-270.
305. Kang Y, Saile E, Schell MA, Denny TP: **Quantitative immunofluorescence of regulated eps gene expression in single cells of *Ralstonia solanacearum*.** *Applied & Environmental Microbiology* 1999, **65**(6):2356-2362.
306. Milling A, Babujee L, Allen C: ***Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants.** *Plos one* 2011, **6**(1):e15853.
307. Yao J, Allen C: **The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host.** *Journal of Bacteriology* 2007, **189**(17):6415-6424.
308. Gonzalez ET, Allen C: **Characterization of a *Ralstonia solanacearum* Operon Required for Polygalacturonate Degradation and Uptake of Galacturonic Acid.** *Molecular plant-microbe interactions* 2003, **16**(6):536-544.
309. Huang Q, Allen C: **Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacearum* on tomato plants.** *Physiol mol plant pathol* 2000, **57**(2):77-83.
310. Roberts D, Denny T, Schell M: **Cloning of the egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity.** *Journal of Bacteriology* 1988, **170**(4):1445-1451.
311. Liu HL, Zhang SP, Schell MA, Denny TP: **Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence.** *48 ref* 2005, **18**(12):1296-1305.

312. Liu H, Zhang S, Schell MA, Denny TP: **Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence.** *Molecular plant microbe interactions MPMI* 2005 Dec, v 2005(12):1296-1305.
313. Brito B, Aldon D, Barberis P, Boucher C, Genin S: **A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* hrp genes.** *48 ref* 2002, **15**(2):109-119.
314. Cunnac S, Boucher C, Genin S: **Characterization of the cis-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of Bacteriology* 2004, **186**(8):2309-2318.
315. Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S: **Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system.** *Molecular Microbiology* 2004, **53**(1):115-128.
316. Takeshi Y, Akinori K, Yasuhumi H, Kouhei O: **Analysis of regulation mechanism of hrp regulon expression depending on culture condition in *Ralstonia solanacearum*.** *Genes Genet Syst* 2007, **82**(6):552-552.
317. Valls M, Genin S, Boucher CA: **Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*.** *Plos pathogens* 2006, **2**(8):798-807.
318. Brown DG, Swanson JK, Allen C: **Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence.** *Applied and environmental microbiology* 2007, **73**(9):2777-2786.
319. Hikichi Y, Yoshimochi T, Zhang Y, Ohnishi K, Kiba A: **Infectious strategy of *Ralstonia solanacearum* corresponding to its infectious stages into host plants.** *Plant Protection (Japan)* 2010, **64**(2):96-100.
320. Huang J, Carney BF, Denny TP, Weissinger AK, Schell MA: **A complex network regulates expression of *eps* and other virulence genes of *Pseudomonas solanacearum*.** *Journal of bacteriology* 1995, **177**(5):1259-1267.
321. Liu H, He L, Mao G, Luo J: **Role of extracellular proteins in pathogenesis of *Ralstonia solanacearum*.** *Scientia Agricultura Sinica* 2000, **33**(1):57-61.
322. Von Bodman SB, Dietz Bauer W, Coplin DL: **Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria.** *Annual Review of Phytopathology* 2003, **41**:455-482.
323. Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP: **Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia*.** *Molecular microbiology* 1997, **26**(2):251-259.
324. Kang Y, Liu H, Genin S, Schell M, Denny T: ***Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence.** *Molecular Microbiology* 2002 **46**(2):427-437.
325. Brumbley SM, Carney B, Denny TP: **Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional regulator.** *Journal of bacteriology* 1993, **175**(17):5477-5487.
326. Denny T, Brumbley S, Carney B, Clough S, Schell M, Hayward A, Hartman G: **Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function.** *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum** 1994:137-155.
327. Kelman A, HRUSCHKA J: **The role of motility and aerotaxis in the selective increase of avirulent bacteria in still broth cultures of *Pseudomonas solanacearum*.** *Journal of general microbiology* 1973, **76**(1):177-188.
328. Jeong E-L, Timmis JN: **Novel insertion sequence elements associated with genetic heterogeneity and phenotype conversion in *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of bacteriology* 2000, **182**(16):4673-4676.

329. Abdallah AM, van Pittius NCG, Champion PAD, Cox J, Luirink J, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmek BJ, Bitter W: **Type VII secretion—mycobacteria show the way.** *Nature reviews microbiology* 2007, **5**(11):883-891.
330. Cornelis GR: **The type III secretion injectisome.** *Nature Reviews Microbiology* 2006, **4**(11):811-825.
331. Blocker AJ, Deane JE, Veenendaal AK, Roversi P, Hodgkinson JL, Johnson S, Lea SM: **What's the point of the type III secretion system needle?** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008, **105**(18):6507-6513.
332. Buttner D, He SY: **Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. (Special Issue: Plant interactions with bacterial pathogens.)** *many ref* 2009, **150**(4):1656-1664.
333. Ponciano G, Ishihara H, Tsuyumu S, Leach JE: **Bacterial effectors in plant disease and defense: keys to durable resistance ?** *Plant Disease* 2003, **87**(11):1272-1282.
334. Gonzalez ET, Brown DG, Swanson JK, Allen C: **Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors.** *Applied and Environmental Microbiology* 2007, **73**(12):3779-3786.
335. Peeters N, Guidot A, Vaillau F, Valls M: ***Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era.** *Molecular Plant Pathology* 2013, **14**(7):651-662.
336. Zhang L, Xu J, Xu J, Zhang H, He L, Feng J: **TssB is essential for virulence and required for Type VI secretion system in *Ralstonia solanacearum*.** *Microbial pathogenesis* 2014, **74**:1-7.
337. Chou S, Bui NK, Russell AB, Lexa KW, Gardiner TE, LeRoux M, Vollmer W, Mougous JD: **Structure of a peptidoglycan amidase effector targeted to Gram-negative bacteria by the type VI secretion system.** *Cell reports* 2012, **1**(6):656-664.
338. Zhang L, Xu J, Xu J, Chen K, He L, Feng J: **TssM is essential for virulence and required for type VI secretion in *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of Plant Diseases and Protection* 2012, **119**(4):125-134.
339. Alfano JR, Collmer A: **Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense.** *Annu Rev Phytopathol* 2004, **42**:385-414.
340. Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE: **Common and contrasting themes of plant and animal diseases.** *Science* 2001, **292**(5525):2285-2289.
341. Büttner D, Bonas U: **Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell.** *The EMBO journal* 2002, **21**(20):5313-5322.
342. Gijsegem Fv, Vasse J, Rycke Rd, Castello P, Boucher C: **Genetic dissection of the *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly.** *Molecular Microbiology* 2002, **44**(4):935-946.
343. Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Panagiotis F S, Charova SN, Kokkinidis M, Panopoulos NJ: **Playing the “Harp”: Evolution of Our Understanding of hrp/hrc Genes 1.** *Annual review of phytopathology* 2010, **48**:347-370.
344. Vasse J, Genin S, Frey P, Boucher C, Brito B: **The hrpB and hrpG regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process.** *Mol plant microb interact* 2000, **13**(3):259-267.
345. Parsot C, Hamiaux C, Page A-L: **The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems.** *Current opinion in microbiology* 2003, **6**(1):7-14.
346. Lohou D, Turner M, Lonjon F, Cazalcb A, Peeters N, Genin S, Vaillau F: **HpaP modulates type III effector secretion in *Ralstonia solanacearum* and harbours a substrate specificity switch domain essential for virulence.** *Molecular plant pathology* 2014, **15**(6):601-614.
347. Monteiro F, Sole M, Dijk Iv, Valls M: **A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*.** *Molecular plant-microbe interactions* 2012, **25**(4):557-568.
348. Potnis N, Krasileva K, Chow V, Almeida NF, Patil PB, Ryan RP, Sharlach M, Behlau F, Dow JM, Momol M: **Comparative genomics reveals diversity among xanthomonads infecting tomato and pepper.** *BMC genomics* 2011, **12**(1):146.

349. Lin Y, Chou IC, Cheng C: **A highly efficient bioassay system for screening *Ralstonia solanacearum* mutants with altered virulence.** *17 ref 2008*, **53(2)**:116-123.
350. Guttman DS, Greenberg JT: **Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system.** *Molecular plant-microbe interactions* 2001, **14(2)**:145-155.
351. Bent AF, Mackey D: **Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions.** *Annu Rev Phytopathol* 2007, **45**:399-436.
352. Deslandes L, Genin S: **Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms.** *Current Opinion in Plant Biology* 2014, **20C**:110-117.
353. Angot A, Peeters N, Lechner E, Vaillau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S: ***Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103(39)**:14620-14625.
354. Sole M, Popa C, Mith O, Sohn K, Jones JDG, Deslandes L, Valls M: **The *awr* gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities.** *Molecular plant-microbe interactions* 2012, **25(7)**:941-953.
355. Cunnac S, Chakravarthy S, Kvitko BH, Russell AB, Martin GB, Collmer A: **Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108(7)**:2975-2980.
356. Arlat M, Van Gijsegem F, Huet J, Pernollet J, Boucher C: **PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*.** *The EMBO journal* 1994, **13(3)**:543.
357. Noël L, Thieme F, Nennstiel D, Bonas U: **cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *Molecular microbiology* 2001, **41(6)**:1271-1281.
358. Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel AC, Boucher C, Genin S: **Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco.** *Molecular plant-microbe interactions* 2009, **22(5)**:538-550.
359. Bart R, Cohn M, Kassen A, McCallum EJ, Shybut M, Petriello A, Krasileva K, Dahlbeck D, Medina C, Alicai T: **High-throughput genomic sequencing of cassava bacterial blight strains identifies conserved effectors to target for durable resistance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, **109(28)**:E1972-E1979.
360. Angot A: **Caractérisation d'une famille d'effecteurs de type III de la bactérie phytopathogène *Ralstonia solanacearum* et identification de ses cibles végétales.** 2006.
361. Remigi P, Anisimova M, Guidot A, Genin S, Peeters N: **Functional diversification of the GALA type III effector family contributes to *Ralstonia solanacearum* adaptation on different plant hosts.** *New Phytol* 2011, **192(4)**:976-987.
362. Angot A, Vergunst A, Genin S, Peeters N: **Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems.** *Plos pathogens* 2007, **3(1)**:e3.
363. Orth K, Palmer LE, Bao ZQ, Stewart S, Rudolph AE, Bliska JB, Dixon JE: **Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector.** *Science* 1999, **285(5435)**:1920-1923.
364. Monack DM, Meccas J, Ghori N, Falkow S: ***Yersinia* signals macrophages to undergo apoptosis and YopJ is necessary for this cell death.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, **94(19)**:10385-10390.
365. Collier-Hyams LS, Zeng H, Sun J, Tomlinson AD, Bao ZQ, Chen H, Madara JL, Orth K, Neish AS: **Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF- κ B pathway.** *The Journal of Immunology* 2002, **169(6)**:2846-2850.

366. Lewis JD, Lee A, Ma W, Zhou H, Guttman DS, Desveaux D: **The YopJ superfamily in plant-associated bacteria.** *Molecular plant pathology* 2011, **12**(9):928-937.
367. Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, Grimsley N, Boucher C: **PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2002, **15**(10):1058-1068.
368. Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzcon CR, Genin S: **A Competitive Index Assay Identifies Several *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Mutant Strains with Reduced Fitness in Host Plants.** *Molecular plant-microbe interactions* 2010, **23**(9):1197-1205.
369. Lavie M, Seunes B, Prior P, Boucher C: **Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004, **17**(8):931-940.
370. Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Briere C, de Wit P, Marco Y, Deslandes L: **RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector.** *Plant cell* 2008, **20**(8):2252-2264.
371. Carney BF, Denny TP: **A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level.** *Journal of bacteriology* 1990, **172**(9):4836-4843.
372. Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, A. FB, A. KD: **Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004, **17**(12):1376-1384.
373. Liu Y, Kanda A, Kiba A, Hikichi Y, Ohnishi K: **Distribution of avirulence genes *avrA* and *popP1* in 22 Japanese phylotype I strains of *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of general plant pathology* 2009, **75**(5):362-368.
374. Racape J, Belbahri L, Engelhardt S, Lacombe B, Lee J, Lochman J, Marais A, Nicole M, Nuernberger T, Parlange F *et al*: **Ca²⁺-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco.** *Molecular Microbiology* 2005, **58**(5):1406-1420.
375. Nahar K, Matsumoto I, Taguchi F, Inagaki Y, Yamamoto M, Toyoda K, Shiraishi T, Ichinose Y, Mukaihara T: ***Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*.** *Molecular Plant Pathology* 2014, **15**(3):297-303.
376. Pensec F, Lebeau A, Daunay M-C, Chiroleu F, Guidot A, Wicker E: **Towards the identification of Type III effectors associated to *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant.** *Phytopathology* 2015(ja).
377. Poueymiro M, Cazale A, Francois J, Parrou J, Peeters N, Genin S: **A *Ralstonia solanacearum* Type III Effector Directs the Production of the Plant Signal Metabolite Trehalose-6-Phosphate.** *Mbio* 2014, **5**(6):n.p.
378. Li L, Atef A, Piatek A, Zahir A, Piatek M, Aouida M, Sharakuu A, Mahjoub A, Wang G, Khan S *et al*: **Characterization and DNA-binding specificities of *Ralstonia* TAL-like effectors. (Special Issue: Pollen tube and reproduction.)** *Mol Plant* 2013, **6**(4):1318-1330.
379. de Lange O, Schreiber T, Schandry N, Radeck J, Braun K, Koszinowski J, Heuer H, Strauss A, Lahaye T: **Breaking the DNA-binding code of *Ralstonia solanacearum* TAL effectors provides new possibilities to generate plant resistance genes against bacterial wilt disease.** *New phytologist* 2013, **199**(3):773-786.
380. Collmer A, Lindeberg M, Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ, Alfano JR: **Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors.** *Trends in microbiology* 2002, **10**(10):462-469.
381. Greenberg JT, Vinatzer BA: **Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells.** *Current opinion in microbiology* 2003, **6**(1):20-28.

382. Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C: **Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2005, **18**(9):938-949.
383. Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ, Tam VC, Chancey ST, Shan L, Jamir Y, Schechter LM, Janes MD, Buell CR, Tang X: **Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**(11):7652-7657.
384. Hajri A, Brin C, Hunault G, Lardeux F, Lemaire C, Manceau C, Boureau T, Poussier S: **A “repertoire for repertoire” hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*.** *PLoS One* 2009, **4**(8):e6632.
385. Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF, Dintinger J, Chiroleu F, Wicker E, Prior P: **Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex.** *Phytopathology* 2011, **101**(1):154-165.
386. Hajri A, Brin C, Zhao S, David P, FENG JX, Koebnik R, Szurek B, Verdier V, Boureau T, Poussier S: **Multilocus sequence analysis and type III effector repertoire mining provide new insights into the evolutionary history and virulence of *Xanthomonas oryzae*.** *Molecular plant pathology* 2012, **13**(3):288-302.
387. Escalon A, Javegny S, Vernière C, Noël LD, Vital K, Poussier S, Hajri A, Boureau T, Pruvost O, Arlat M: **Variations in type III effector repertoires, pathological phenotypes and host range of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes.** *Molecular plant pathology* 2013, **14**(5):483-496.
388. Sarkar SF, Gordon JS, Martin GB, Guttman DS: **Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*.** *Genetics* 2006, **174**(2):1041-1056.
389. French E: **Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes.** 1994.
390. Wicker E, Grassart L, Mian D, Coranson Beaudu R, Dufeal D, Guilbaud C, Prior P: ***Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita moschata*, and *Anthurium* spp, new hosts of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies).** *Bacterial Wilt Newsletter* 2002, **17**:20-21.
391. Deberdt P, Perrin B, Coranson-Beaudu R, Duyck P, Wicker E: **Effect of *Allium fistulosum* Extract on *Ralstonia solanacearum* Populations and Tomato Bacterial Wilt.** *Plant disease* 2012, **96**(5):687-692.
392. Saddler GS, Elphinstone J, Smith J: **The 4th International Bacterial Wilt Symposium.** In: *The 4th International Bacterial Wilt Symposium: 2006; York.* SASA, CSL, BSPP: 107.
393. Wenneker M, Verdel MSW, Groeneveld RMW, Kempenaar C, Beuningen ARv, Janse JD: ***Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*).** *European Journal of Plant Pathology* 1999, **105**(3):307-315.
394. Saddler G, Allen C, Prior P, Hayward A: **Management of bacterial wilt disease.** *Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex* 2005:121-132.
395. Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM: **Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato.** *Plant Disease* 2003, **87**(4):423-427.
396. Ji P, Momol MT, Olson SM, HOng J, Pradhanang P, Anith KN: **New tactics for bacterial wilt management on tomatoes in the Southern U.S.** In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases.* Edited by Momol MT, Ji P, Jones JB, vol. 695. Leuven, Belgium: ISHS - Acta Horticulturae; 2005.
397. Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanang PM, Jones JB: **Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions.** *Plant Disease* 2005, **89**(5):497-500.

398. Hong JC, Momol MT, Ji PS, Olson SM, Colee J, Jones JB: **Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-*S*-methyl**. *Crop Protection* 2011, **30**(10):1340-1345.
399. Frey P, Smith JJ, Albar L, Prior P, Saddler GS, Trigalet-Demery D, Trigalet A: **Bacteriocin typing of *Burkholderia solanacearum* race 1 in the French West Indies and correlation with genomic variation of the pathogen**. *Applied and Environmental Microbiology* 1996, **62**(2):473-479.
400. Prior P, Grimault V, Schmit J: **Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: present status and prospects**. In: *Bacterial wilt : the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Edited by Hayward A, Hartman GL. Wallingford, UK: CAB International; 1994: 209-224.
401. Jaunet TX, Wang JF: **Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan**. *Phytopathology* 1999, **89**(4):320-327.
402. Initiative AG: **Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana***. *nature* 2000, **408**(6814):796.
403. Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y: **Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum***. *48 ref* 1998, **11**(7):659-667.
404. Godiard L, Sauviac L, Torii Keiko U, Grenon O, Mangin B, Grimsley Nigel H, Marco Y: **ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt**. *Plant Journal* 2003, **36**(3):353-365.
405. Le Roux C, Huet G, Jauneau A, Camborde L, Tremousaygue D, Kraut A, Zhou B, Levaillant M, Adachi H, Yoshioka H *et al*: **A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity**. *Cell* 2015, **161**(5):1074-1088.
406. Tasset C, Bernoux M, Jauneau A, Pouzet C, Briere C, Kieffer-Jacquino S, Rivas S, Marco Y, Deslandes L: **Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R-mediated immunity in *Arabidopsis***. *Plos pathogens* 2010, **6**(11):e1001202.
407. Sarris PF, Duxbury Z, Huh SU, Ma Y, Segonzac C, Sklenar J, Derbyshire P, Cevik V, Rallapalli G, Saucet SB *et al*: **A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors**. *Cell* 2015, **161**(5):1089-1100.
408. Williams SJ, KeeHoon S, Li W, Bernoux M, Sarris PF, Segonzac C, Ve T, Yan M, Saucet SB, Ericsson DJ *et al*: **Structural basis for assembly and function of a heterodimeric plant immune receptor**. *Science (Washington)* 2014, **344**(6181):299-303.
409. Hiruma K, Fukunaga S, Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Watanabe S, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y: **Glutathione and tryptophan metabolism are required for *Arabidopsis* immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(23):9589-9594.
410. Narusaka M, Hatakeyama K, Shirasu K, Narusaka Y: ***Arabidopsis* dual resistance proteins, both RPS4 and RRS1, are required for resistance to bacterial wilt in transgenic *Brassica* crops**. *Plant Signaling and Behavior* 2014, **9**(5):n.p.
411. van der Linden L, Bredenkamp J, Naidoo S, Fouche-Weich J, Denby KJ, Genin S, Marco Y, Berger DK: **Gene-for-gene tolerance to bacterial wilt in *Arabidopsis***. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2013, **26**(4):398-406.
412. Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BP, Staskawicz B *et al*: **Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance**. *Nature Biotechnology* 2010, **28**(4):365-369.
413. Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy P: **Medicago truncatula, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis**. *Plant Mol Biol Rep* 1990, **8**(1):40-49.

414. Branca A, Paape TD, Zhou P, Briskine R, Farmer AD, Mudge J, Bharti AK, Woodward JE, May GD, Gentzbittel L: **Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in the model legume *Medicago truncatula***. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**(42):E864-E870.
415. Turner M, Jauneau A, Genin S, Tavella MJ, Vaillau F, Gentzbittel L, Jardinaud MF: **Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system effectors acting on root infection process and disease development**. *many ref* 2009, **150**(4):1713-1722.
416. Ben C, Debelle F, Berges H, Bellec A, Jardinaud M, Anson P, Huguet T, Gentzbittel L, Vaillau F: **MtQRRS1, an R-locus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum***. *New phytologist* 2013, **199**(3):758-772.
417. Vaillau F, Sartorel E, Jardinaud MF, Chardon F, Genin S, Huguet T, Gentzbittel L, Petitprez MA: **Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula***. *Molecular plant-microbe interactions* 2007, **20**(2):159-167.
418. Danesh D, Aarons S, McGill GE, Young ND: **Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato**. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1994, **7**:464-471.
419. Mangin B, Thoquet P, Olivier J, Grimsley NH: **Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to Bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci**. *Genetics* 1999, **151**:1165-1172.
420. Wang J, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley N: **Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus**. *48 ref* 2000, **13**(1):6-13.
421. Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N: **Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996**. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1996, **9**:826-836.
422. Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P: **Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato**. *Theor Appl Genet* 2006, **113**(1):110-121.
423. Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anaïs G, B. M, Bazin B, Nazer R, Grimsley N: **Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies**. *48 ref* 1996, **9**(9):837-842.
424. Wang J-F, Ho F-I, Truong HTH, Huang S-M, Balatero CH, Dittapongpitch V, Hidayati N: **Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum***. *Euphytica* 2013, **190**(2):241-252.
425. Lebeau A: **Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les géniteurs de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine**. *PhD*. Saint Denis de la Réunion: Université de la Réunion; 2010.
426. Lebeau A, Gouy M, Daunay M, Wicker E, Chiroleu F, Prior P, Frary A, Dintinger J: **Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant**. *Theoretical and Applied Genetics* 2012, **126**(1):143-158.
427. N'Guessan AC: **Phylogénie, structure génétique et diversité de virulence de *Ralstonia solanacearum*, agent du flétrissement bactérien, en Côte d'Ivoire**. *PhD*. Abidjan: Université de Cocody-Abidjan; 2013.
428. Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, Launay J, Noreksal M, Riviere P, Vigné F, Laplace D, Lebreton L, Wicker E: **Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge on the "emerging ecotype"**. *Phytopathology* 2014, **104**(6):586-596.
429. Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD: **Conservation of gene function in the solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant**. *Genetics* 2002, **161**(4):1713-1726.

430. Xi'ou X, Bihao C, Guannan L, Jianjun L, Qinghua C, Jin J, Yujing C: **Functional Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (RE-bw) in Eggplant.** *Plant Mol Biol Rep* 2014:1-16.
431. Cao B-H, Lei J-J, Wang Y, Chen G-J: **Inheritance and identification of SCAR marker linked to bacterial-wilt resistance in eggplant.** *African Journal of Biotechnology* 2009, **8**(20):5201-5207.
432. Xiao Xo, Cao B, Li G, Lei J, Chen Q, Jiang J, Cheng Y: **Functional Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (RE-bw) in Eggplant.** *Plant Mol Biol Rep* 2014, online first.
433. Xi'ou X, Bihao C, Guannan L, Jianjun L, Qinghua C, Jin J, Yujing C: **Functional Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (RE-bw) in Eggplant.** *Plant Mol Biol Rep* 2014:1-16.
434. Torres MA: **ROS in biotic interactions.** *Physiologia Plantarum* 2010, **138**(4):414-429.
435. N'Guessan AC, Koné D, Wicker E: **Etude de la structure des populations ivoiriennes de *Ralstonia solanacearum* par analyse multilocus VNTR (MLVA).** In: *10èmes Rencontres Plantes-Bactéries: 2012; Aussois, France.* IRD/SFP/INRA/CIRAD: 8.
436. Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA *et al*: **Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology.** *Molecular plant pathology* 2012, **13**(6):614-629.
437. Gassmann W, Dahlbeck D, Chesnokova O, Minsavage GV, Jones JB, Staskawicz BJ: **Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.** *Journal of bacteriology* 2000, **182**(24):7053-7059.
438. Schürch S, Linde CC, Knogge W, Jackson LF, McDonald BA: **Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene NIP1.** *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2004, **17**(10):1114-1125.
439. Dunn AR, Bruening SR, Grünwald NJ, Smart CD: **Evolution of an Experimental Population of *Phytophthora capsici* in the Field.** *Phytopathology* 2014, **104**(10):1107-1117.
440. Falush D, Bowden R: **Genome-wide association mapping in bacteria?** *Trends in microbiology* 2006, **14**(8):353-355.
441. Grover A, Azmi W, Gadewar AV, Pattanayak D, Naik PS, Shekhawat GS, Chakrabarti SK: **Genotypic diversity in a localized population of *Ralstonia solanacearum* as revealed by random amplified polymorphic DNA markers.** *Journal of Applied Microbiology* 2006, **101**(4):798-806.
442. Ramsubhag A, Lawrence D, Cassie D, Fraser R, Umaharan P, Prior P, Wicker E: **Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies.** *Plant pathology* 2012, **61**(5):844-857.
443. Li Z, Wu S, Bai X, Liu Y, Lu J, Liu Y, Xiao B, Lu X, Fan L: **Genome sequence of the tobacco bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*.** *Journal of Bacteriology* 2011, **193**(21):6088-6089.
444. Hunter PR, Gaston MA: **Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity.** *Journal of clinical microbiology* 1988, **26**(11):2465-2466.
445. Mantel N: **The detection of disease clustering and a generalized regression approach.** *Cancer Res* 1967, **27**(2 Part 1):209-220.
446. Nei M: **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.** *Genetics* 1978, **89**(3):583-590.
447. Leduc A, Traoré Y, Boyer K, Magne M, Grygiel P, Juhasz C, Boyer C, Guerin F, Wonni I, Ouedraogo L: **Bridgehead invasion of a monomorphic plant pathogenic bacterium: *Xanthomonas citri* pv. *citri*, an emerging citrus pathogen in Mali and Burkina Faso.** *Environmental microbiology* 2015.
448. Deberdt P, Goze E, Coranson-Beaudu R, Perrin B, Fernandes P, Lucas P, Ratnadass A: ***Crotalaria spectabilis* and *Raphanus sativus* as previous crops show promise for the control**

- of bacterial wilt of tomato without reducing bacterial populations. *Journal of Phytopathology* 2015, **163**(5):377-385.**
449. Ano G, Hebert Y, Prior P, Messiaen CM: **A New Source of Resistance to Bacterial Wilt of Eggplants Obtained from a Cross - Solanum-Aethiopicum L X Solanum-Melongena L.** *Agronomie* 1991, **11**(7):555-560.
450. Ano G, Anais G, Chidiac A: **Creation and use of disease-resistant varieties in Guadeloupe [France]. - Creation de varietes resistantes aux maladies en Guadeloupe [France]. Elements indispensables de diversification agricole.** *Phytoma* 2002 36-37.
451. Ait Tayeb L, Lefevre M, Passet V, Diancourt L, Brisse S, Grimont PAD: **Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences.** *Research in Microbiology* 2008, **159**:169-177.
452. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ: **[22] Using CLUSTAL for multiple sequence alignments.** *Methods in enzymology* 1996, **266**:383-402.
453. Pensec F: **Exploration des facteurs génétiques liés à la spécificité de virulence de Ralstonia solanacearum sur aubergine et tomate.** Cirad, Pôle de protection des plantes: Institut National d'Horticulture et du paysage; 2010.
454. Yang X, Liu D, Liu F, Wu J, Zou J, Xiao X, Zhao F, Zhu B: **HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data.** *BMC bioinformatics* 2013, **14**(1):33.
455. Vallenet D, Belda E, Calteau A, Cruveiller S, Engelen S, Lajus A, Le Fèvre F, Longin C, Mornico D, Roche D: **MicroScope—an integrated microbial resource for the curation and comparative analysis of genomic and metabolic data.** *Nucleic acids research* 2013, **41**(D1):D636-D647.
456. R DCT: **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010.
457. Mukaihara T, Tamura N, Iwabuchi M: **Genome-Wide Identification of a Large Repertoire of Ralstonia solanacearum Type III Effector Proteins by a New Functional Screen.** *Molecular plant-microbe interactions* 2010, **23**(3):251-262.
458. Guidot A, Elbaz M, Carrère S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C: **Specific Genes from the Potato Brown Rot Strains of Ralstonia solanacearum and Their Potential Use for Strain Detection.** *Phytopathology* 2009, **99**(9):1105-1112.
459. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Molecular Biology Evolution* 1987, **4**:406-425.
460. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P: **RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination.** *Bioinformatics* 2010, **26**(19):2462-2463.
461. Wroblewski T, Caldwell KS, Piskurewicz U, Cavanaugh KA, Xu H, Kozik A, Ochoa O, McHale LK, Lahre K, Jelenska J *et al*: **Comparative large-scale analysis of interactions between several crop species and the effector repertoires from multiple pathovars of Pseudomonas and Ralstonia.** *many ref* 2009, **150**(4):1733-1749.
462. Hajri A, Pothier JF, Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Poussier S, Boureau T, Duffy B, Manceau C: **Type three effector genes distribution and sequence analysis provides new insights into pathogenicity of plant pathogenic Xanthomonas arboricola.** *Applied and environmental microbiology* 2011:AEM. 06119-06111.
463. Montarry J, Glais I, Corbiere R, Andrivon D: **Adaptation to the most abundant host genotype in an agricultural plant–pathogen system–potato late blight.** *Journal of evolutionary biology* 2008, **21**(5):1397-1407.
464. Flier W, Kroon L, Hermansen A, Van Raaij H, Speiser B, Tamm L, Fuchs J, Lambion J, Razzaghian J, Andrivon D: **Genetic structure and pathogenicity of populations of Phytophthora infestans from organic potato crops in France, Norway, Switzerland and the United Kingdom.** *Plant Pathology* 2007, **56**(4):562-572.
465. Fitzpatrick BM, Fordyce J, Gavrilets S: **What, if anything, is sympatric speciation?** *Journal of evolutionary biology* 2008, **21**(6):1452-1459.

466. Morand S: **Life-history traits in parasitic nematodes: a comparative approach for the search of invariants.** *Functional Ecology* 1996:210-218.
467. Burchhardt KM, Cubeta MA: **Population Structure of the Blueberry Pathogen *Monilinia vaccinii-corymbosi* in the United States.** *Phytopathology* 2015.
468. Kamvar Z, Larsen M, Kanaskie A, Hansen E, Grünwald N: **Spatial and temporal analysis of populations of the sudden oak death pathogen in Oregon forests.** *Phytopathology* 2015, **105**(7):982-989.
469. Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW: **An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*.** *Nature* 2007, **445**(7130):915-918.
470. Cornuet J-M, Santos F, Beaumont MA, Robert CP, Marin J-M, Balding DJ, Guillemaud T, Estoup A: **Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation.** *Bioinformatics* 2008, **24**(23):2713-2719.
471. Cornuet J-M, Ravigné V, Estoup A: **Inference on population history and model checking using DNA sequence and microsatellite data with the software DIYABC (v1. 0).** *Bmc Bioinformatics* 2010, **11**(1):401.
472. Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ, Shi BC, Wang S, Zhang F, Guo XJ, Wang YM, Chen XX: **Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range.** *Molecular ecology* 2015, **24**(16):4094-4111.
473. Clain C, Da Silva D, Fock I, Vaniet S, Carmeille A, Gousset C, Sihachakr D, Luisetti J, Kodja H, Besse P: **RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw.(Solanaceae) accessions from Reunion Island.** *Plant science* 2004, **166**(6):1533-1540.
474. Gousset C, Collonnier C, Mulya K, Mariska I, Rotino GL, Besse P, Servaes A, Sihachakr D: ***Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.).** *Plant Science* 2005, **168**(2):319-327.
475. Aribaud M, Noirot M, Fock-Bastide I, Vaniet S, Kodja H: **Comparison between *Solanum torvum* Sw. and *S. melongena* L. after *Ralstonia solanacearum* inoculation.** *Plant Biol (Stuttg)* 2014.
476. Eynck C, Koopmann B, Karlovsky P, Von Tiedemann A: **Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*.** *Phytopathology* 2009, **99**(7):802-811.
477. Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita RN, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S: **Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L.** *PLoS one* 2013, **8**(1):e54745.
478. Young K: **Yeast two-hybrid: so many interactions,(in) so little time.** *Biology of reproduction* 1998, **58**(2):302-311.
479. Kerppola TK: **Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation.** *Nature reviews Molecular cell biology* 2006, **7**(6):449-456.
480. Elena SF, Lenski RE: **Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation.** *Nature Reviews Genetics* 2003, **4**(6):457-469.
481. Marshall DR: **Modeling the effects of multiline varieties on the population genetics of plant pathogens.** *Plant disease epidemiology* 1989, **2**:284-317.
482. Lannou C, Mundt C: **Evolution of a pathogen population in host mixtures: rate of emergence of complex races.** *Theoretical and applied genetics* 1997, **94**(8):991-999.

ANNEXES

ANNEXES 1

Additional file 1. List of *Rubstonia solanacearum* strains analyzed in this study and their allelic profile (n=543). The list contain the geographic origin of the strain, the name of the host, the habitat (rhizosphere, stem of soil) and the year of extraction.

Collection	RUN ID	Strain ID*	Phylotype	Host	Cultivar	Habitat	Location	Country	Year	Haplotype	ST eq/ST muts*	Allelic profile							
												CMmp0131	GMcb0754	CMmp0233	GMcb0133	GMcb3461	CMmp0985	GMmp0266	Ymp0875
Pirague 2007	RUN0715	07-043 C19	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0717	07-043 C22	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0718	07-043 C1	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0720	07-043 C17	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0724	07-043 C12	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H002	NA	3	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0731	07-039 2	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0735	07-043 C33	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H001	ST60/ST22	3	12	6	4	7	16	10	15
Pirague 2007	RUN0737	07-043 C31	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0738	07-043 C32	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0740	07-043 C30	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0749	07-043 C36	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0751	07-049 RS17	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0752	07-049 RS7	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0753	07-043 C35	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H003	NA	3	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0757	07-043 C5	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H003	NA	3	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0758	07-043 C3	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0778	07-043 C8	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0783	07-049 RS35	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0792	07-049 RS24	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0793	07-049 RS38	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0798	07-049 RS14	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0800	07-049 RS15	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0803	07-049 RS12	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0804	07-049 RS16	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0805	07-049 RS11	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0807	07-049 RS27	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0814	07-043 C23	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0820	07-043 C6	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0822	07-043 C27	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0826	07-049 RS3	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	NA	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0829	07-043 C34	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H004	ST60/ST22	4	12	6	4	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0830	07-043 C40	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0834	07-049 RS25	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	NA	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0835	07-049 RS39	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0837	07-049 RS4	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0838	07-049 RS37	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN0839	07-049 RS40	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Pirague 2007	RUN1065	07-043-C13	I	<i>Musa acuminata</i> fallow	Cavendish	Soil	Le Lorrain	Martinique	2007	H005	ST60/ST22	4	12	6	5	7	15	10	15
Vallon 1999		JVI043	I	<i>Capsicum annuum</i>	Vidi FI	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H012	NA	6	5	6	0	2	17	11	15
Vallon 1999		JVI045	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Roma	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H013	NA	7	5	6	0	2	17	11	15
Vallon 1999		JVI046	I	<i>Capsicum annuum</i>	Vidi FI	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H010	NA	6	5	6	0	2	18	11	15
Vallon 1999		JVI047	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Macao	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H010	NA	6	5	6	0	2	18	11	15
Vallon 1999		JVI049	I	<i>Solanum malongena</i>	Bonica	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H012	NA	6	5	6	0	2	17	11	15
Vallon 1999		JVI053	I	<i>Solanum malongena</i>	Black Beauty	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H010	NA	6	5	6	0	2	18	11	15
Vallon 1999		JVI054	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Situs	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H013	NA	7	5	6	0	2	17	11	15
Vallon 1999		JVI058	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Roma	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H012	NA	6	5	6	0	2	17	11	15
Vallon 1999		JVI060	I	<i>Petargonium graveolens</i>	Rosa	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H007	NA	6	5	6	0	2	17	9	15
Vallon 1999		JVI061	I	<i>Solanum malongena</i>	Bonica	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H010	ST43/ST22	6	5	6	0	2	18	11	15
Vallon 1999		JVI062	I	<i>Solanum malongena</i>	Bonica	Stem	Le Vallon	Reunion Island	1999	H010	ST43/ST22	6	5	6	0	2	18	11	15

Vallon 2012	TR22.12	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H056	NA	7	5	6	1	2	18	11	15
Vallon 2012	TR22.13	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H054	NA	7	5	6	1	2	18	11	11
Vallon 2012	TR22.14	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H056	NA	7	5	6	1	2	18	11	15
Vallon 2012	TR22.15	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H054	NA	7	5	6	1	2	18	11	11
Vallon 2012	TR22.16	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H052	NA	7	5	6	0	2	18	11	11
Vallon 2012	TR22.18	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H054	NA	7	5	6	1	2	18	11	11
Vallon 2012	TR22.19	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H056	NA	7	5	6	1	2	18	11	15
Vallon 2012	TR22.20	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	Stem	Le Vallon	Reunion Island	2012	H054	NA	7	5	6	1	2	18	11	11

a : Strains are named depending of the zone of origin (R = Rhizosphere; T = Stem; S = Soil), their sampling point on the field and the number of the strains from the sampling point

b : Strains used for preliminary screening for amplificability, reproductibility and for polymorphisme of the VNTR loci detected by in silico screening

c : ST = Sequence Type

Additional file 2. *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia* spp. strains used in this study and referred as worldwide collection (n=58). *R. solanacearum* strains selected are representative of the main clonal complex and haplotype using the first MLVA scheme developed by N'Guessan *et al.* [20].

RUN Number ^{a,b}	Strain ID	Species	Phylogroup	Clade	Sequenc ^c	Location	Country	Host	Year of isolation	CC ^d	Haplotype ^d
0044 ^{ab}	ACH92	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	16	Queensland (Nambour)	Australia	<i>Zingiber officinale</i>	1966	I-S	H057
0054 ^{ab}	GMI1000	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	18	Kourou	French Guiana	<i>Solanum lycopersicum</i>	1978	I-S	H060
0100 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	31	Mombassa	Kenya	<i>Capsicum annuum</i>	1974	I-CC06	H027
0104 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	31	Transvaal	South Africa	<i>Solanum lycopersicum</i>	1986	I-CC06	H079
0119 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	13	Obala	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	I-CC02	H015
0139 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Obala	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	I-CC03	H020
0155 ^a	PSS366	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	15	Yulin (West)	Taiwan	<i>Solanum lycopersicum</i>	2003	I-CC05	H087
0157 ^{ab}	PSS004	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	15	Tainan (South West)	Taiwan	<i>Solanum lycopersicum</i>	1988	?	H089
0159 ^a	PSS358	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	15	Yulin (West)	Taiwan	<i>Solanum lycopersicum</i>	2003	I-CC05	H090
0205 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Yaounde	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	I-CC03	H020
0215 ^{ab}	CFBP7058	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	13	Bafia	Cameroon	<i>Solanum scabrum</i>	2005	I-CC02	H095
0337 ^{ab}	P11	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	17	Nanning, Guangxi province	China	<i>Arachis hypogaea</i>	NA	I-CC02	H106
0993 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Petoseed/Hygrotech BW field trial site	South Africa	<i>Solanum lycopersicum</i>	1998	I-CC04	H133
1041 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Transvaal Lowveld	South Africa	<i>Solanum lycopersicum</i>	1997	I-CC04	H134
1051 ^{ab}		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Transvaal Lowveld	South Africa	<i>Solanum lycopersicum</i>	1997	I-CC04	H011
1528 ^{ab}	UW568	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Monjas, Jalapa	Guatemala	<i>Solanum lycopersicum</i>	2004	I-S	H142
1531 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND (31 mlva)	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC06	H021
1533 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	46	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC07	H032
1535 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC08	H039
1537 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND (31 mlva)	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC06	H033
1538 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC08	H146
1539 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	31	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC06	H021
1540 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC07	H147
1739 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	18	Bonoufla	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC11	H030
1747 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	46	Sinfra	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC10	H151
1767 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND (14 mlva)	Songon	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC01	H161
1773 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	ND	Souandala	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2010	I-CC11	H165
1821 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Man	Ivory Coast	<i>Solanum melongena</i>	2010	I-CC01	H042
1878 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	46	Pakobo (Tiassalé)	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC10	H035
1891 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	18	Sinfra	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC11	H029
1901 ^{ab}		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	18	Sinfra	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC11	H031
1908 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Yamousoukro-Zatta	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC09	H040
1909 ^a		<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Yamousoukro-Zatta	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC09	H187

1910 ^a	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	14	Yamoussoukro-Zatta	Ivory Coast	<i>Solanum lycopersicum</i>	2011	I-CC09	H040
1955 ^a	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	18	Montsinéry	French Guiana	<i>Capsicum annuum</i>	2011		
1985 ^a	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	1	Javouhey	French Guiana	<i>Solanum melongena</i>	2011		
36	<i>Ralstonia solanacearum</i>	I	1	46	Kollo	Niger	<i>Solanum tuberosum</i>	2009	I-CC10	H038
65	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIA	2	36	Case Pilote	Martinique	<i>Solanum lycopersicum</i>	1987	II-S	H051
454	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIA	3	7	Raleigh, North Carolina	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>	1953	II-S	H066
1526	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIA	2	6		Venezuela	<i>Banana Plantain</i>	1960	II-CC02	H120
1527	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIA	3	7	Alabama	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>	1987	II-CC05	H140
17	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIA	3	7	Quincy, Florida	USA	<i>Solanum lycopersicum</i>	NA	II-S	H141
449	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIIB	4	4NPB	Morne Rouge	Martinique	<i>Heliconia caribea</i>	2002	II-CC03	H047
586	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIIB	5	1	Naivasha	Kenya	<i>Pelargonium asperum</i>	2003	II-CC04	H001
39	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IIIB	4	4	Nauta	Peru	<i>Banana Plantain</i>	1967	II-CC03	H131
133	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	23	Vallée du Kou	Burkina Faso	<i>Solanum melongena</i>	1990	III-S	H052
365	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	29	Obala	Cameroon	<i>Solanum lycopersicum</i>	2005	III-S	H082
71	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	42		Guinea	<i>Solanum tuberosum</i>	NA	III-CC02	H111
83	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	42	Lafou	Guinea	<i>Solanum tuberosum</i>	2008	III-CC03	H196
88	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	43	Ballayara	Niger	<i>Solanum tuberosum</i>	2009	III-CC01	H008
1360	<i>Ralstonia solanacearum</i>	III	6	43	Alkama	Niger	<i>Solanum tuberosum</i>	2009	III-CC01	H203
1367	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IV	7	8		Japan	<i>Syzygium aromaticum</i>	NA	IV-CC01	H068
1368	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IV	7	10		Indonesia	<i>Solanum tuberosum</i>	1998	IV-CC01	H064
1369	<i>Ralstonia solanacearum</i>	IV	9	8	Sumatra West	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	1990		
1367	<i>Ralstonia insidiosa</i>	IV	8	9	Sumatra West	Indonesia	<i>Syzygium aromaticum</i>	1990	IV-CC02	H138
1368	<i>Ralstonia mammitolytica</i>				St Thomas's Hospital, London	England	<i>Homo sapiens</i>	1971		
1369	<i>Ralstonia pickettii</i>					England	<i>Homo sapiens</i>	1974		

a: Strains used to assess the reproducibility of the amplification of the marker detected.

b: Strains used for preliminary screening for amplifiability, reproductibility and for polymorphism of the VNTR loci detected by *in silico* screening

c: ND = Not Determined, NPB = Not Pathogen on Banana.

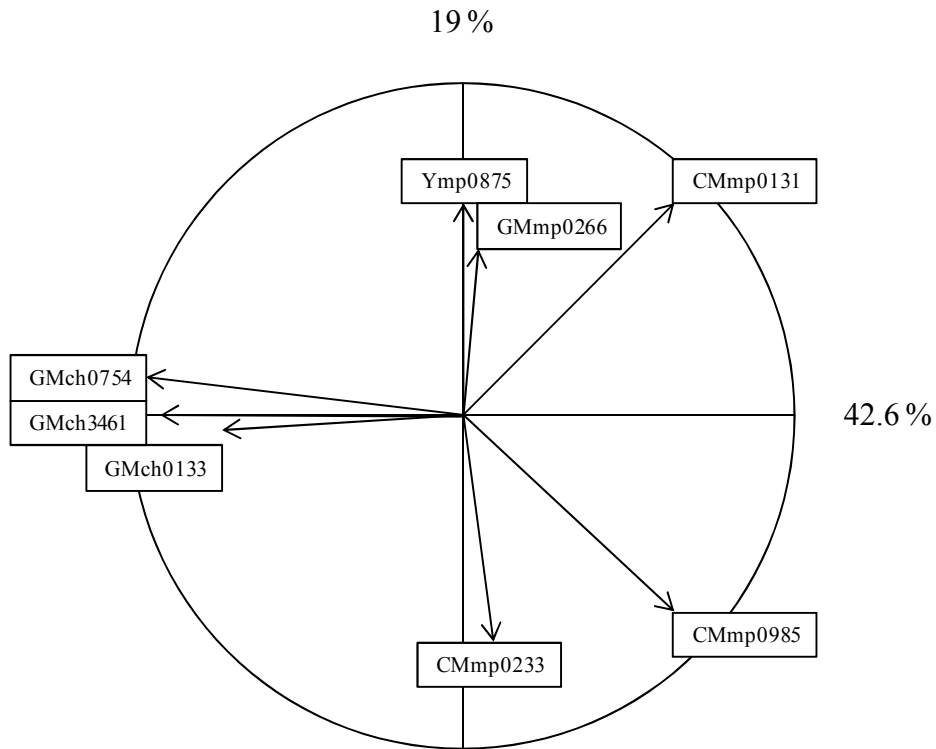
d: The strains selected are representative of the main Clonal Complex (CC) and haplotypes determined in [20]. Clonal complexes were named after their phylogroup (I to IV) followed by CC (clonal complexes) or S (for singleton).

Additional file 3. Summary statistics of the eight VNTR in the different collections of *R. solanacearum* phylotype I.

Locus	Collection	N	Na	I	H.u.b
GMmp0266	Pirogue 2007 (Martinique)	38	1	0,000	0,000
	Vallon 1999	96	3	0,531	0,301
	Vallon 2009	90	3	0,930	0,554
	Vallon 2012	319	10	1,198	0,612
	Worldwide	37	9	1,853	0,819
	All	580	13	0,894	0,469
CMmp0131	Pirogue 2007 (Martinique)	38	2	0,336	0,193
	Vallon 1999	96	2	0,451	0,281
	Vallon 2009	90	2	0,468	0,296
	Vallon 2012	319	4	0,734	0,500
	Worldwide	37	9	1,951	0,862
	All	580	10	0,740	0,427
CMmp0985 (RS3L20)	Pirogue 2007 (Martinique)	38	2	0,122	0,053
	Vallon 1999	96	2	0,287	0,154
	Vallon 2009	90	2	0,451	0,281
	Vallon 2012	319	2	0,676	0,484
	Worldwide	37	14	2,303	0,892
	All	580	14	0,735	0,393
GMch0133	Pirogue 2007 (Martinique)	38	2	0,658	0,478
	Vallon 1999	96	2	0,058	0,021
	Vallon 2009	90	1	0,000	0,000
	Vallon 2012	319	9	0,797	0,436
	Worldwide	37	6	1,559	0,760
	All	580	13	0,598	0,344
GMch0754	Pirogue 2007 (Martinique)	38	1	0,000	0,000
	Vallon 1999	96	2	0,058	0,021
	Vallon 2009	90	1	0,000	0,000
	Vallon 2012	319	2	0,021	0,006
	Worldwide	37	11	2,142	0,884
	All	580	12	0,320	0,131
Ymp0875	Pirogue 2007 (Martinique)	38	1	0,000	0,000
	Vallon 1999	96	1	0,000	0,000
	Vallon 2009	90	1	0,000	0,000
	Vallon 2012	319	7	1,027	0,572
	Worldwide	37	1	0,000	0,000
	All	580	7	0,212	0,112
GMch3461	Pirogue 2007 (Martinique)	38	1	0,000	0,000
	Vallon 1999	96	1	0,000	0,000
	Vallon 2009	90	2	0,107	0,044
	Vallon 2012	319	2	0,067	0,025
	Worldwide	37	3	0,487	0,249
	All	580	4	0,094	0,045
CMmp0233	Pirogue 2007 (Martinique)	38	1	0,000	0,000
	Vallon 1999	96	1	0,000	0,000
	Vallon 2009	90	1	0,000	0,000
	Vallon 2012	319	4	0,080	0,025
	Worldwide	37	2	0,451	0,286
	All	580	5	0,076	0,044

Na = Number of different alleles; I = Shannon's information index; H.u.b = Nei's unbiased diversity index; N = number of strains. All statistics were calculated with GenAlex vs.6.5.

Additional file 4. Correlation circle from Principal Component Analysis (PCA) on the field collection of strains (n=543). Numbers represent the percentage of axis taking part of the total inertia. Figure obtained using “s.corcircle” function in “ade4” packaged implemented in the R software [75].



Additional file 5. Sequence typing (ST) on the endoglucanase (*egl*) gene and on the methyl-directed DNA mismatch repair gene (*mutS*). ST were determined on field populations from Martinique (“Pirogue” collection) and Reunion Island (“Vallon” collections) (n = 46).

Collection	Host	Number of strains	<i>egl</i> ST	<i>mutS</i> ST	Number of MLVA
Pirogue (Martinique)	Soil, <i>Musa</i> fallow	10	ST60	ST022	3
Vallon 1999	<i>Solanaceae</i> , <i>Geraniaceae</i>	16	ST43	ST022	3
Vallon 2009	<i>Solanaceae</i>	10	ST43	ST022	6
Vallon 2012	<i>Solanum lycopersicum</i>	10	ST43	ST022	8

Additional file 6. Hunter-Gaston Discriminatory Index (HGDI) score calculated on MLVA-13, MLVA-8, *egl*-based and *mutS*-based sequence typing (ST).

A. Comparison of discriminatory power of MLVA-8, MLVA-13, *egl*-ST and *mutS*-ST on 27 worldwide and sequenced strains.

Typing technique	Number of haplotypes	HGDI
MLVA-8	26	1
MLVA-13	24	0.99
<i>egl</i> -ST	11	0.909
<i>mutS</i> -ST	9	0.769

B. Comparison discriminatory power of MLVA-8 with *egl*-ST and *mutS*-ST on 46 strains from field wide collections.

Typing technique	Pirogue 2007 (Martinique)	Vallon 1999	Vallon 2009	Vallon 2012	Global collection		HGDI
					Number of strains	Number of haplotypes	
MLVA-8	0.377	0.508	0.844	0.956	46	17	0.844
<i>egl</i> -ST	0	0	0	0	46	2	0.332
<i>mutS</i> -ST	0	0	0	0	46	1	0

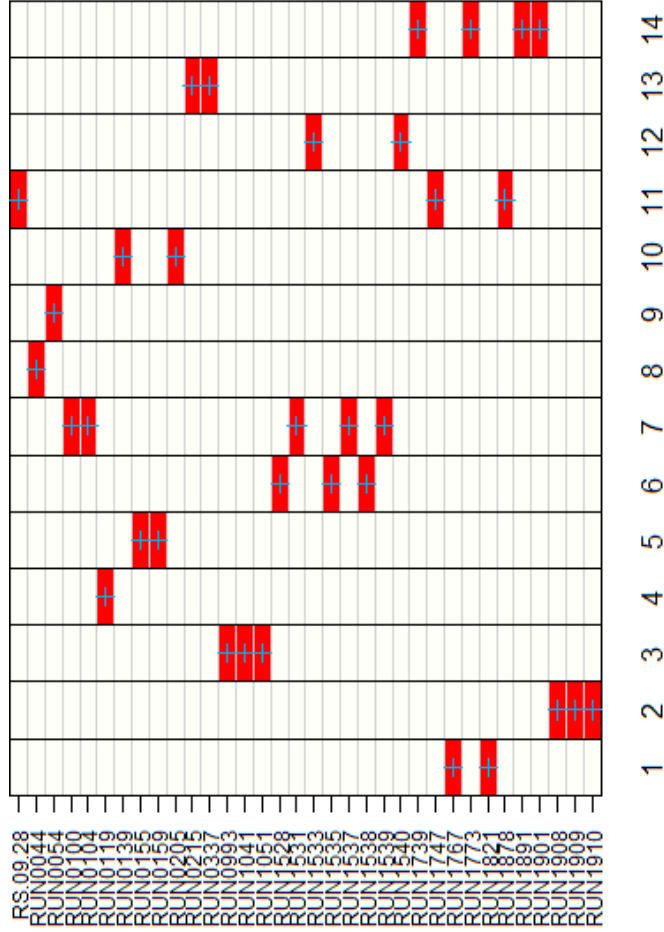
Additional file 7. List of the different haplotypes detected in this study. Allelic profiles, repartition in the different field collections and specificity or not of each haplotypes are detailed below.

Haplotype	Allelic profiles											Total	Specificity		
	CMmp0131	GMch0754	CMmp0233	GMch0133	GMch3461	CMmp0985	GMmp0266	Ymp0875	Pirogue 2007	Vallon 1999	Vallon 2009			Vallon 2012	Worldwide
H001	3	12	6	4	7	16	10	15	1					1	Pirogue 2007
H002	3	12	6	5	7	15	10	15	1					1	Pirogue 2007
H003	3	12	6	4	7	15	10	15	2					2	Pirogue 2007
H004	4	12	6	4	7	15	10	15	11					11	Pirogue 2007
H005	4	12	6	5	7	15	10	15	23					23	Pirogue 2007
H006	6	4	6	7	2	18	11	15		1				1	Vallon 1999
H007	7	5	6	0	2	17	9	15		1				1	Vallon 1999
H008	7	5	6	0	2	18	11	15		61	14	19		94	
H009	7	5	6	0	2	18	9	15		1	53	5		59	
H010	6	5	6	0	2	18	11	15		10		1		11	
H011	7	5	6	0	2	18	12	15		15	6			21	
H012	6	5	6	0	2	17	11	15		5				5	Vallon 1999
H013	7	5	6	0	2	17	11	15		2				2	Vallon 1999
H014	6	5	6	0	2	19	12	15			14	15		29	
H015	6	5	6	0	2	18	9	15		1				1	Vallon 2009
H016	6	5	6	0	3	19	12	15		1				1	Vallon 2009
H017	7	5	6	0	3	18	9	15		1				1	Vallon 2009
H018	7	5	6	2	2	18	11	15				1		2	
H019	5	4	9	7	2	19	12	15					1	1	
H020	5	5	6	6	2	18	7	15						1	Vallon 2012
H021	6	5	2	1	2	19	12	12						1	Vallon 2012
H022	6	5	5	9	2	19	12	11						1	Vallon 2012
H023	6	5	6	0	2	19	11	7						1	Vallon 2012
H024	6	5	6	0	3	19	2	12						1	Vallon 2012
H025	6	5	6	1	2	18	11	11						1	Vallon 2012
H026	6	5	6	1	2	18	11	15						1	Vallon 2012
H027	6	5	6	1	2	19	3	12						1	Vallon 2012
H028	6	5	6	1	2	19	7	12						1	Vallon 2012
H029	6	5	6	1	2	19	8	11						1	Vallon 2012
H030	6	5	6	1	3	19	2	7						1	Vallon 2012
H031	6	5	6	2	2	19	12	11						1	Vallon 2012
H032	6	5	6	5	3	19	21	17						1	Vallon 2012
H033	6	5	6	9	2	19	21	11						1	Vallon 2012
H034	7	5	6	10	2	18	11	15						1	Vallon 2012
H035	7	5	6	1	2	18	10	2						1	Vallon 2012
H036	7	5	6	1	2	18	7	15						1	Vallon 2012
H037	7	5	6	2	2	18	11	11						1	Vallon 2012
H038	7	5	6	4	3	18	5	10						1	Vallon 2012
H039	7	5	6	6	2	18	11	15						1	Vallon 2012
H040	7	5	9	1	2	18	11	15						1	Vallon 2012
H041	9	5	6	1	2	18	11	15						1	Vallon 2012
H042	6	5	6	5	2	18	11	15						2	Vallon 2012
H043	6	5	6	1	2	19	12	11						3	Vallon 2012
H044	6	5	6	1	2	19	2	11						4	Vallon 2012

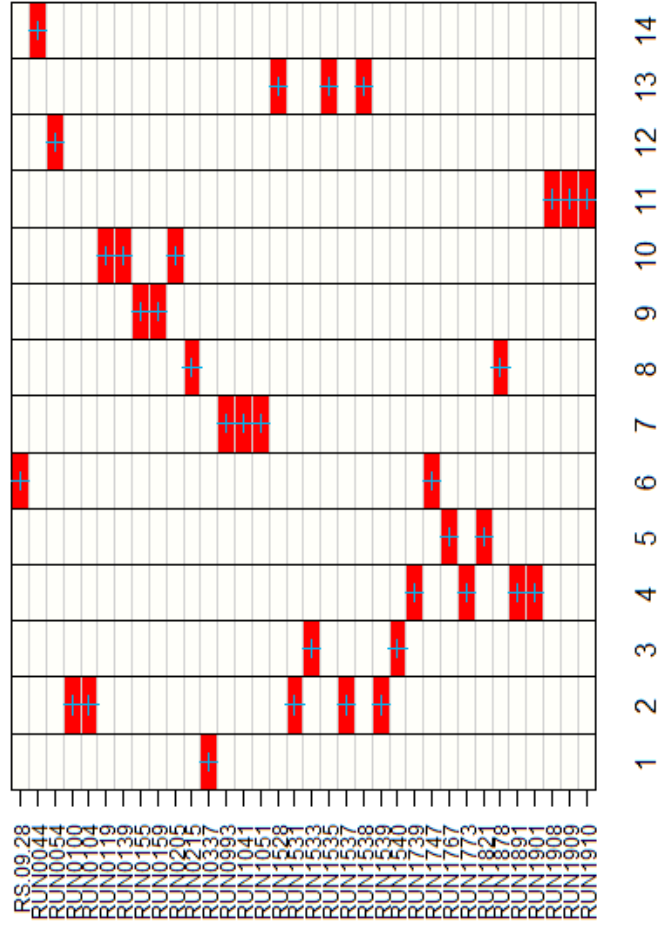
H045	7	5	6	1	2	18	9	15	7	Vallon 2012
H046	6	5	6	0	2	19	2	12	1	Vallon 2012
H047	6	5	6	0	2	19	12	11	2	Vallon 2012
H048	6	5	6	0	2	19	2	15	8	Vallon 2012
H049	6	5	6	1	2	19	2	12	9	Vallon 2012
H050	6	5	6	1	2	19	2	15	10	Vallon 2012
H051	6	5	6	0	2	19	12	12	11	Vallon 2012
H052	7	5	6	0	2	18	11	11	16	Vallon 2012
H053	6	5	6	1	2	19	12	12	23	Vallon 2012
H054	7	5	6	1	2	18	11	11	47	Vallon 2012
H055	6	5	6	1	2	19	12	15	32	Vallon 2012
H056	7	5	6	1	2	18	11	15	80	Vallon 2012
H057	-1	4	6	1	2	23	5	15	1	Worldwide
H058	10	15	6	4	2	18	7	15	1	Worldwide
H059	10	15	6	4	2	19	6	15	1	Worldwide
H060	10	15	6	4	2	19	7	15	1	Worldwide
H061	10	5	7	2	2	28	6	15	1	Worldwide
H062	10	8	6	1	2	5	6	15	1	Worldwide
H063	10	8	6	2	2	5	6	15	1	Worldwide
H064	11	4	6	2	2	23	5	15	1	Worldwide
H065	11	5	7	8	2	17	3	15	1	Worldwide
H066	11	5	7	8	2	17	6	15	1	Worldwide
H067	12	9	6	1	2	16	6	15	1	Worldwide
H068	12	9	6	2	2	16	6	15	1	Worldwide
H069	13	14	6	2	2	19	7	15	1	Worldwide
H070	3	14	6	5	7	15	10	15	1	Worldwide
H071	3	14	6	7	6	14	5	15	1	Worldwide
H072	3	16	6	5	7	15	10	15	1	Worldwide
H073	4	-1	6	2	2	14	7	15	1	Worldwide
H074	5	7	-1	8	2	18	6	15	1	Worldwide
H075	7	-1	6	2	2	18	11	15	1	Worldwide
H076	7	18	6	2	2	14	5	15	1	Worldwide
H077	7	3	6	1	2	14	6	15	1	Worldwide
H078	7	3	6	2	2	14	6	15	1	Worldwide
H079	7	6	6	1	2	18	12	15	1	Worldwide
H080	7	9	6	2	2	14	6	15	1	Worldwide
H081	9	-1	7	2	2	27	6	15	1	Worldwide
H082	9	4	6	2	2	25	5	15	1	Worldwide
H083	9	5	7	1	2	29	6	15	1	Worldwide
H084	9	5	7	2	2	26	-1	15	1	Worldwide
H085	9	8	6	2	2	14	5	15	1	Worldwide
H086	9	9	6	1	2	12	4	15	1	Worldwide
H087	11	14	6	4	2	19	7	15	2	Worldwide
H088	3	14	6	7	6	14	9	15	2	Worldwide
H089	7	5	6	2	2	18	12	15	2	Worldwide
Total						38	96	319	37	580

Additional file 8. Assignment plots on the worldwide collection (n=34) genotyped with MLVA-13 (A) and MLVA-8 (B). This figure indicated the posterior probability of assignment of each individual to one or several DAPC clusters. Blue crosses represent the prior cluster provided to DAPC. From these figures, each isolate of the dataset is assigned to a single cluster with both typing data. Figures obtained using the “assignplot” function in “adegenet” package implemented in the R software [75].

A. MLVA-13 data (14 clusters inferred)

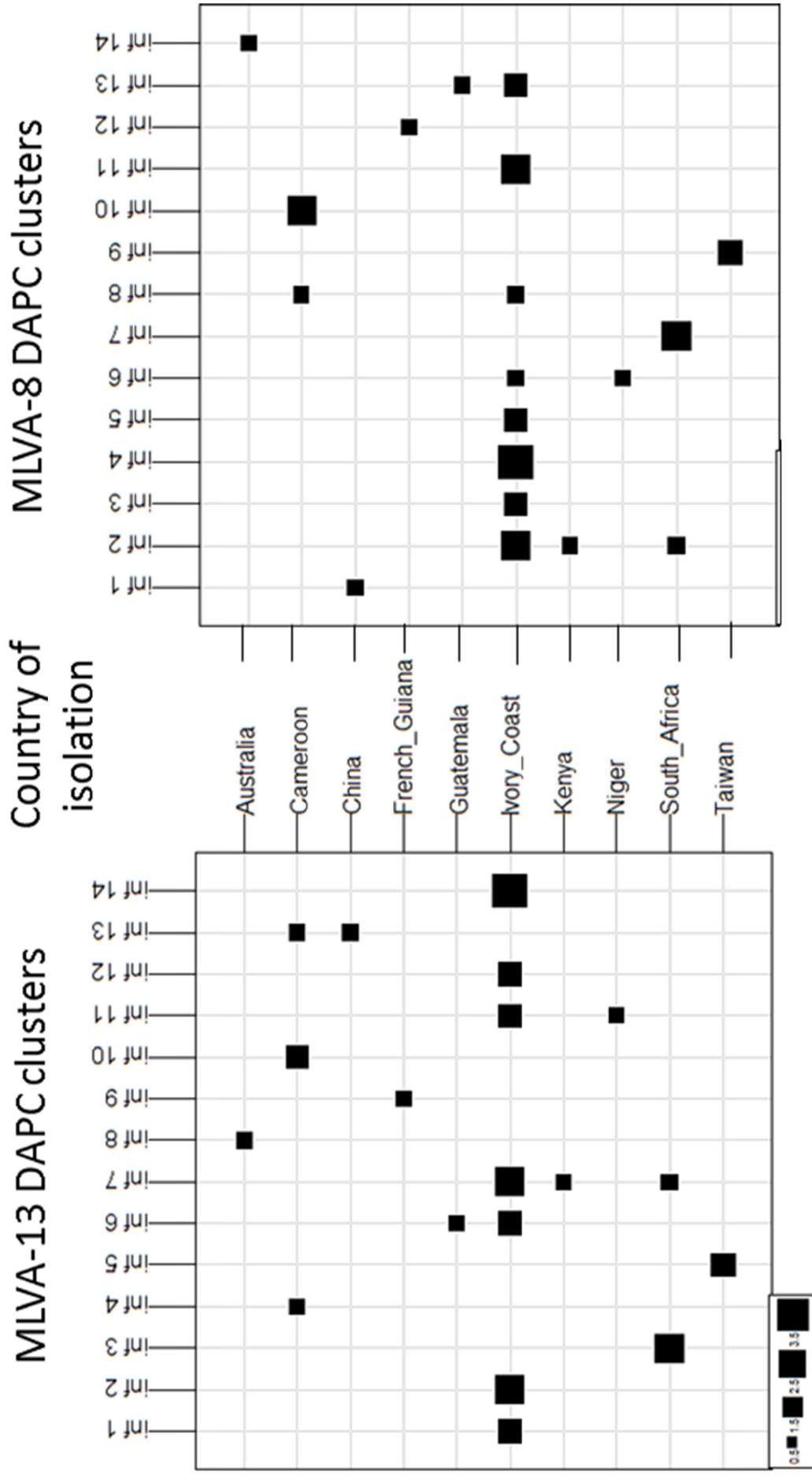


B. MLVA-8 data (14 clusters inferred)



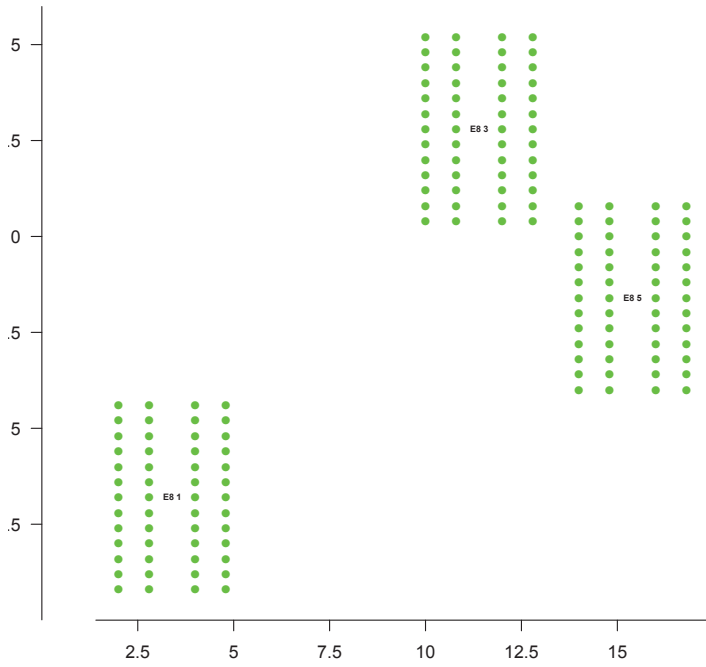
Clusters number

Additional file 9. Correspondence between countries of isolation of the worldwide collection (n=34) and the DAPC clusters. Figures obtained on MLVA-13 data (left) and MLVA-8 data (right), as presented by “table.value” function in “adegenet” package implemented in the R software [75]. “inf” = inferred from DAPC function.

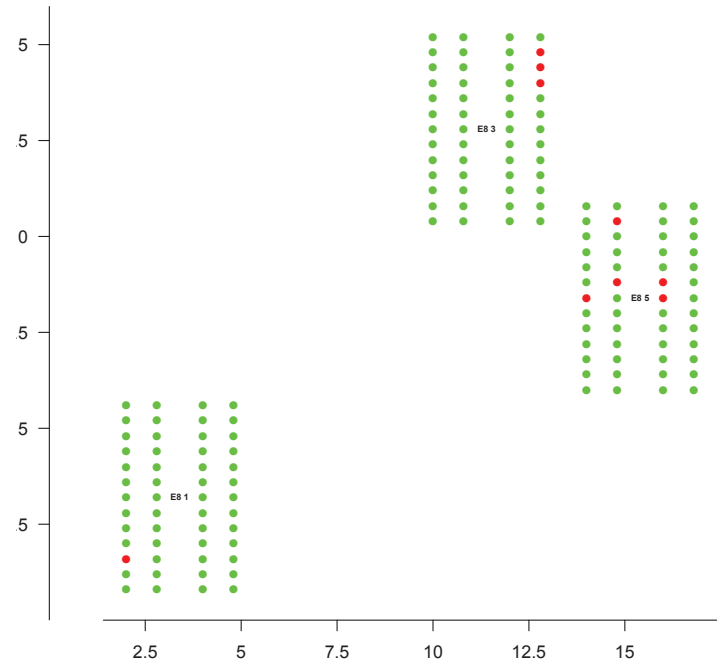


ANNEXES 2

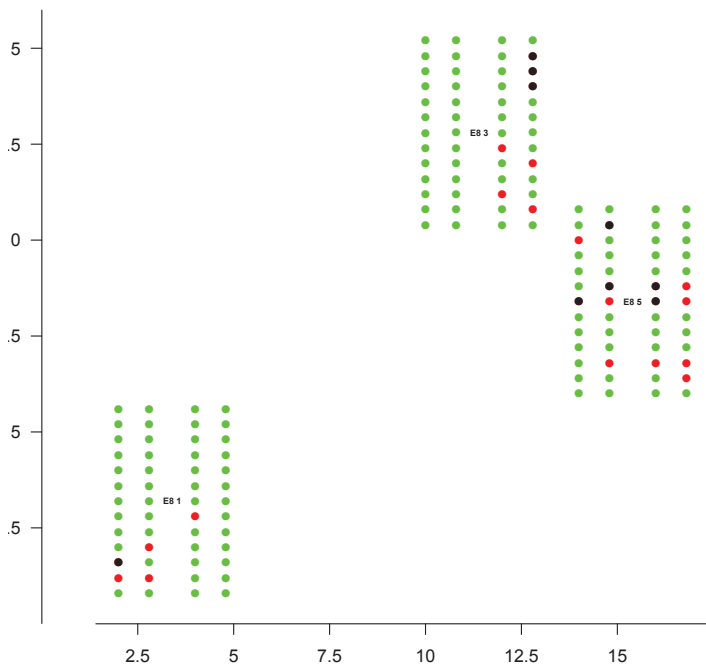
0 jours apres plantation en A2012C1



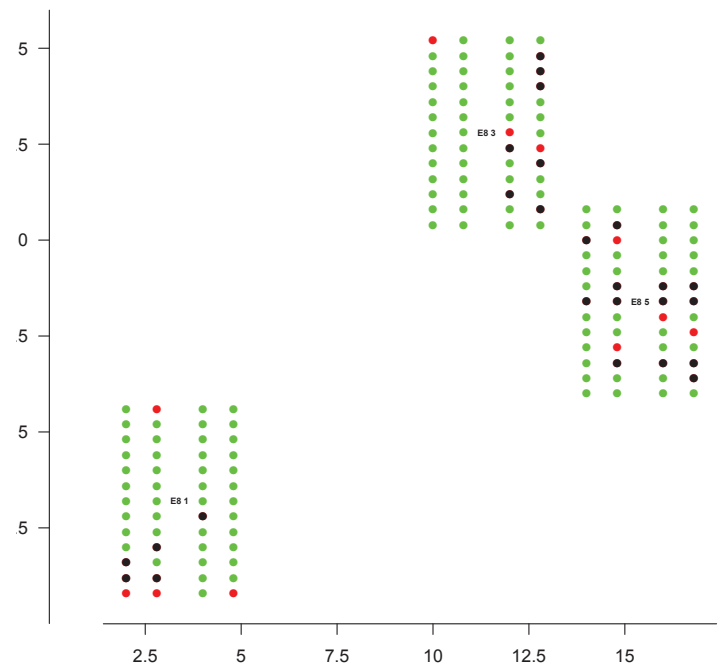
7 jours apres plantation en A2012C1



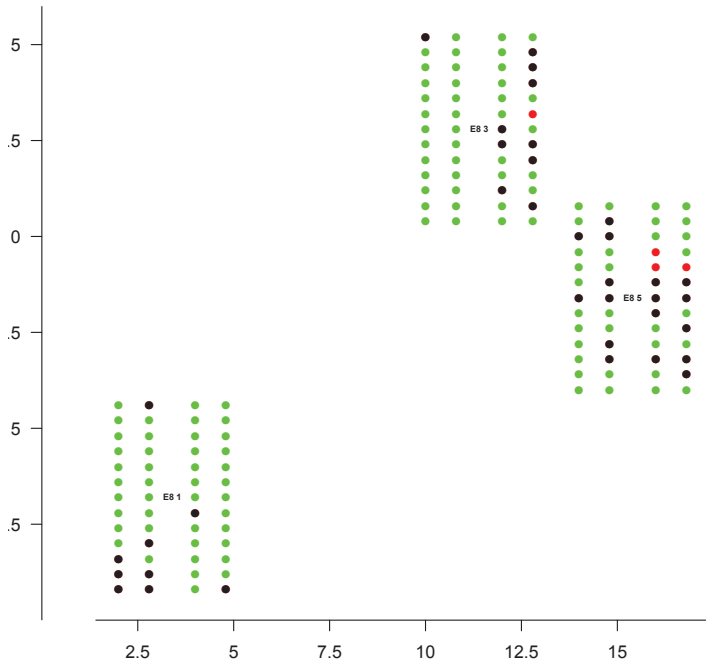
14 jours apres plantation en A2012C1



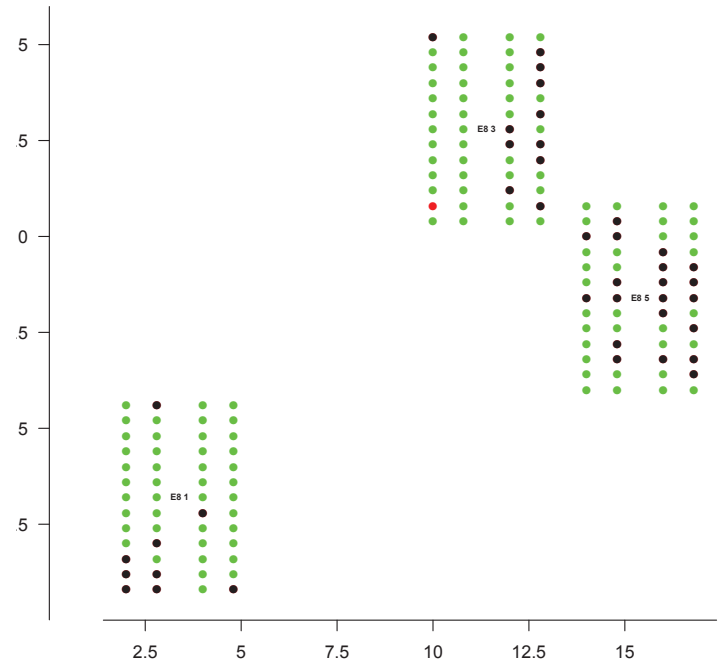
21 jours apres plantation en A2012C1



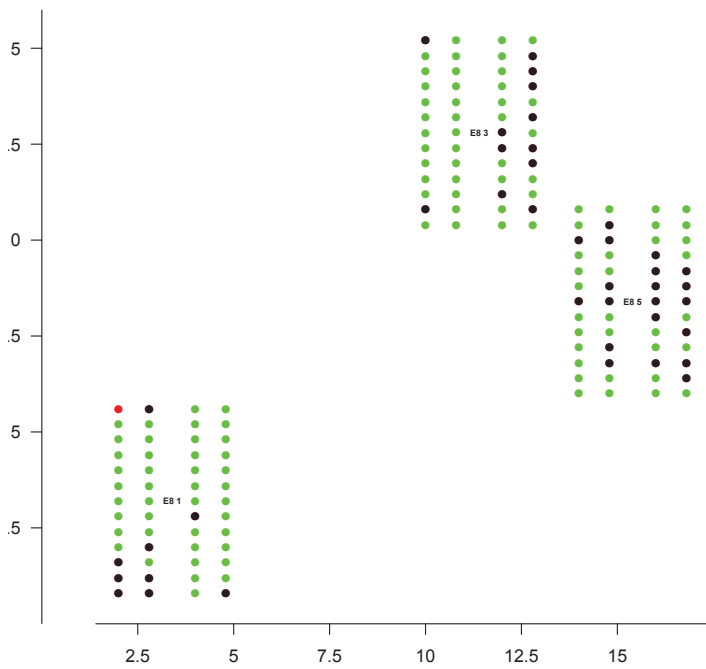
28 jours apres plantation en A2012C1



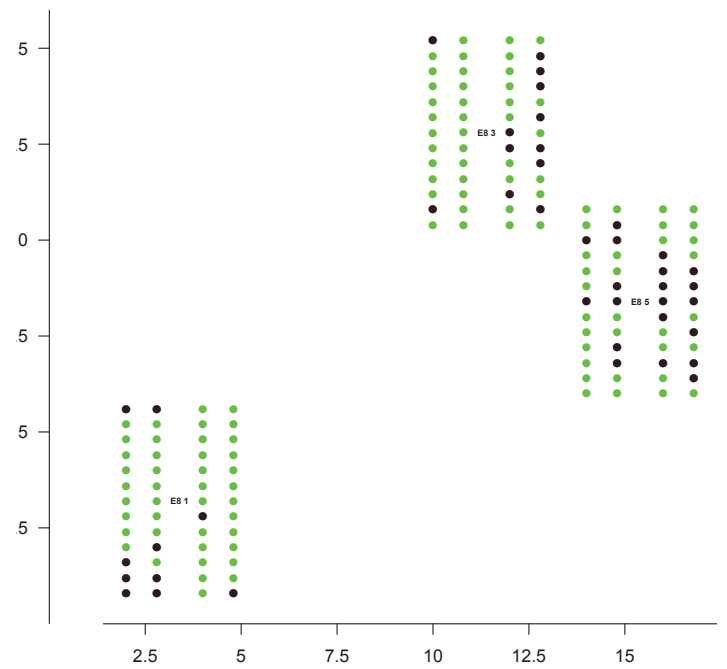
35 jours apres plantation en A2012C1



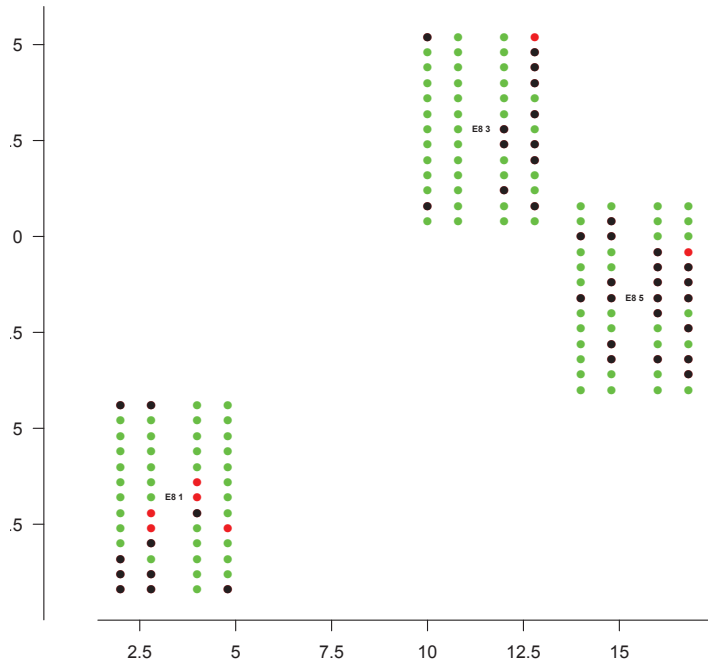
49 jours apres plantation en A2012C1



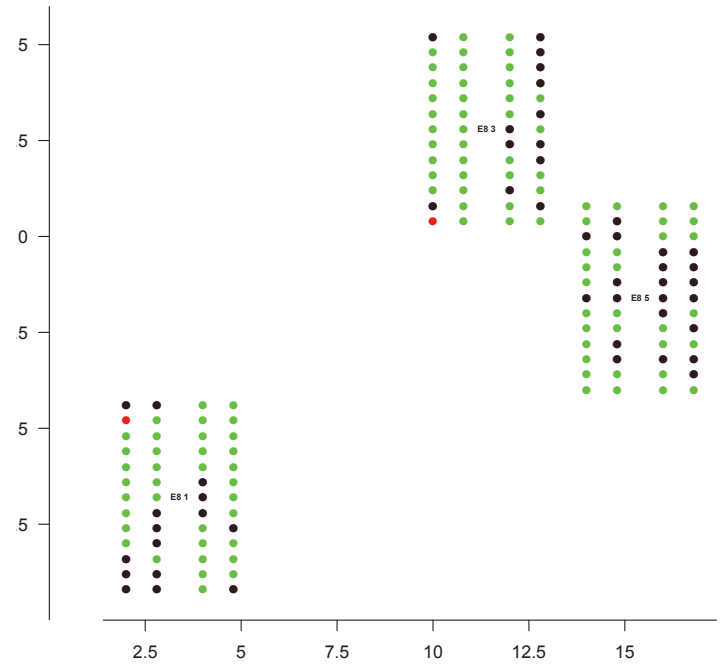
56 jours apres plantation en A2012C1



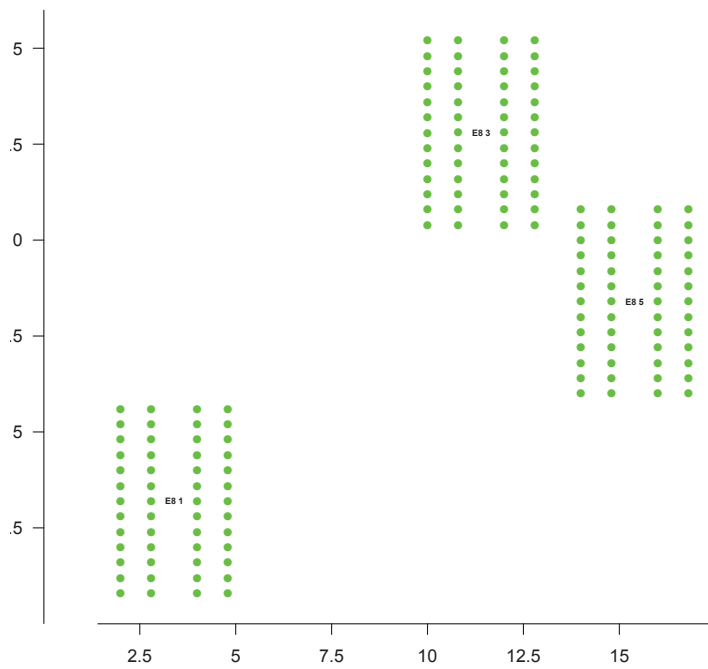
70 jours apres plantation en A2012C1



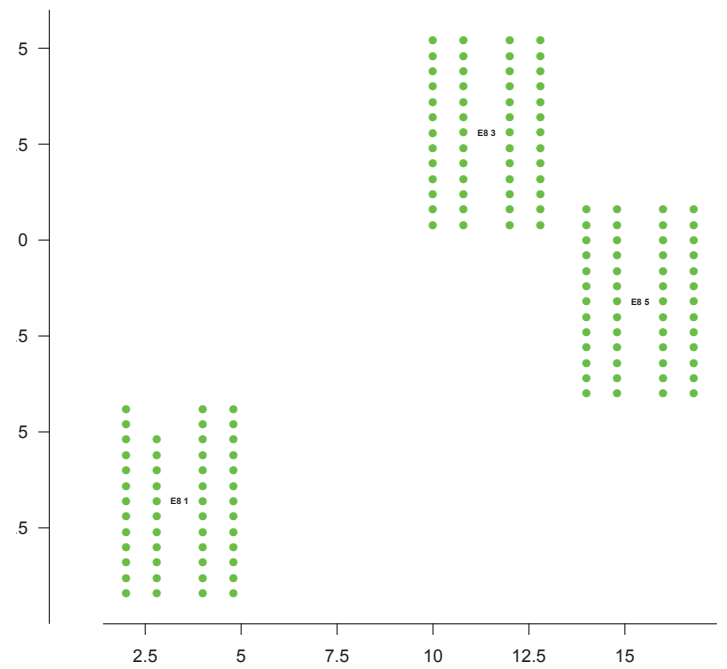
84 jours apres plantation en A2012C1



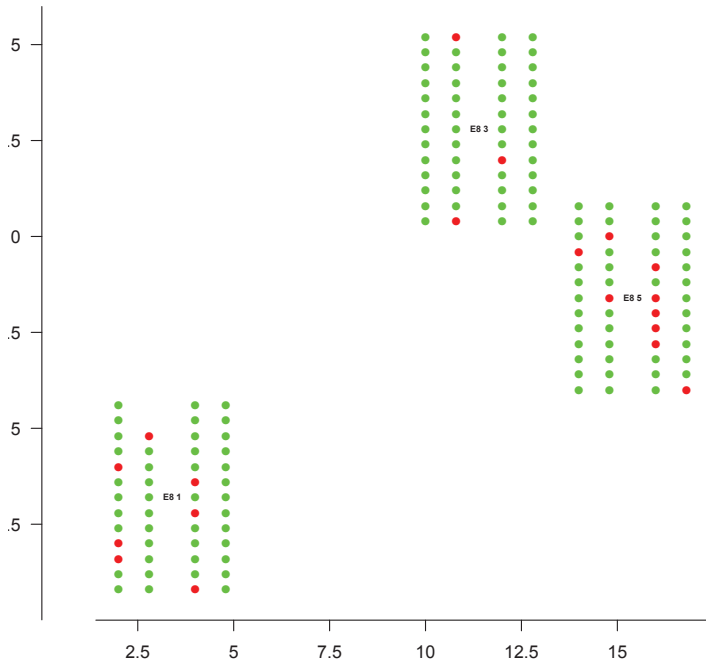
0 jours apres plantation en A2013C2



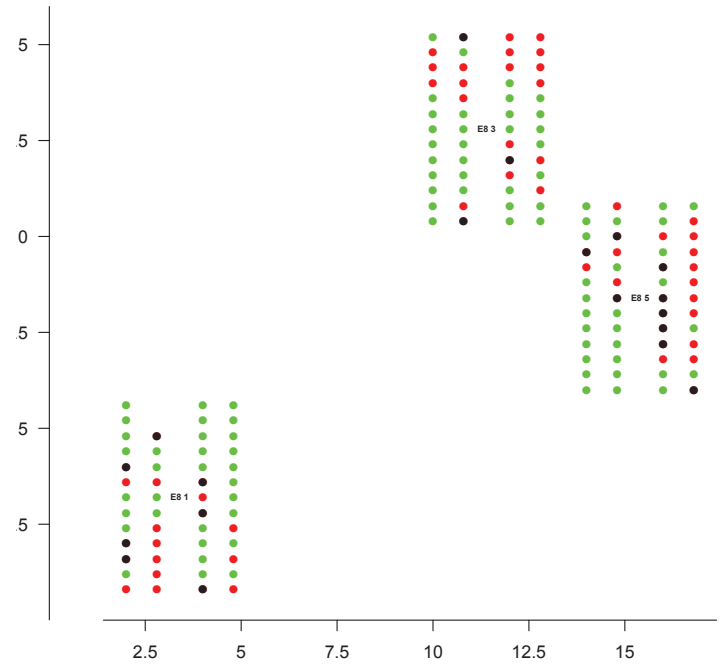
8 jours apres plantation en A2013C2



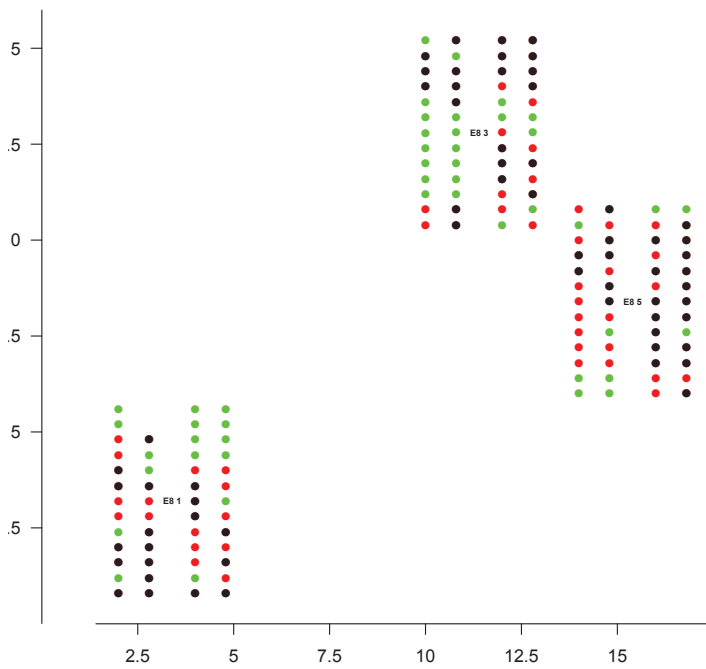
15 jours apres plantation en A2013C2



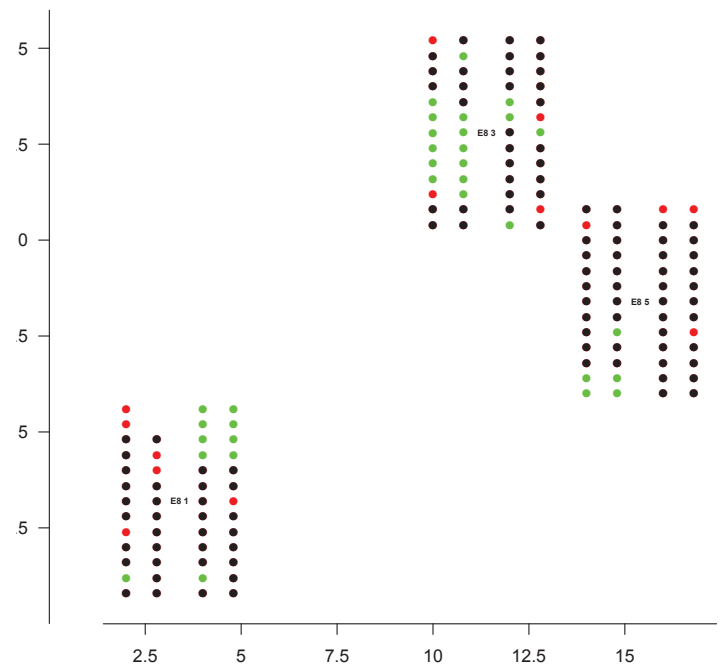
23 jours apres plantation en A2013C2



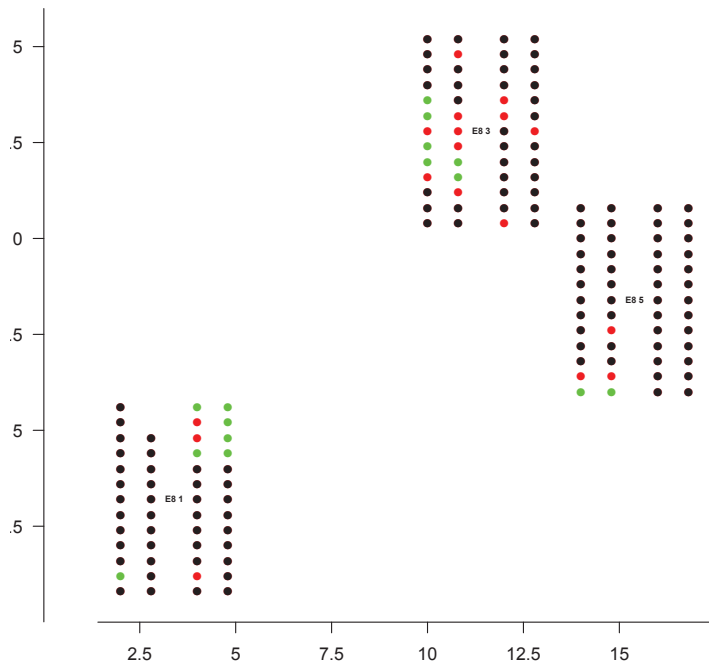
30 jours apres plantation en A2013C2



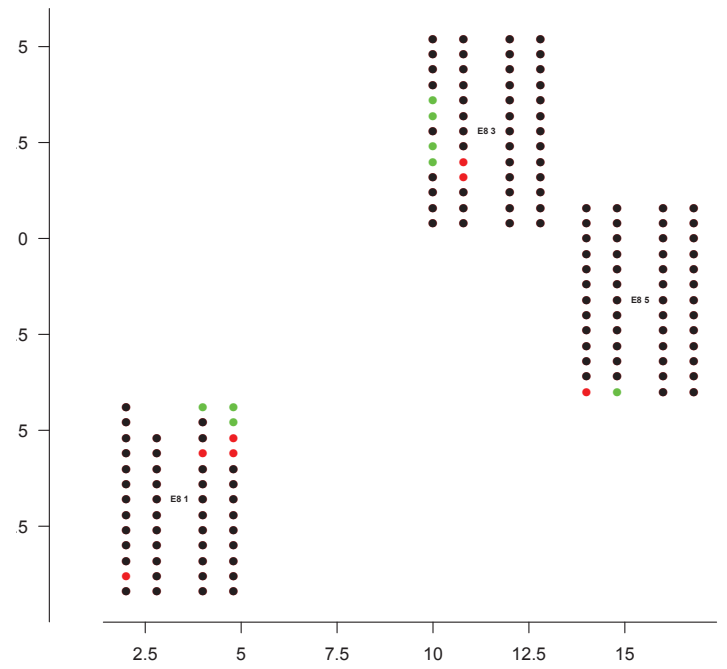
36 jours apres plantation en A2013C2



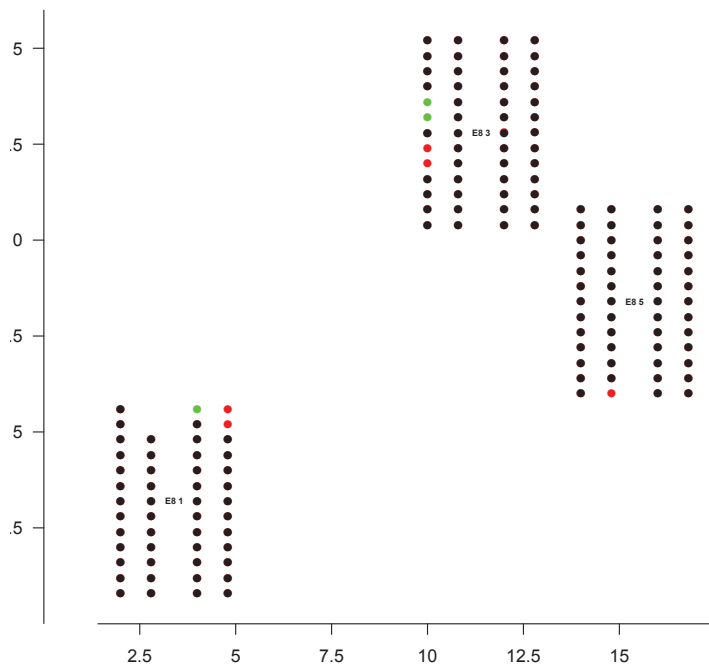
43 jours apres plantation en A2013C2



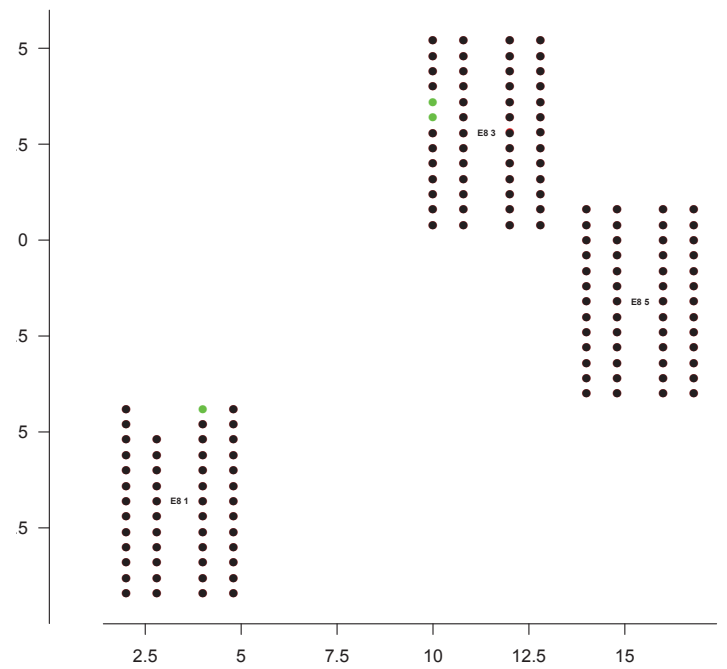
51 jours apres plantation en A2013C2



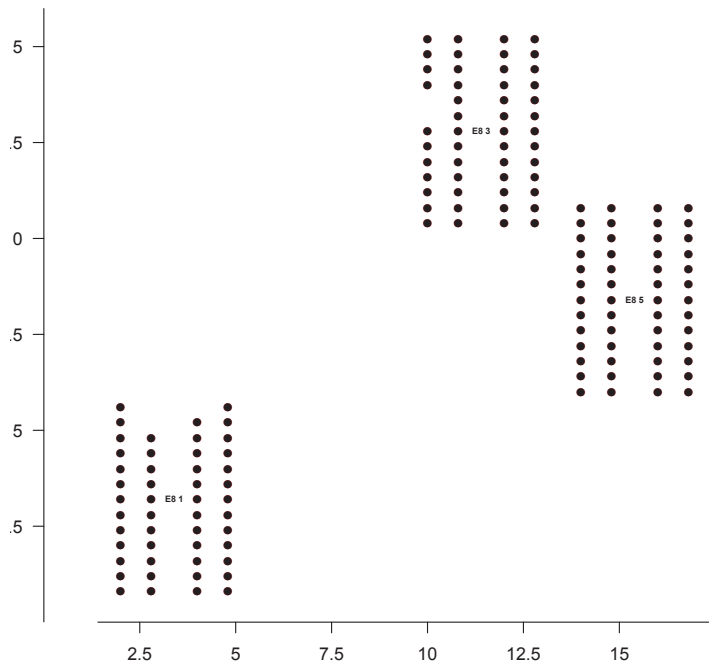
58 jours apres plantation en A2013C2



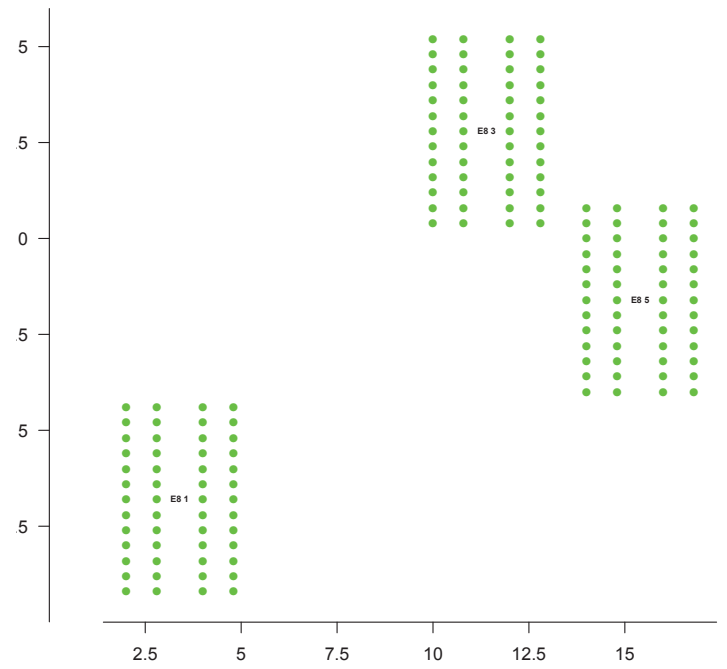
64 jours apres plantation en A2013C2



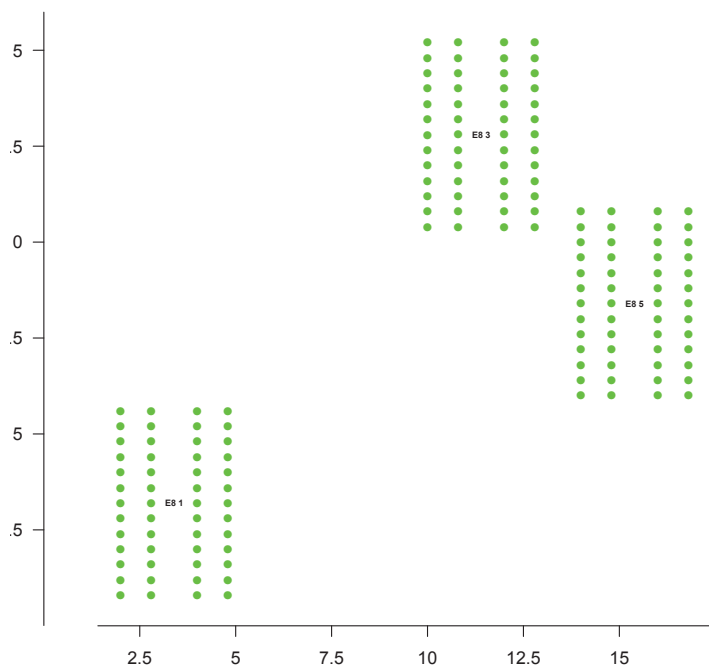
72 jours apres plantation en A2013C2



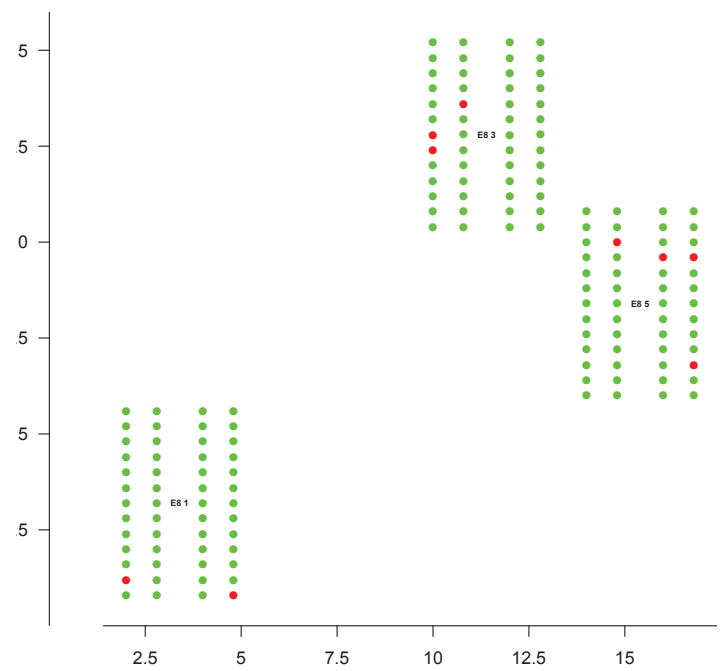
0 jours apres plantation en A2013C3



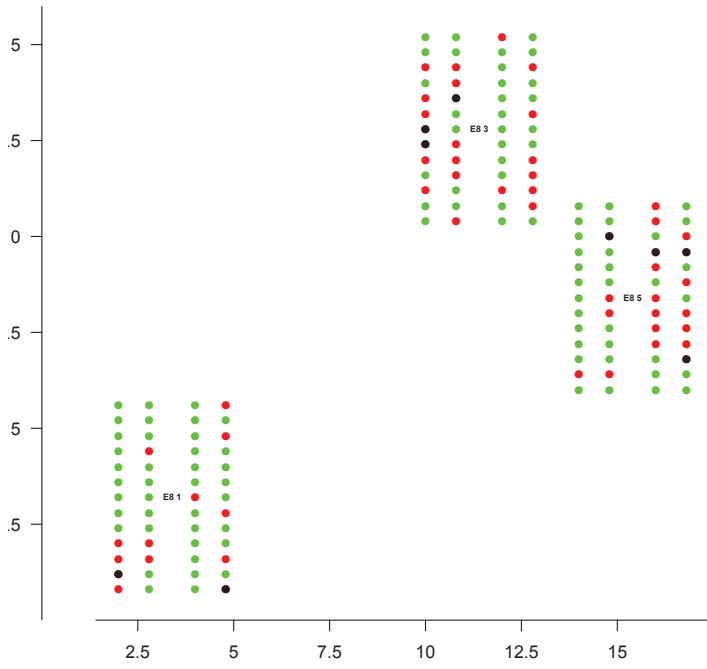
7 jours apres plantation en A2013C3



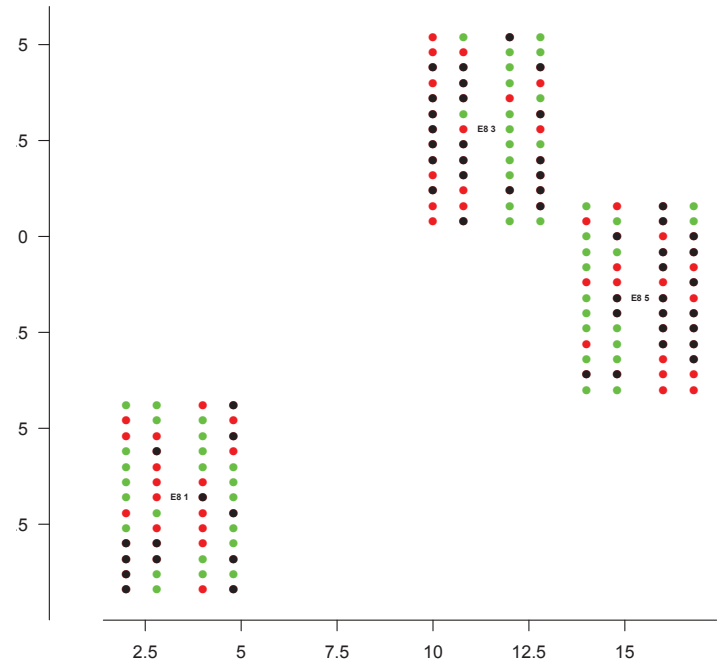
14 jours apres plantation en A2013C3



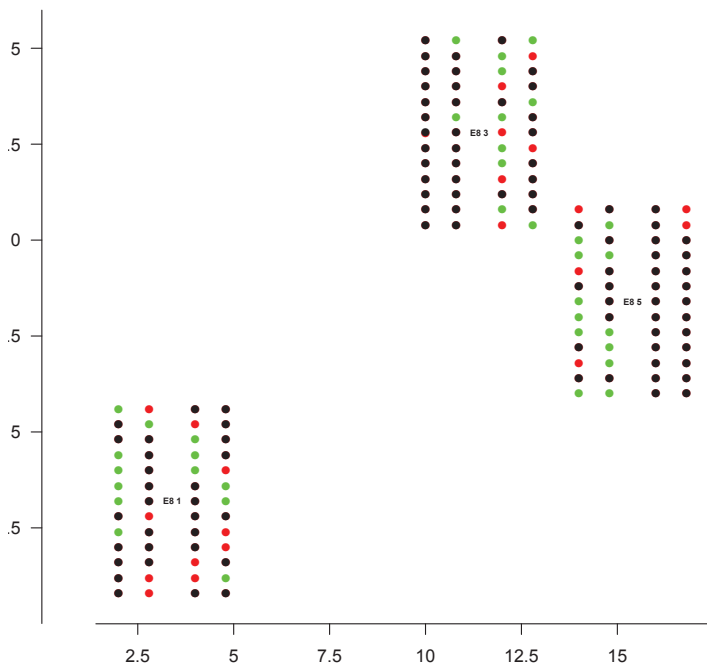
21 jours apres plantation en A2013C3



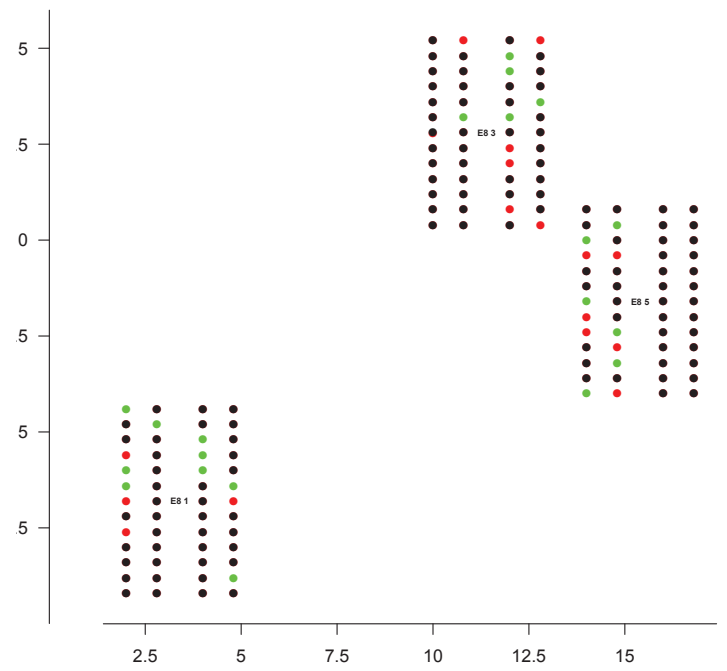
28 jours apres plantation en A2013C3



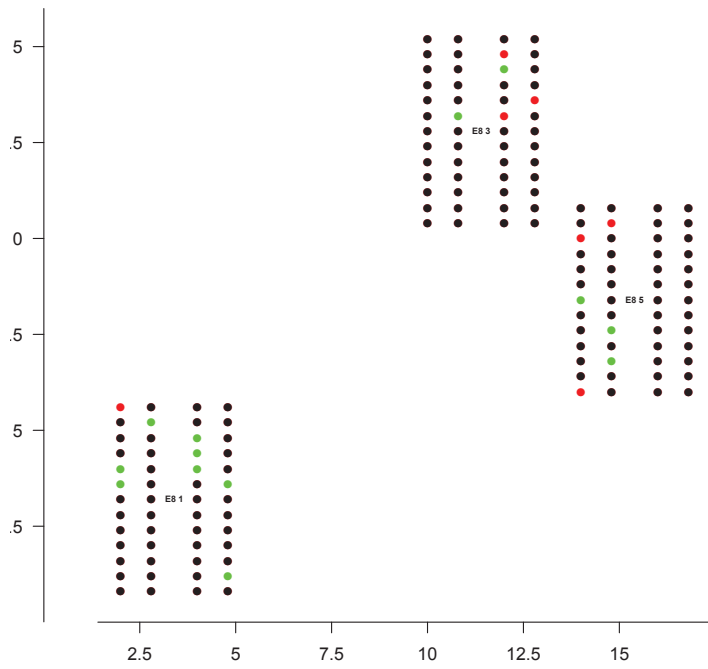
35 jours apres plantation en A2013C3



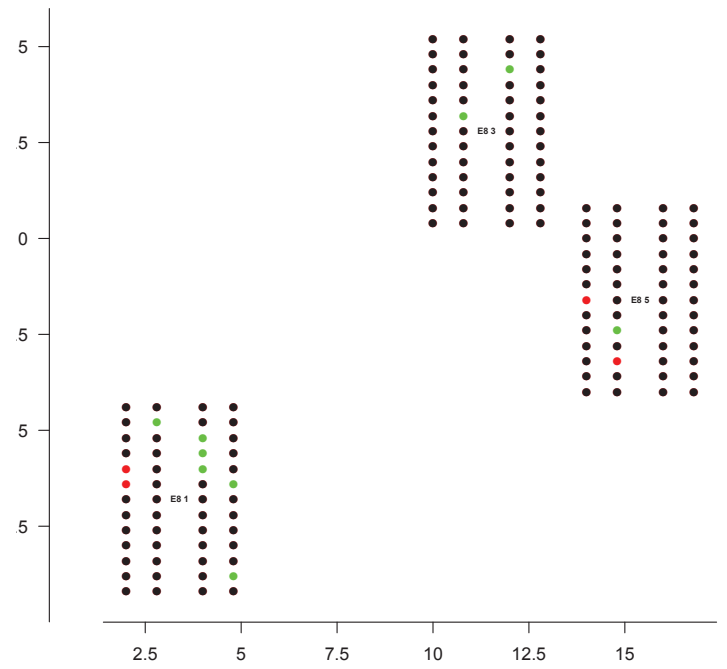
42 jours apres plantation en A2013C3



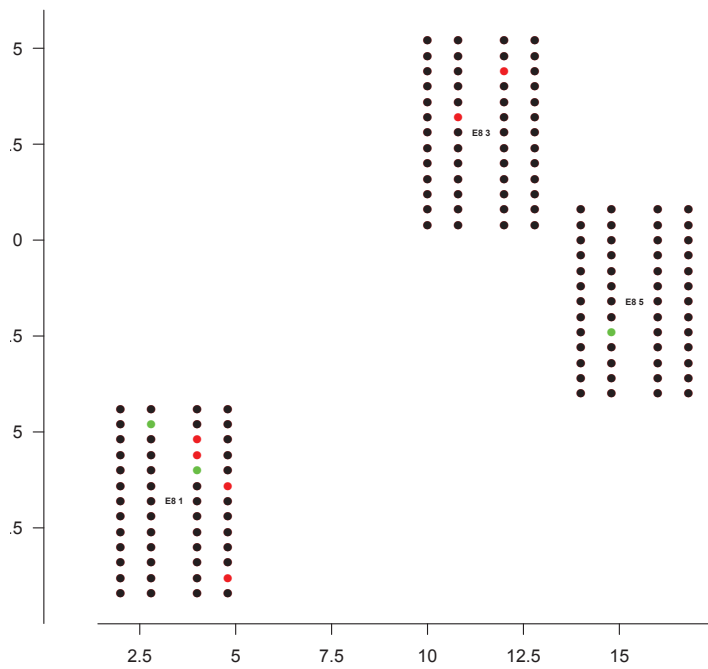
49 jours apres plantation en A2013C3



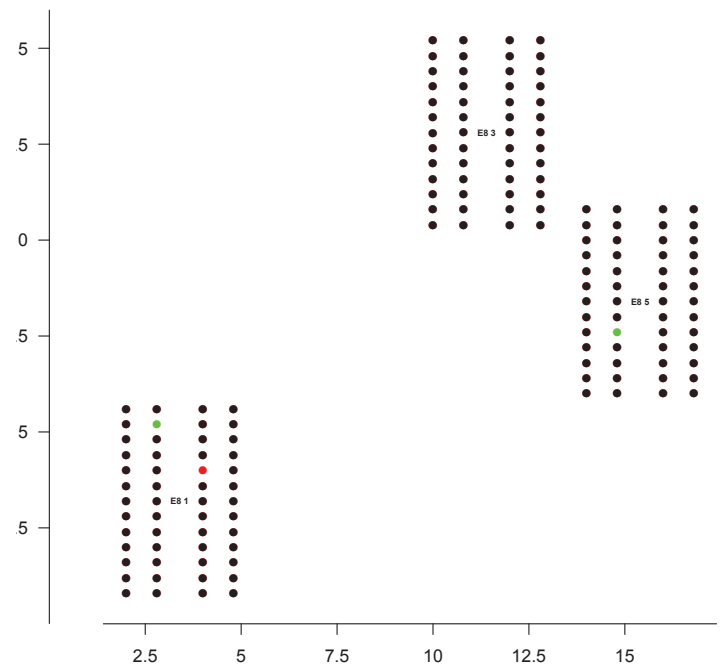
56 jours apres plantation en A2013C3



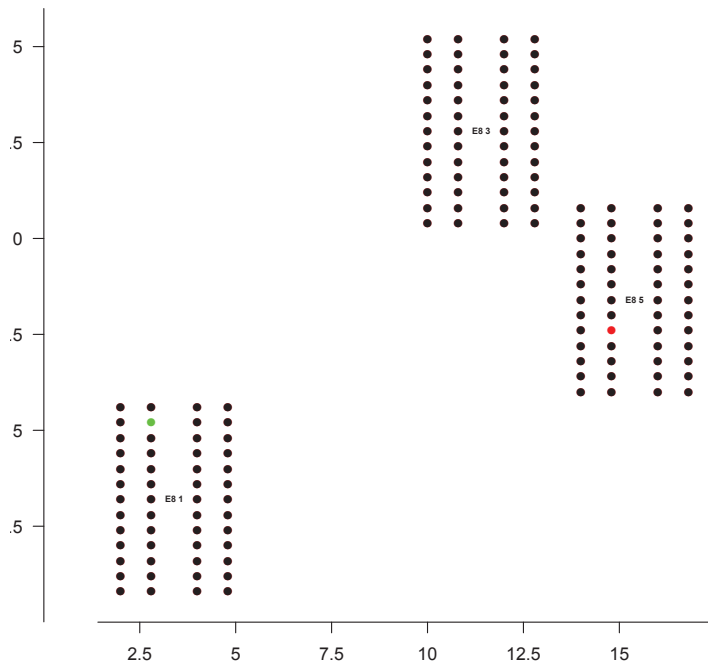
63 jours apres plantation en A2013C3



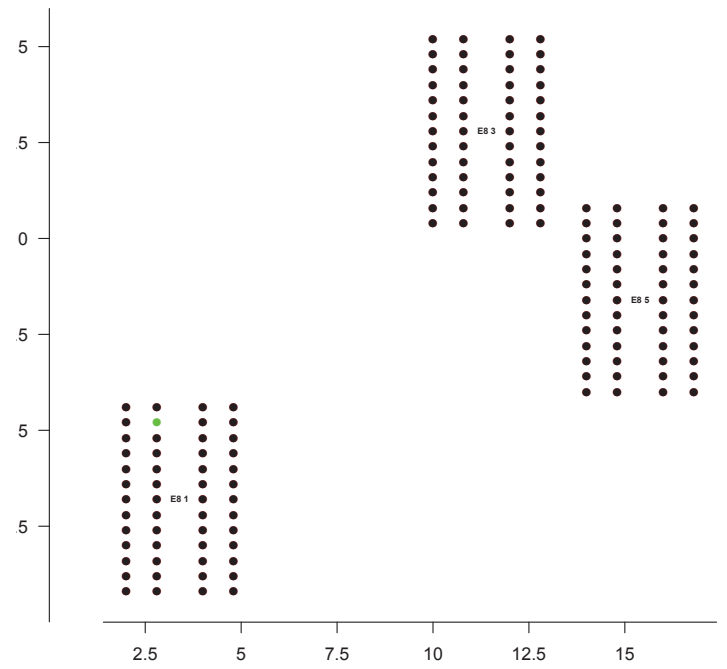
70 jours apres plantation en A2013C3



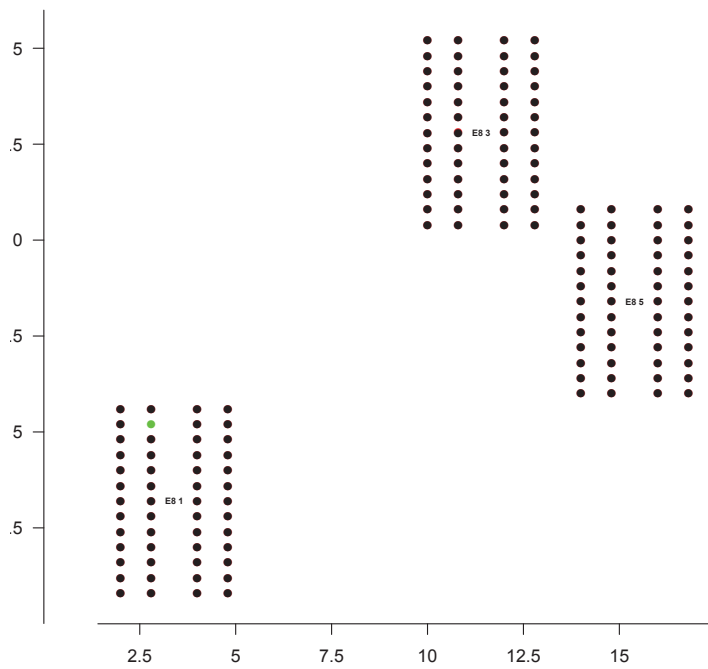
77 jours apres plantation en A2013C3



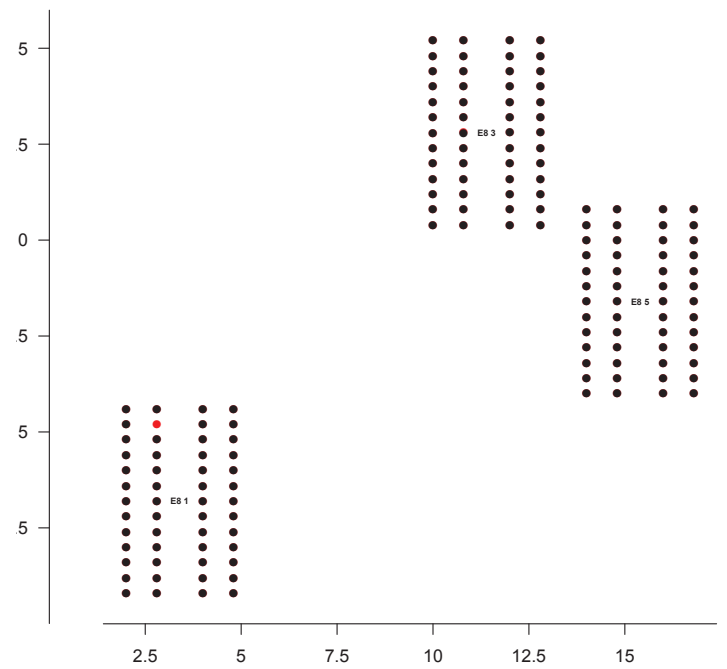
84 jours apres plantation en A2013C3



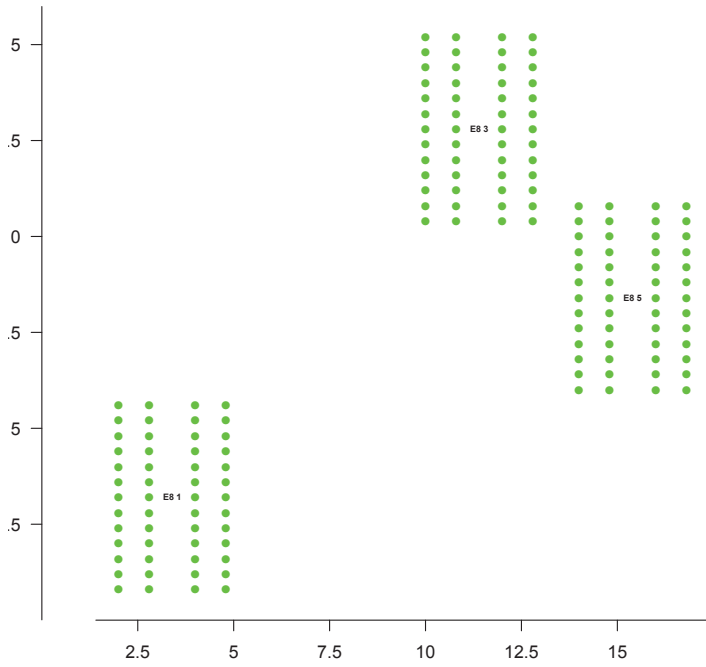
91 jours apres plantation en A2013C3



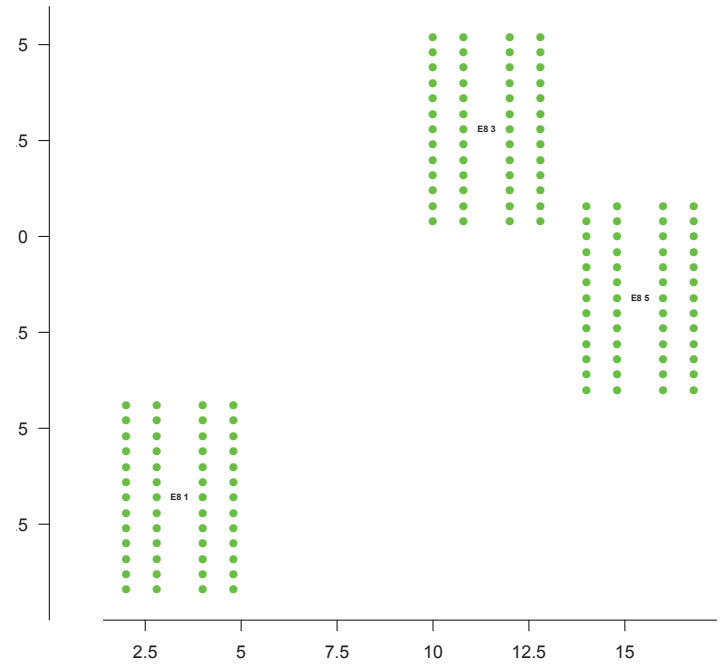
98 jours apres plantation en A2013C3



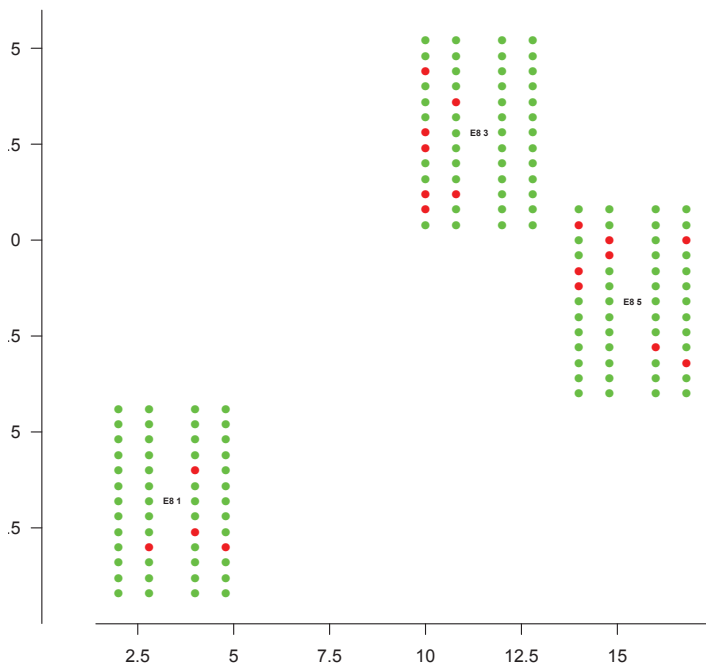
0 jours apres plantation en A2014C4



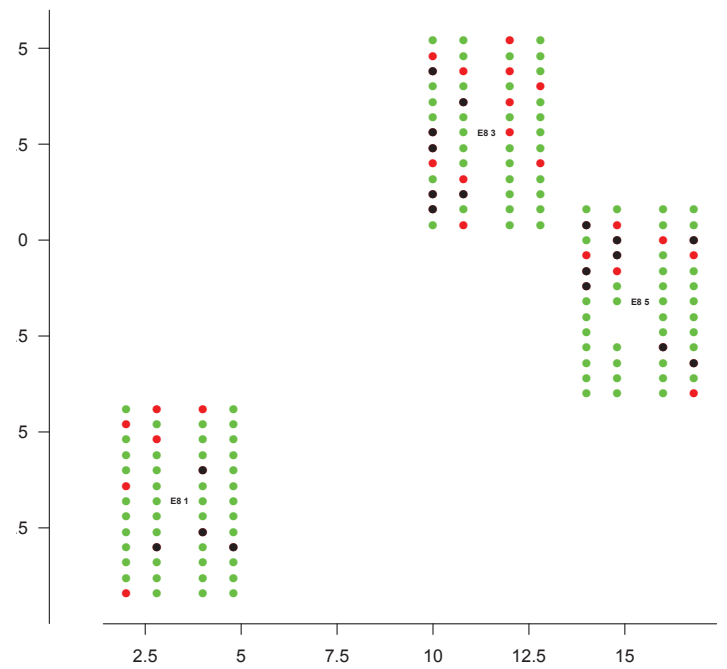
7 jours apres plantation en A2014C4



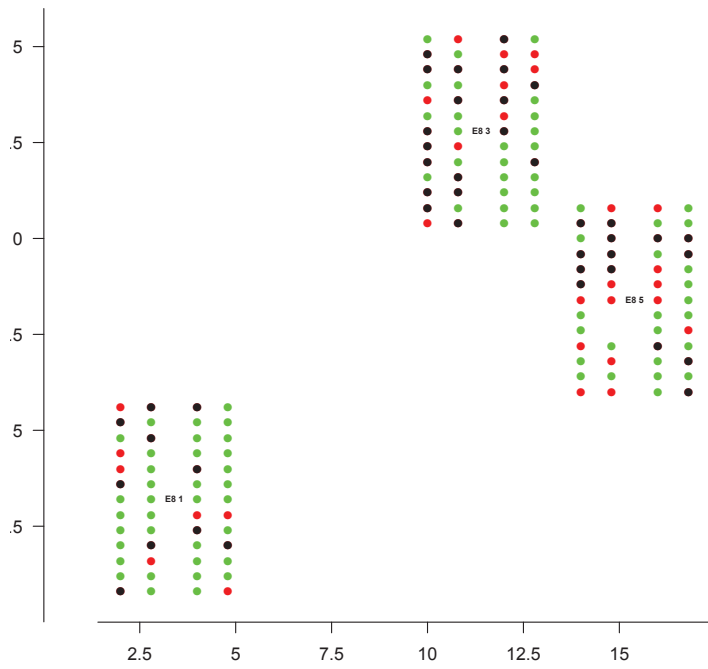
14 jours apres plantation en A2014C4



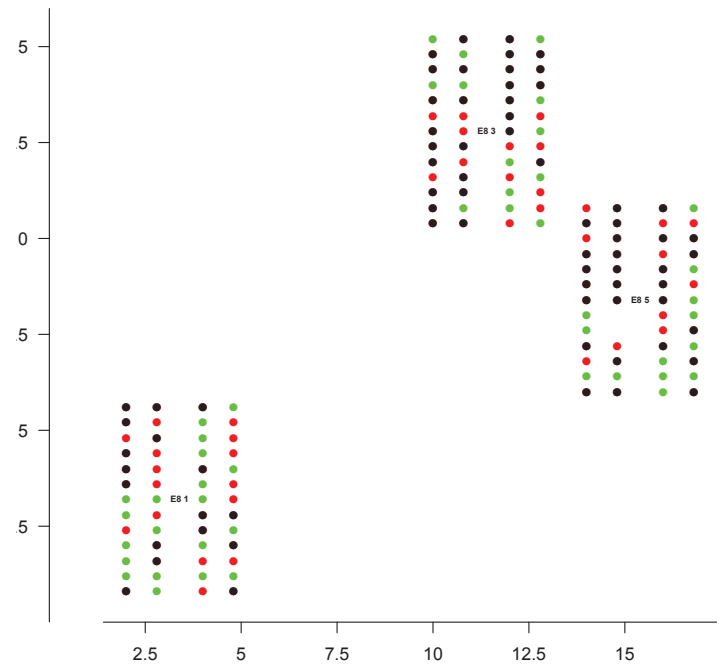
21 jours apres plantation en A2014C4



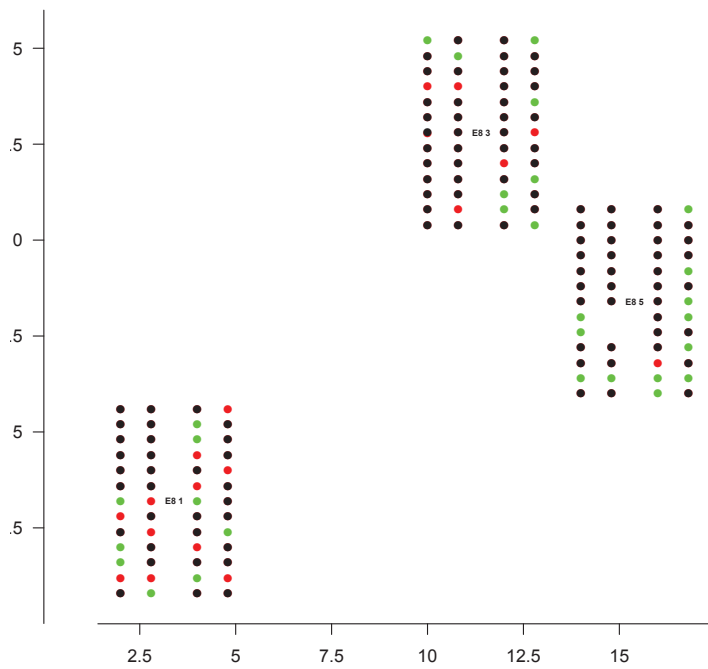
28 jours apres plantation en A2014C4



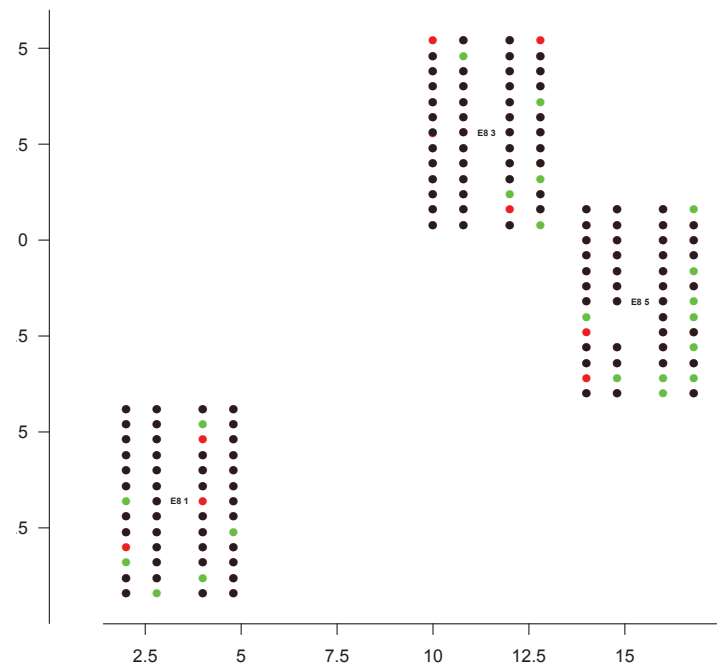
35 jours apres plantation en A2014C4



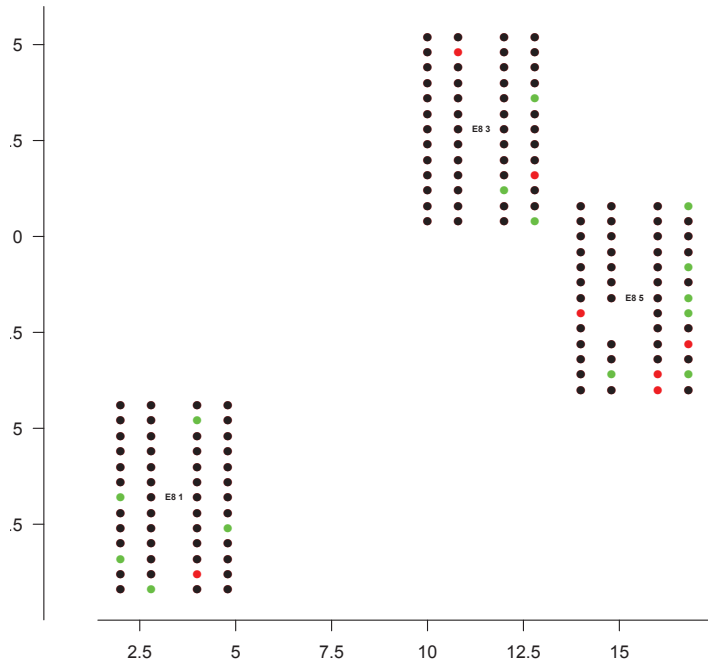
42 jours apres plantation en A2014C4



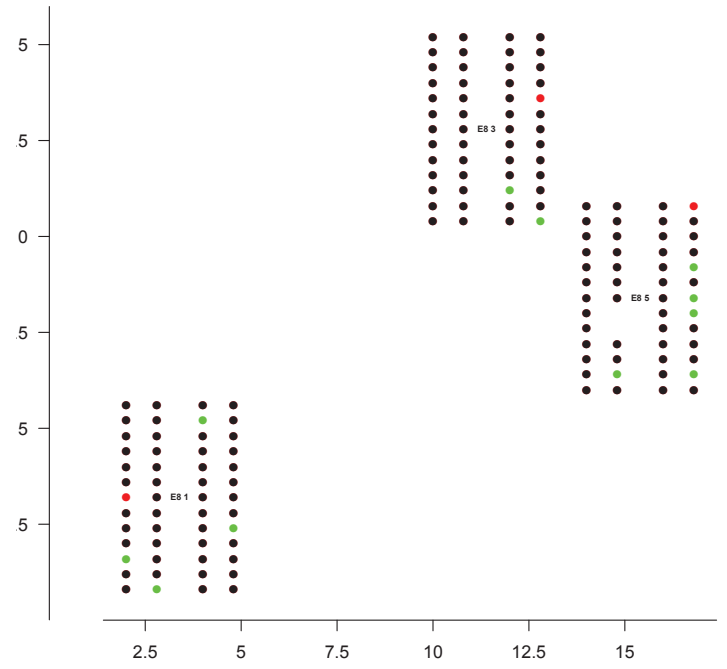
49 jours apres plantation en A2014C4



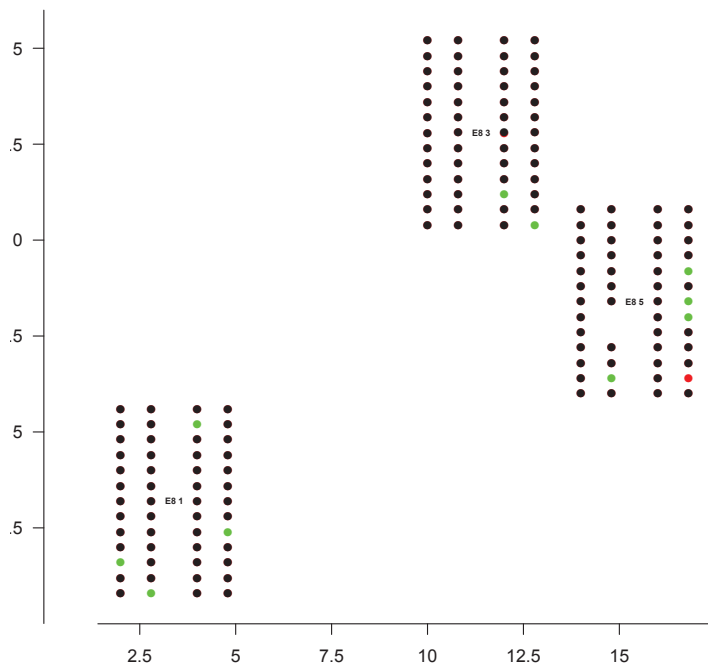
56 jours apres plantation en A2014C4



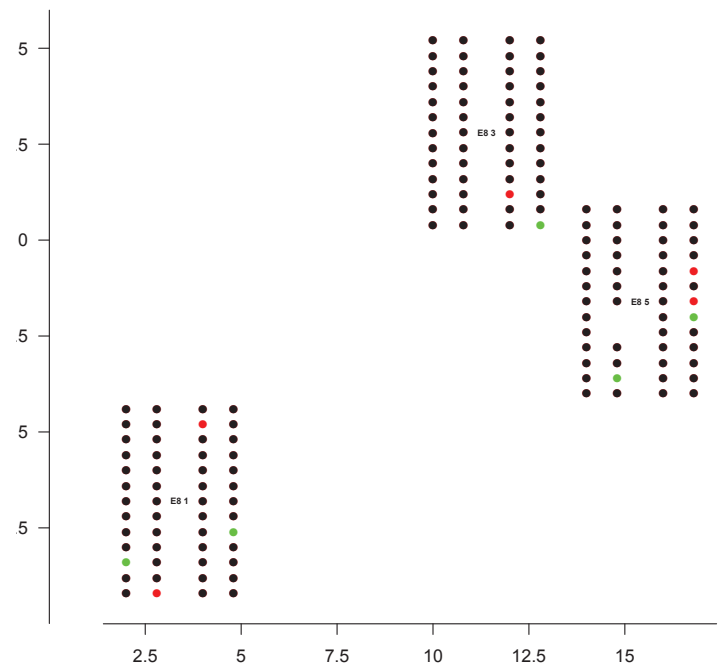
63 jours apres plantation en A2014C4



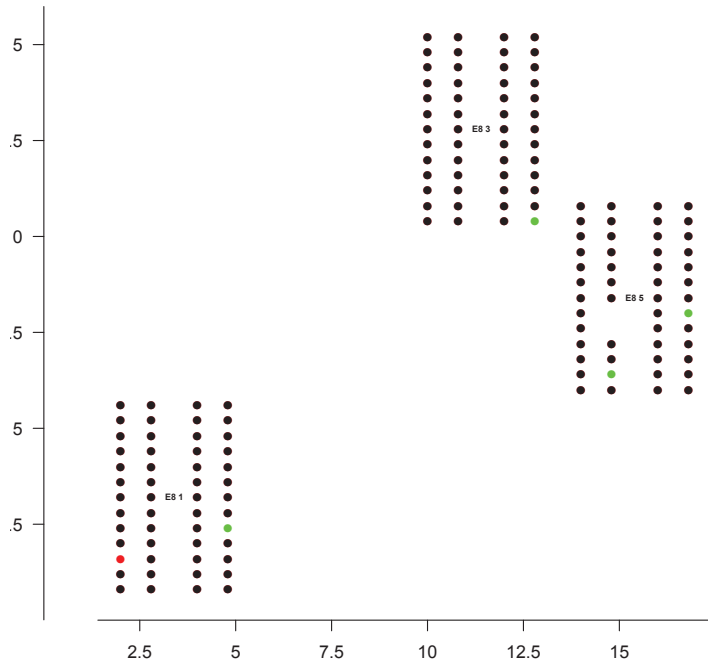
70 jours apres plantation en A2014C4



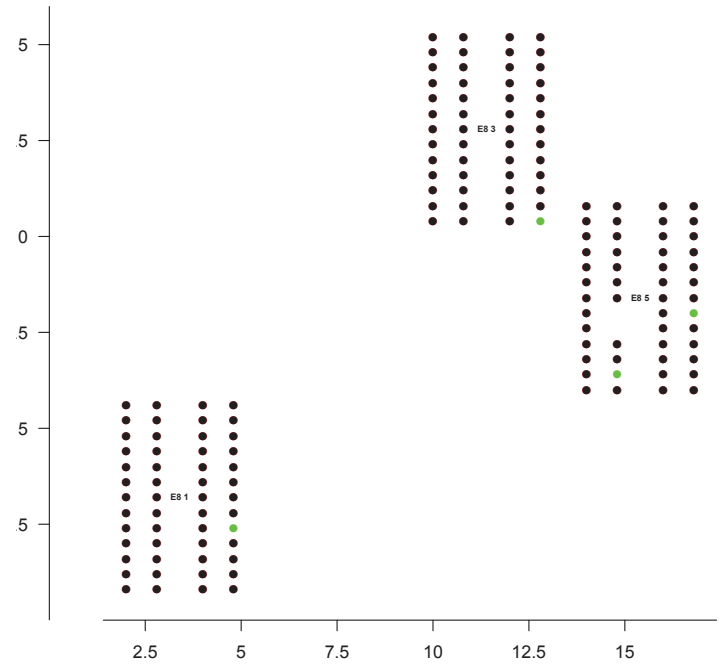
77 jours apres plantation en A2014C4



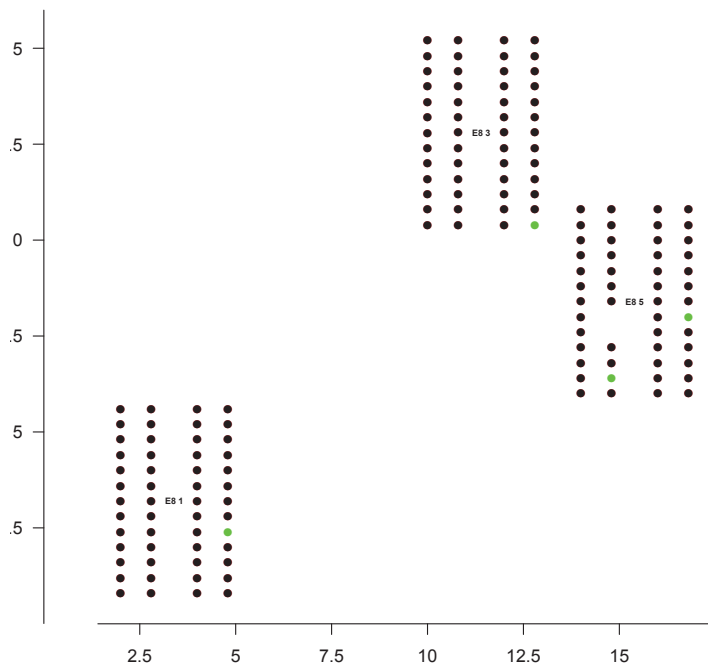
84 jours apres plantation en A2014C4



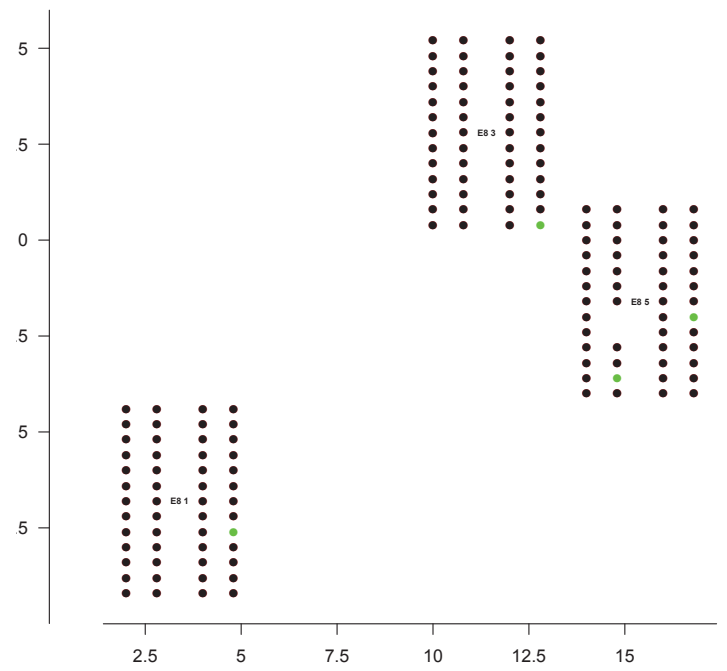
91 jours apres plantation en A2014C4



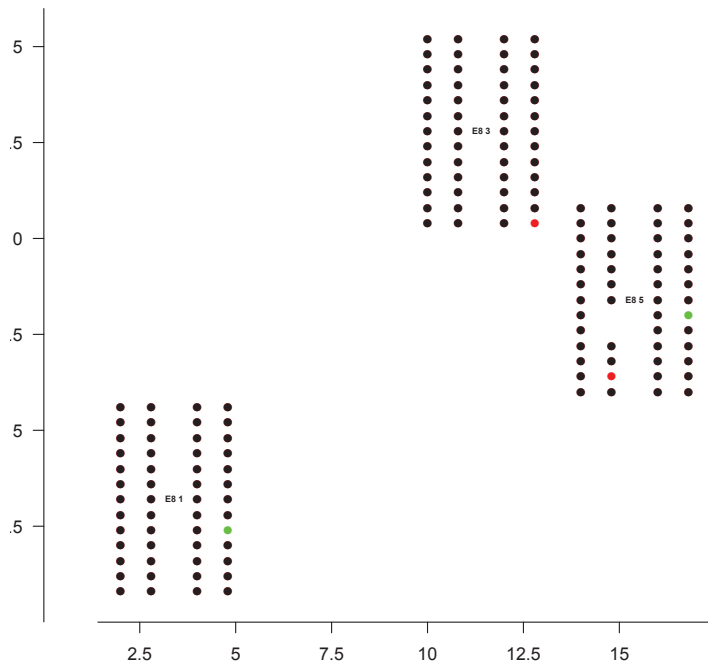
98 jours apres plantation en A2014C4



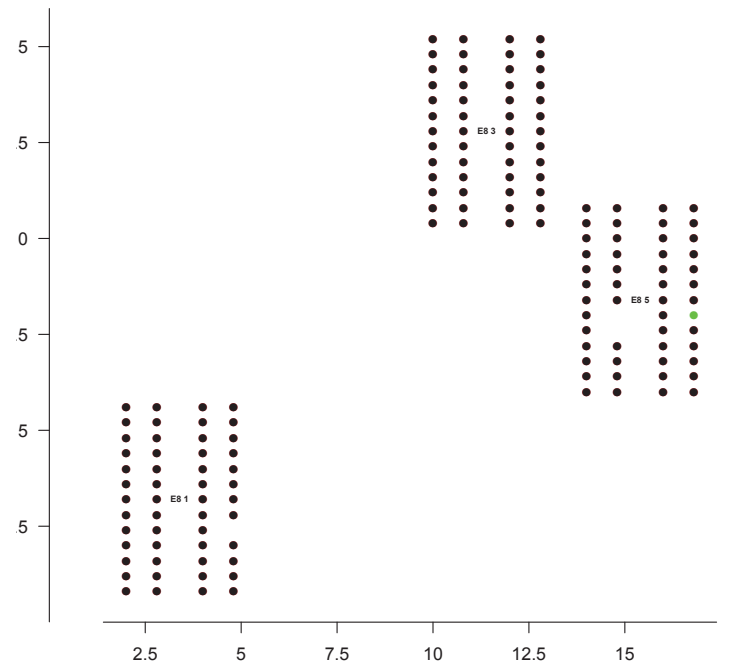
105 jours apres plantation en A2014C4



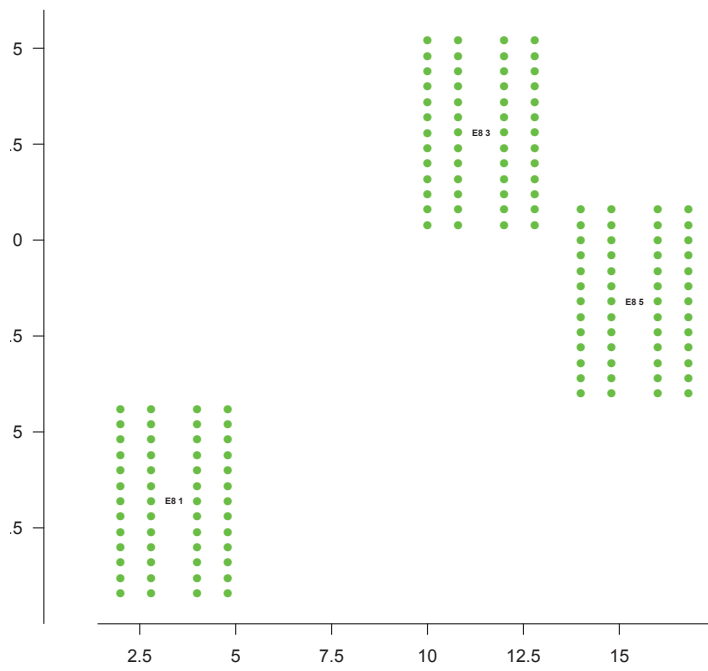
112 jours après plantation en A2014C4



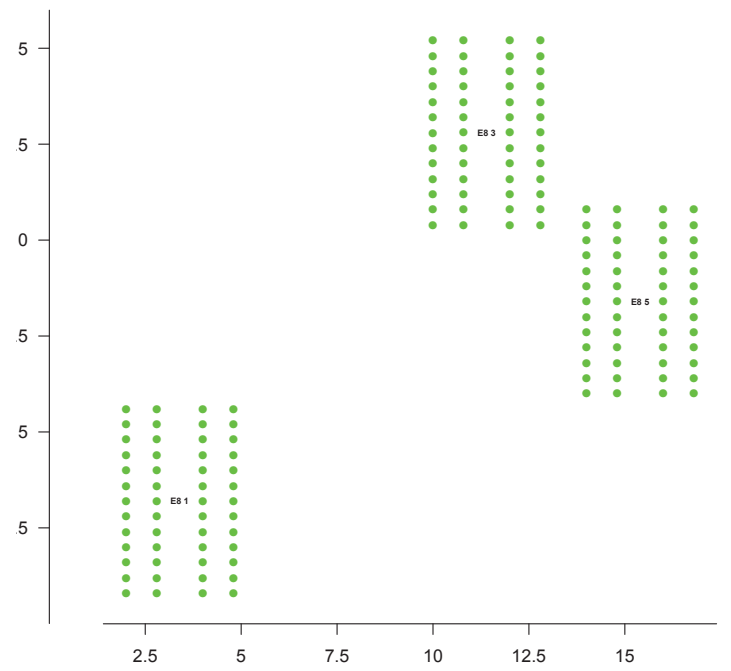
119 jours après plantation en A2014C4



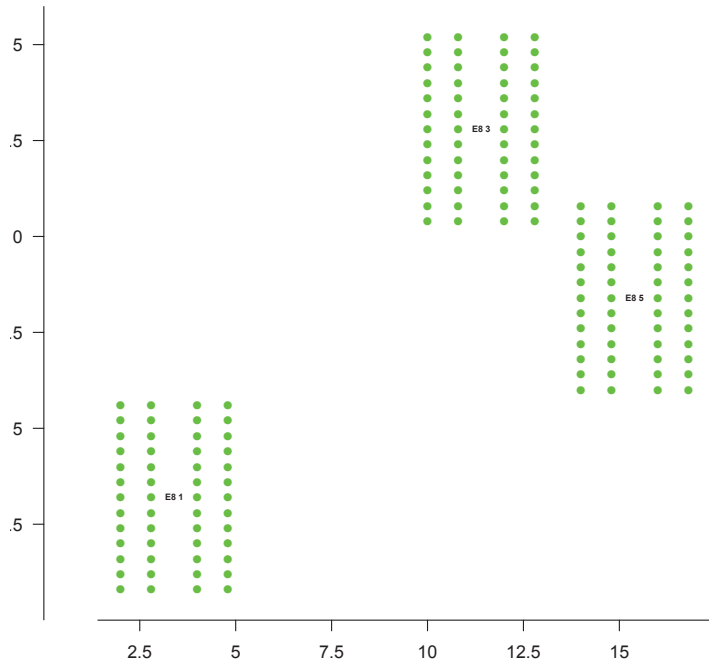
0 jours après plantation en A2014C5



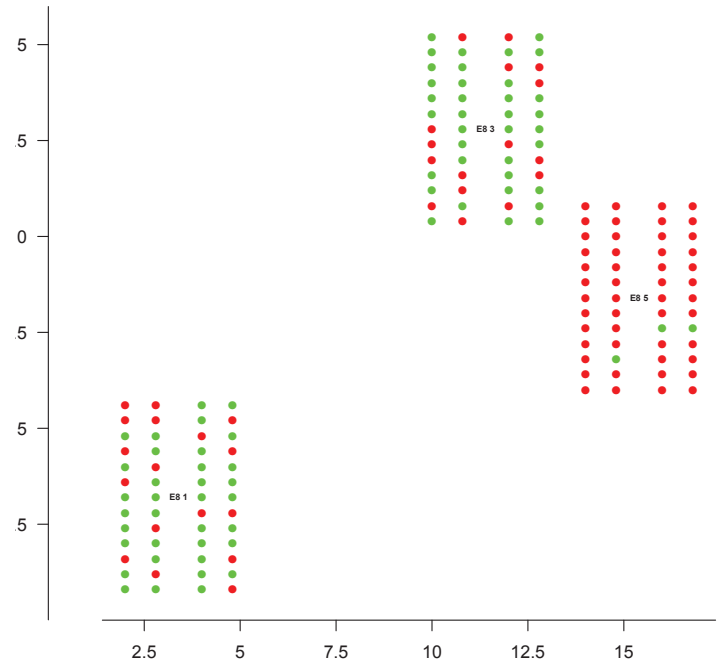
7 jours après plantation en A2014C5



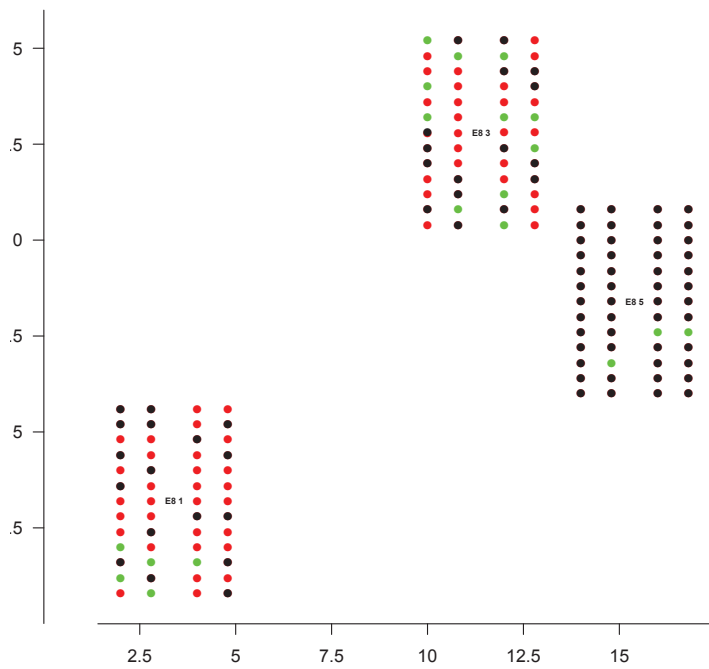
14 jours apres plantation en A2014C5



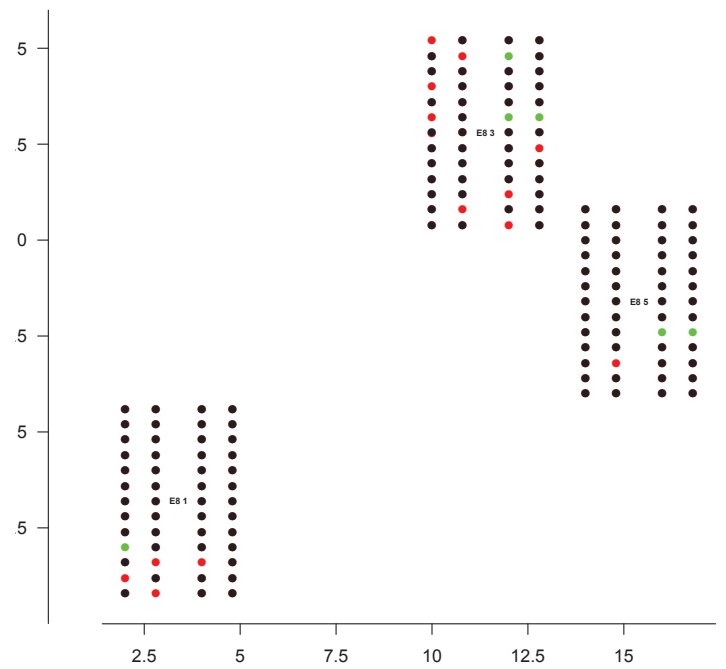
21 jours apres plantation en A2014C5



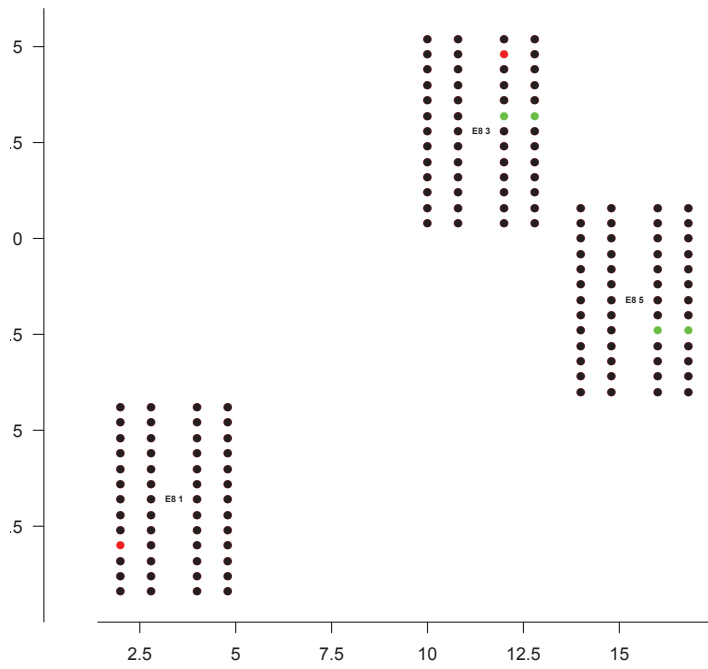
28 jours apres plantation en A2014C5



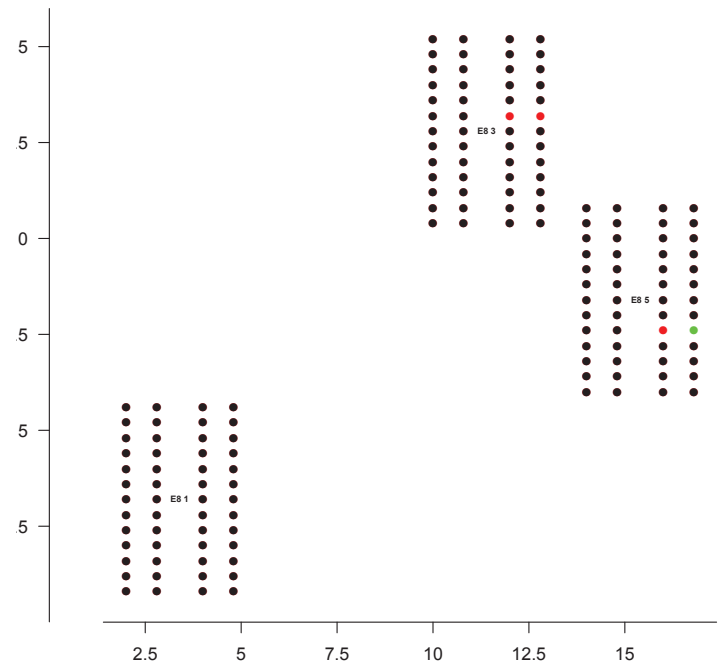
39 jours apres plantation en A2014C5



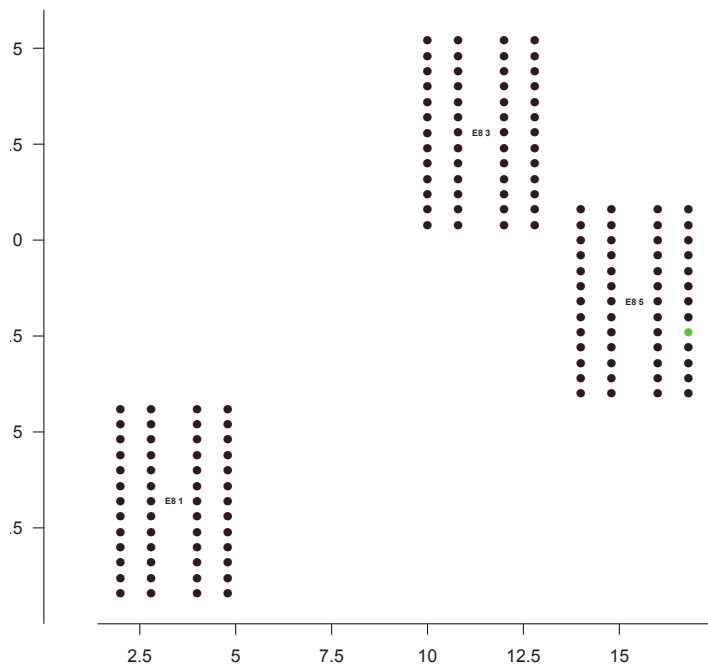
46 jours apres plantation en A2014C5



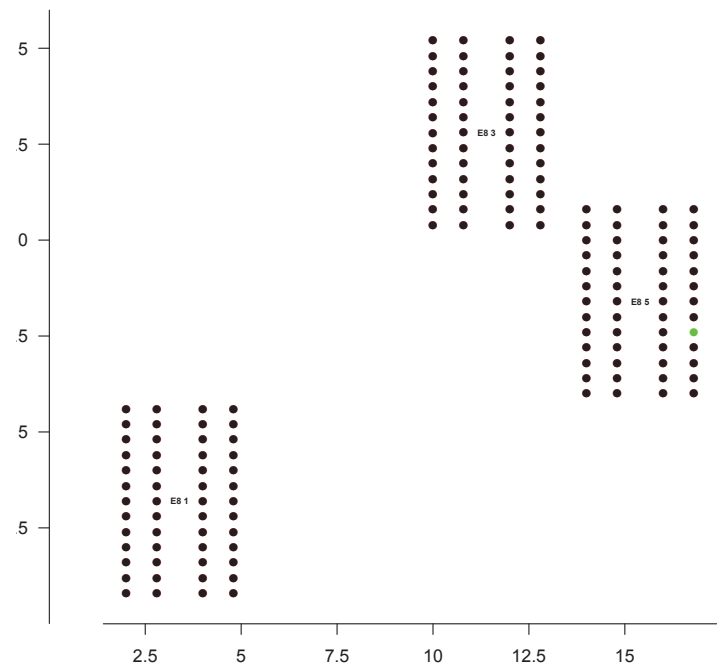
53 jours apres plantation en A2014C5



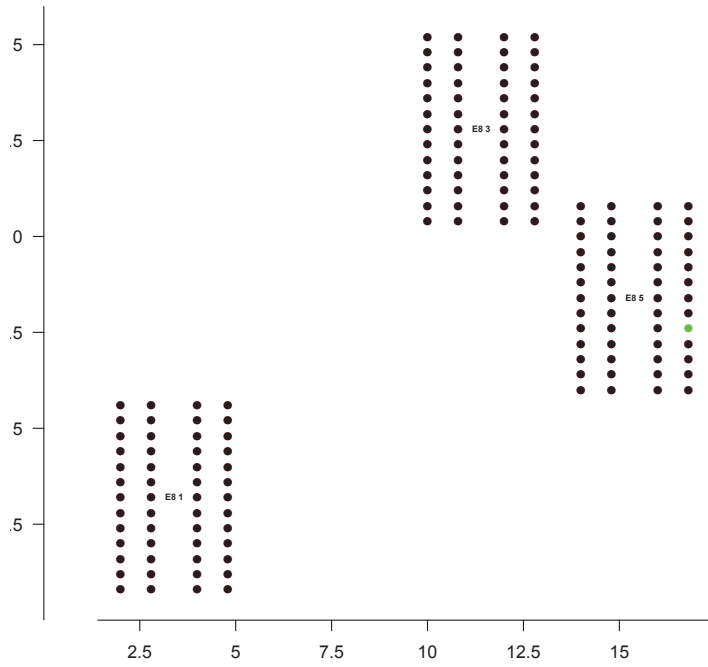
60 jours apres plantation en A2014C5



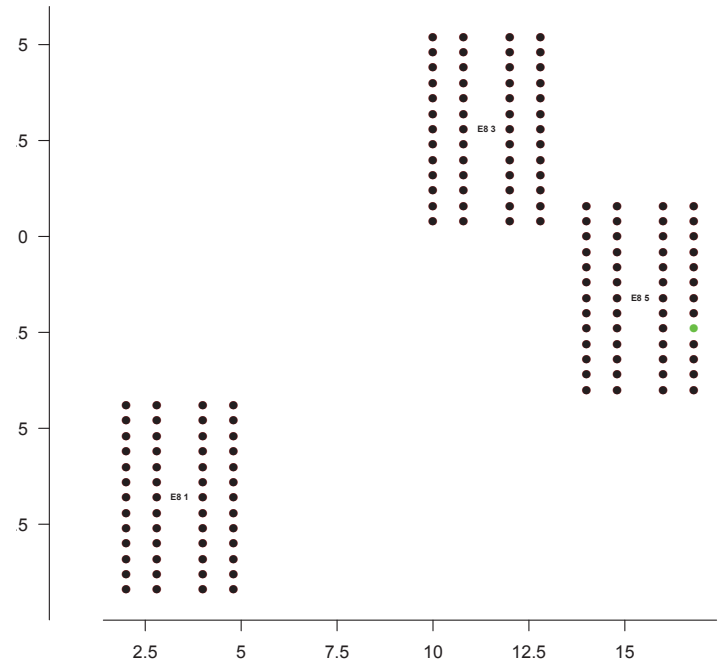
67 jours apres plantation en A2014C5



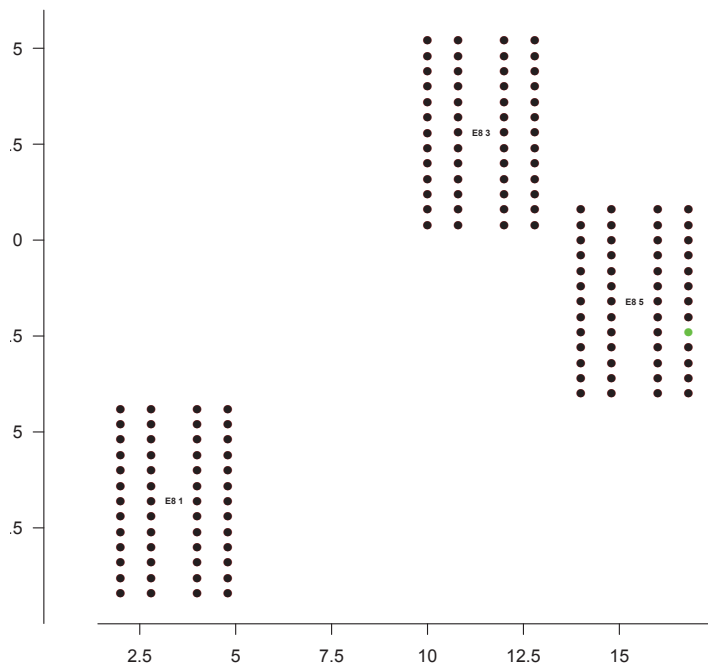
74 jours apres plantation en A2014C5



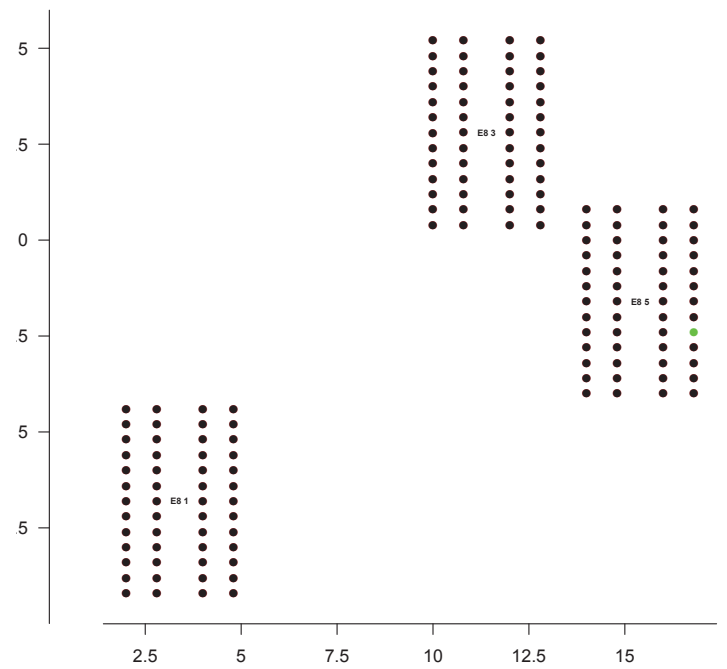
81 jours apres plantation en A2014C5



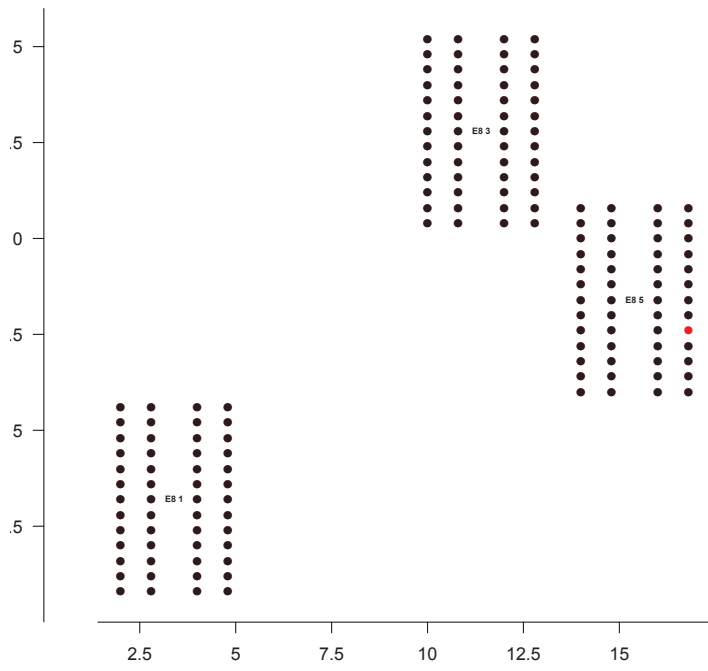
88 jours apres plantation en A2014C5



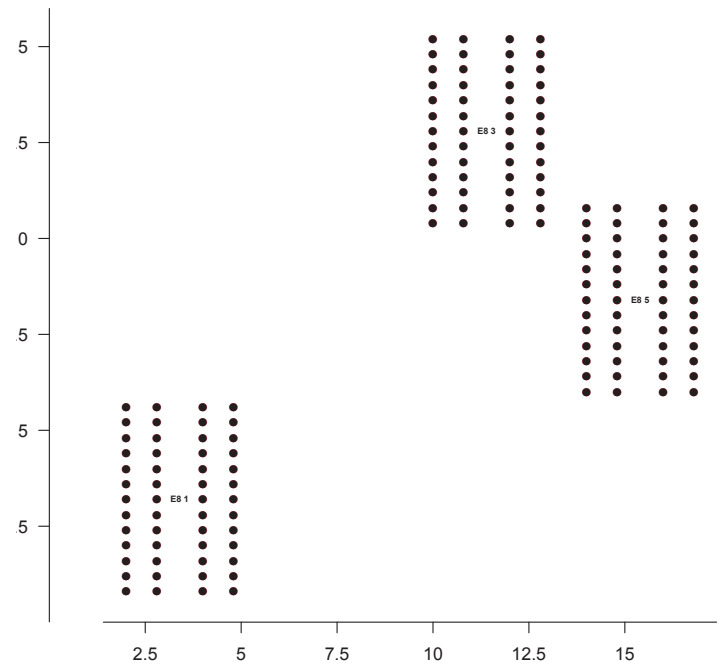
93 jours apres plantation en A2014C5

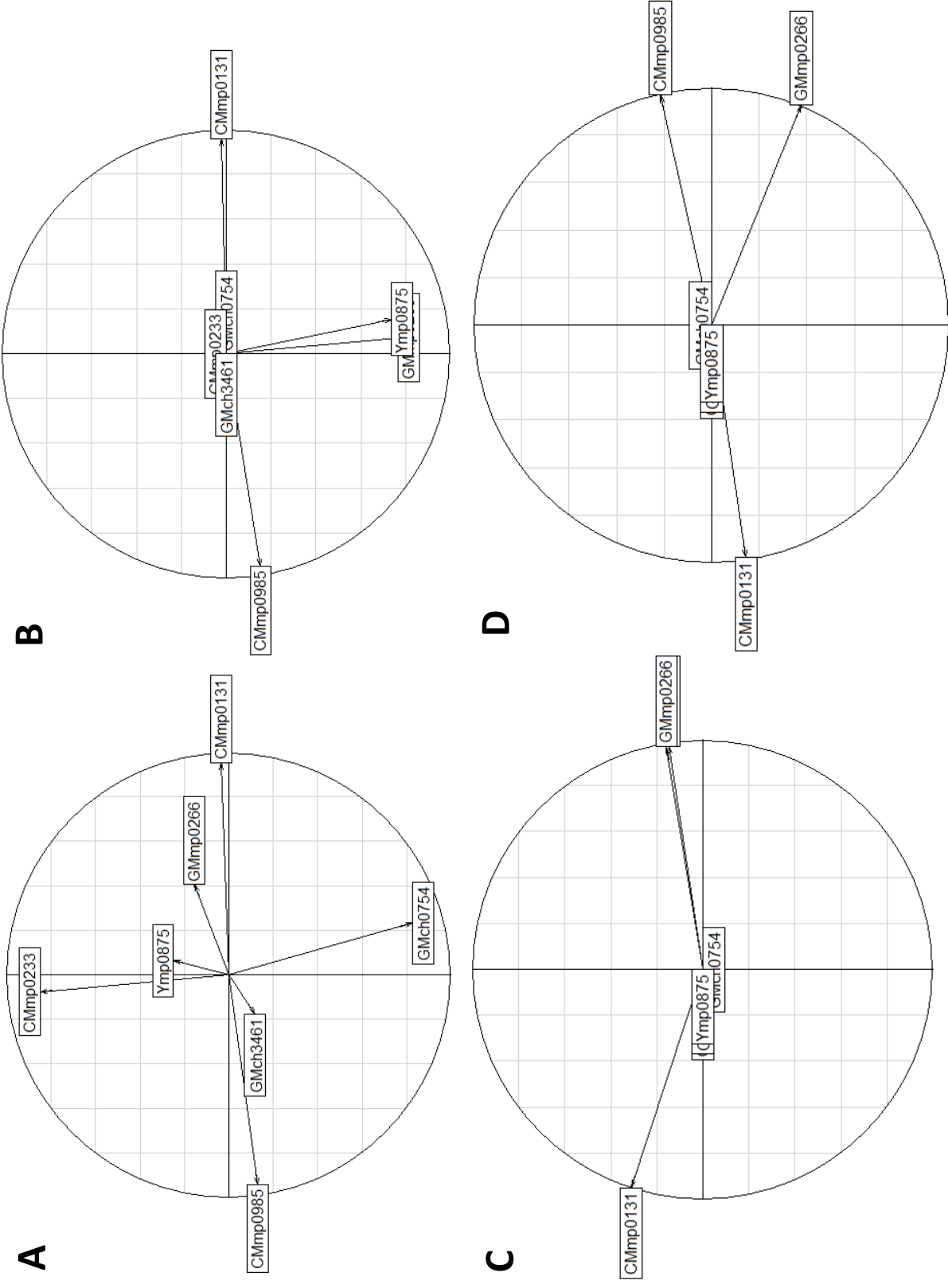


100 jours apres plantation en A2014C5

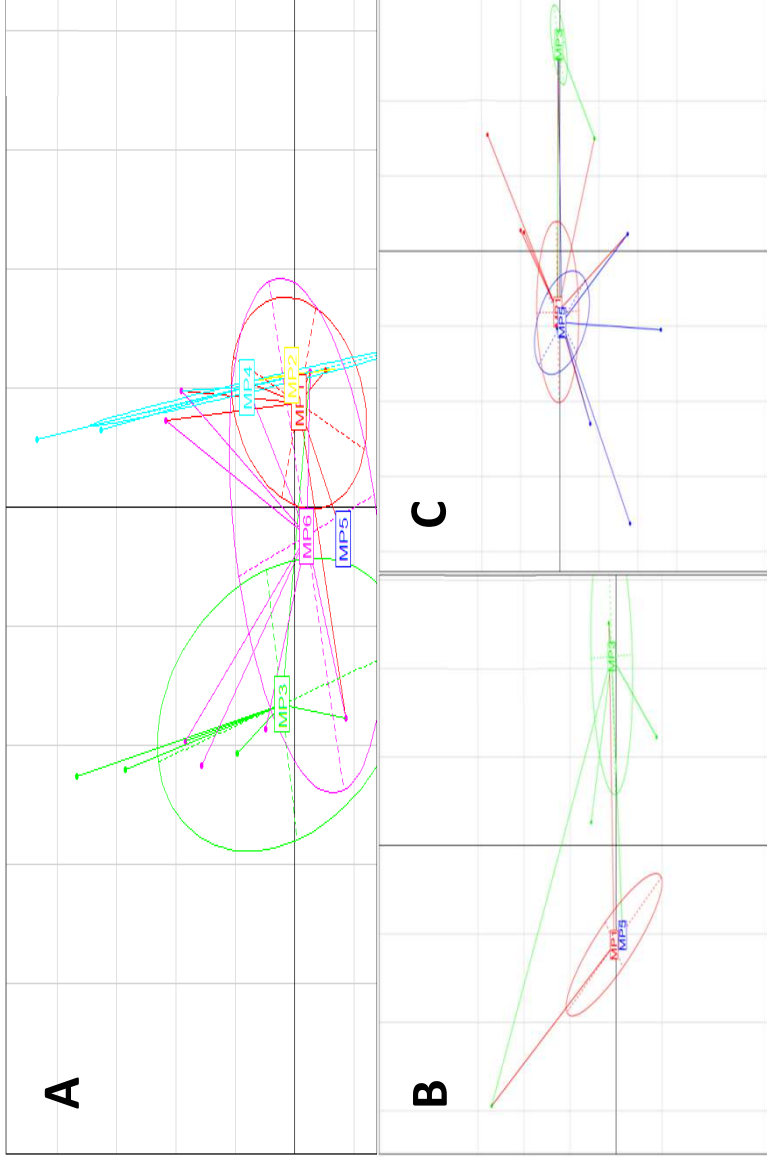


106 jours apres plantation en A2014C5

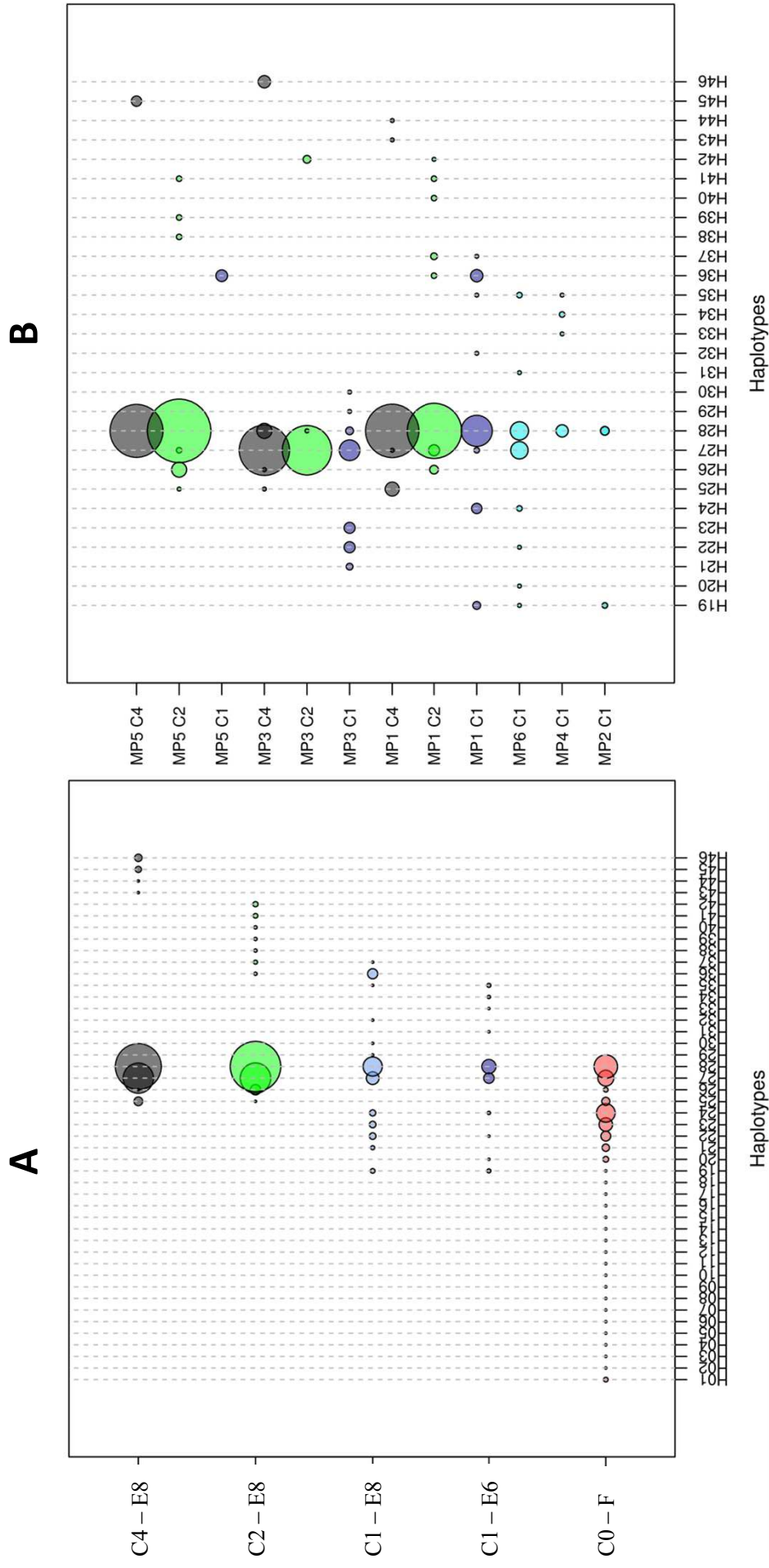




Supplementary Figure S2. Scatter diagram of correlation circle obtained after Principal Component Analysis on the four collections of strains : (A) with strains from C0 (n=319) (B) with strains from C1 (n=223), (C) with strains from C2 (n=684), (D) with strains from C4 (n=593).



Supplementary Figure S3. Scatterplots representing PCA clusters on each susceptible eggplant cycle. (A) “Vallon 2012 C1”, (B) “Vallon 2013 C2” and (C) “Vallon 2014 C4”. MP = Microplot. Figure obtained using the “scatterplot” function in the R package “adegenet”. For each collection, some samples were removed because they were too involved in axis construction. For C1, TM37.10 was removed, for C2 RQ26.07 and RQ26.06 were deleted and for C4, 9 individuals were removed



Supplementary Figure S4. Plot representing haplotypes distribution and frequencies in the different collections. (A) Strains grouped by year and host of isolation. F: tomato; E6: resistant eggplant; E8: susceptible eggplant. (B) Strains grouped by microplot and Crop Cycle (C1 to C4) and C0 was exclude from this plot. MP2, MP4, MP6: E6 microplots; MP1, MP3, MP5: E8 microplots.

Supplementary Table S1_OK.xlsx/TableS1. Experimental field

Table S1. Schematic representation of the experimental field 'Le Vallon'. Blue squares represent sampling point realized during cycle 0 (tomato cv. Farmer 206). Red squares represented sampling point realized during successive eggplant cycle (Cycle 1, Cycle 2 and cycle 4 only). E8 = susceptible eggplant, E6 = resistant eggplant. A to R = lines of plant.

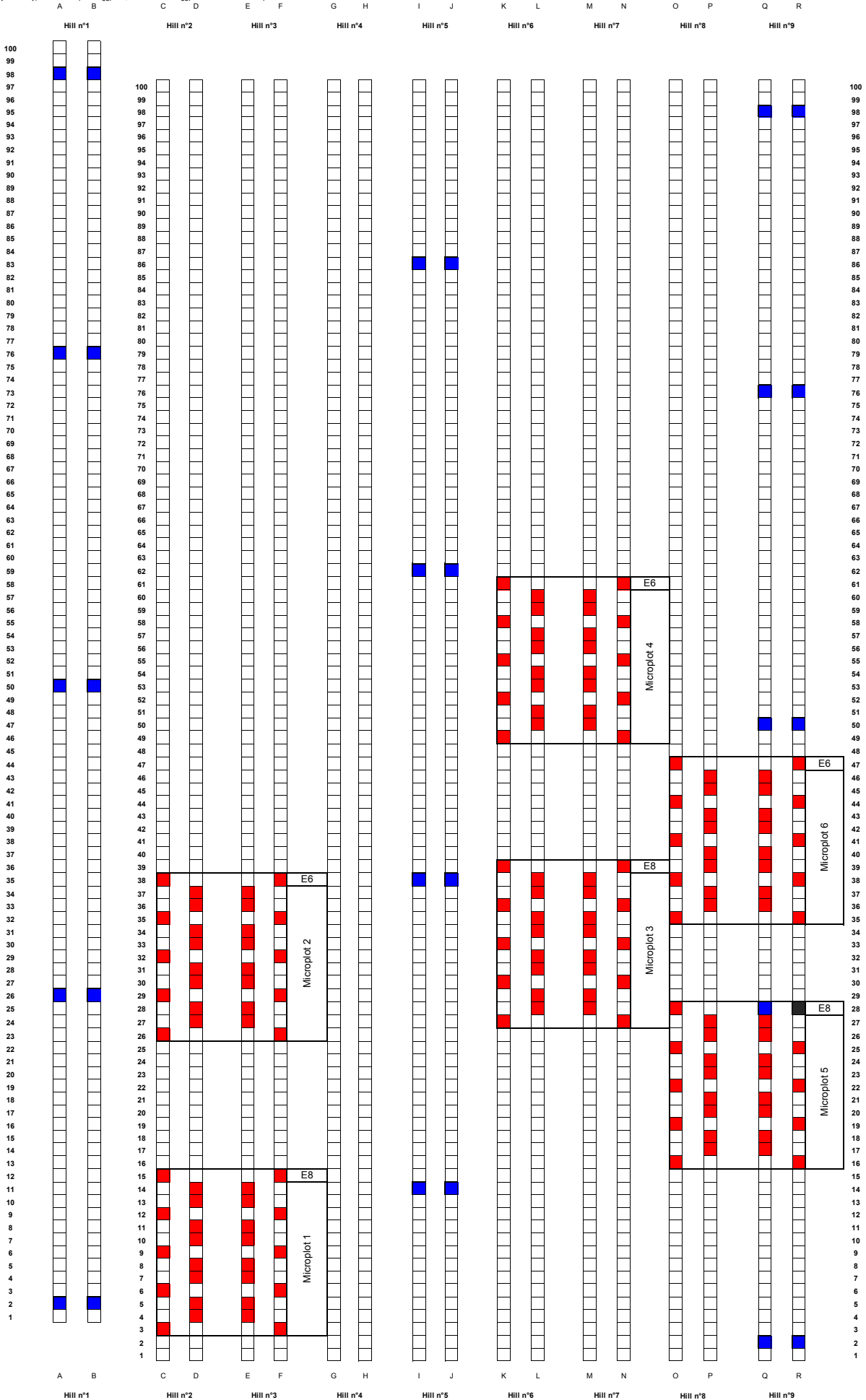


Table S2.1. Estimation of the time to reach 50% of the maximal incidence (TM50), the slope value for the nonlinear regression model, and their 95% confidence interval for each microplot of susceptible eggplant in cycles 1 (2012), cycle 2 and 3 (2013) and cycle 4 and 5 (2014).

Cycle	Microparcelle	TM50 (days)	95% confidence interval (in days)	Slope value	95% confidence interval	AUDPC Value
Cycle 1	Microplot 1	26.1	[10.8 ; 41.4]	0.047	[0.007 ; 0.087]	1528
	Microplot 3	13.1	[11.3 ; 15]	0.115	[0.084 ; 0.146]	1683
	Microplot 5	11.5	[10.8 ; 12.2]	0.152	[0.131 ; 0.174]	2800
Cycle 2	Microplot 1	25.5	[24.9 ; 26.2]	0.103	[0.094 ; 0.111]	4425
	Microplot 3	27.4	[26.2 ; 28.5]	0.095	[0.081 ; 0.108]	4225
	Microplot 5	22.6	[21.8 ; 23.4]	0.110	[0.100 ; 0.121]	4808
Cycle 3	Microplot 1	27.7	[26.5 ; 28.9]	0.094	[0.081 ; 0.107]	6677
	Microplot 3	23.8	[23.1 ; 24.6]	0.117	[0.105 ; 0.130]	7188
	Microplot 5	24.3	[23.7 ; 25.0]	0.138	[0.120 ; 0.156]	7121
Cycle 4	Microplot 1	26.3	[25.7 ; 26.9]	0.088	[0.077 ; 0.099]	8427
	Microplot 3	31.4	[30.2 ; 32.5]	0.087	[0.082 ; 0.093]	8938
	Microplot 5	28.1	[26.5 ; 29.7]	0.069	[0.06 ; 0.079]	8571
Cycle 5	Microplot 1	22.4	[22.3 ; 22.5]	0.334	[0.320 ; 0.348]	8275
	Microplot 3	23.4	[23.1 ; 23.7]	0.217	[0.196 ; 0.237]	8096
	Microplot 5	17.2	[15.5 ; 18.9]	0.634	[0.344 ; 0.924]	8606

Table S2.2. Maximum wilting percentage for the three microplots of susceptible eggplant (E8) during the first crop cycle (C1 - 2012). For the following crop cycles, maximal wilting incidence was 100% in all microplots.

Cycle	Microplot	Maximum wilting percentage (%)	95% confidence interval (in percentage)
Cycle 1	Microplot 1	28.9	[19.8 ; 37.9]
	Microplot 3	24.6	[23.3 ; 25.8]
	Microplot 5	39.4	[38.6 ; 40.3]

Table S3. Statistical comparison of AUDPC value between each cycle of susceptible eggplant (E8). Analysis were performed

Combination	Estimate differences between AUDPC value	Standard Error	t value	p value	Significance
Cycle 2 - Cycle 1	2482.4	323.1	7.682	0.000124	***
Cycle 3 - Cycle 1	4992	323.1	15.448	< 1.10 ⁻⁰⁴	***
Cycle 4 - Cycle 1	6641.8	323.1	20.554	< 1.10 ⁻⁰⁴	***
Cycle 5 - Cycle 1	6322.1	323.1	19.565	< 1.10 ⁻⁰⁴	***
Cycle 3 - Cycle 2	2509.6	323.1	7.766	0.000121	***
Cycle 4 - Cycle 2	4159.5	323.1	12.872	< 1.10 ⁻⁰⁴	***
Cycle 5 - Cycle 2	3839.7	323.1	11.883	< 1.10 ⁻⁰⁴	***
Cycle 4 - Cycle 3	1649.8	323.1	5.106	0.00328	**
Cycle 5 - Cycle 3	1330.1	323.1	4.116	0.014078	*
Cycle 5 - Cycle 4	-319.7	323.1	-0.989	0.854265	NS

Table S2.1. Estimation of the time to reach 50% of the maximal incidence (TM50), the slope value for the nonlinear regression model, and their 95% confidence interval for each microplot of susceptible eggplant in cycles 1 (2012), cycle 2 and 3 (2013) and cycle 4 and 5 (2014).

Cycle	Microparcelle	TM50 (days)	95% confidence interval (in days)	Slope value	95% confidence interval	AUDPC Value
Cycle 1	Microplot 1	26.1	[10.8 ; 41.4]	0.047	[0.007 ; 0.087]	1528
	Microplot 3	13.1	[11.3 ; 15]	0.115	[0.084 ; 0.146]	1683
	Microplot 5	11.5	[10.8 ; 12.2]	0.152	[0.131 ; 0.174]	2800
Cycle 2	Microplot 1	25.5	[24.9 ; 26.2]	0.103	[0.094 ; 0.111]	4425
	Microplot 3	27.4	[26.2 ; 28.5]	0.095	[0.081 ; 0.108]	4225
	Microplot 5	22.6	[21.8 ; 23.4]	0.110	[0.100 ; 0.121]	4808
Cycle 3	Microplot 1	27.7	[26.5 ; 28.9]	0.094	[0.081 ; 0.107]	6677
	Microplot 3	23.8	[23.1 ; 24.6]	0.117	[0.105 ; 0.130]	7188
	Microplot 5	24.3	[23.7 ; 25.0]	0.138	[0.120 ; 0.156]	7121
Cycle 4	Microplot 1	26.3	[25.7 ; 26.9]	0.088	[0.077 ; 0.099]	8427
	Microplot 3	31.4	[30.2 ; 32.5]	0.087	[0.082 ; 0.093]	8938
	Microplot 5	28.1	[26.5 ; 29.7]	0.069	[0.06 ; 0.079]	8571
Cycle 5	Microplot 1	22.4	[22.3 ; 22.5]	0.334	[0.320 ; 0.348]	8275
	Microplot 3	23.4	[23.1 ; 23.7]	0.217	[0.196 ; 0.237]	8096
	Microplot 5	17.2	[15.5 ; 18.9]	0.634	[0.344 ; 0.924]	8606

Table S2.2. Maximum wilting percentage for the three microplots of susceptible eggplant (E8) during the first crop cycle (C1 - 2012). For the following crop cycles, maximal wilting incidence was 100% in all microplots.

Cycle	Microplot	Maximum wilting percentage (%)	95% confidence interval (in percentage)
Cycle 1	Microplot 1	28.9	[19.8 ; 37.9]
	Microplot 3	24.6	[23.3 ; 25.8]
	Microplot 5	39.4	[38.6 ; 40.3]

Table S4. List of strains used in this study, with the localisation and the species of their host of origin, haplotype MLVA, allelic profile, DAPC cluster.

Sample ^a	Pop	Localisation	Cycle	Microplot	Habitat	Host species	Cultivar	Haplotype ^b	Allelic profile using (1) MLVA scheme							DAPC Cluster ^c
									GMmp0233	GMch3461	CMmp0985	GMmp0266	Ymp0875	GMmp0131	GMch0754	
TD03.01	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.03	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.09	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.11	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.12	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.13	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.16	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.17	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.18	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.19	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.20	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.21	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.27	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.28	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.29	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD03.30	TD03	D03	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.01	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.02	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.04	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.05	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.06	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.07	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.10	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.11	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.13	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.15	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.17	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.19	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.20	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD05.22	TD05	D05	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.01	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.11	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.12	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.13	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.15	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.17	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.19	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.20	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.21	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.22	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TD06.24	TD06	D06	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.17	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.18	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.19	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.21	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.22	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.23	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.24	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.25	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
SM28.26	SM28	M28	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H18	9	5	6	2	18	11	15	1
TM29.01	TM29	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TM29.02	TM29	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TM29.04	TM29	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TM29.05	TM29	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1
TM29.06	TM29	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H28	7	5	6	2	18	11	15	1

TM29.14	M29	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	6	5	6	2	18	11	15	2
TM37.10	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	29	2	2
TD08.09	D08	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RD13.02	RD13	C2	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RD13.16	RD13	C2	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RD13.17	RD13	C2	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RD13.18	RD13	C2	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TP21.17	TP21	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RP23.09	RP23	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	17	11	15	2
TP24.12	TP24	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TP24.18	TP24	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TP27.11	TP27	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TP27.12	TP27	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RQ18.05	RQ18	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RQ20.01	RQ20	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RQ20.05	RQ20	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RQ20.07	RQ20	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TQ20.06	TQ20	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TQ20.09	TQ20	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TQ20.19	TQ20	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
RQ26.05	RQ26	C2	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	17	11	15	2
TQ27.09	TQ27	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TQ27.12	TQ27	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TQ27.13	TQ27	C2	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TM37.01	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	11	15	2
TM37.02	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.03	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.04	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.05	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.06	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.07	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.08	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.09	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM37.10	TM37	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
TM38.01	TM38	C4	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	6	5	6	2	18	12	15	2
SM37.23	SM37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	5	4	9	2	19	12	15	3
RD10.01	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD10.02	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD10.03	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD10.05	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD10.06	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD10.08	RD10	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD15.14	RD15	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD15.16	RD15	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD15.18	RD15	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RD15.20	RD15	C1	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.01	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.02	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.03	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.07	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.08	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.10	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ25.11	RQ25	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ27.03	RQ27	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
RQ27.08	RQ27	C1	MP5	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	12	15	3
TD05.07	TD05	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	11	15	3
TD05.08	TD05	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	7	5	6	2	19	11	15	3

TD05.09	TD05	D05	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H36	7	5	6	2	19	12	15	3
TD05.10	TD05	D05	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H36	7	5	6	2	19	12	15	3
TP24.05	TP24	P24	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP24.06	TP24	P24	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP24.10	TP24	P24	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP24.13	TP24	P24	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP24.14	TP24	P24	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP27.08	TP27	P27	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TP27.09	TP27	P27	C4	MP5	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H45	19	5	6	2	20	5	15	4
TK36.13	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H12	6	5	6	3	19	21	17	5
TK36.14	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H08	6	5	6	2	19	21	11	5
TM32.01	TM32	M32	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM32.15	TM32	M32	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.05	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.07	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.08	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.10	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.11	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H01	6	5	6	2	19	2	11	5
SM37.13	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.15	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
SM37.20	SM37	M37	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TN54.11	TN54	N54	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TN54.28	TN54	N54	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H11	6	5	6	2	19	8	11	5
TO44.05	TO44	O44	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H14	6	5	6	3	19	7	5	5
TO44.06	TO44	O44	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TO44.12	TO44	O44	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP37.03	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP37.06	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP37.07	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP37.11	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP37.12	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H07	6	5	6	2	19	11	7	5
TP37.17	TP37	P37	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H01	6	5	6	2	19	2	11	5
SP45.05	SP45	P45	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H01	6	5	6	2	19	2	11	5
SP45.14	SP45	P45	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H01	6	5	6	2	19	2	11	5
SP45.16	SP45	P45	C0	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H01	6	5	6	2	19	2	11	5
TP45.01	TP45	P45	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TP45.02	TP45	P45	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.03	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.07	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.11	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.13	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.17	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.23	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.25	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TM37.28	TM37	M37	C1	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TO37.01	TO37	O37	C1	MP6	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H31	6	5	6	2	19	7	15	5
TO37.04	TO37	O37	C1	MP6	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H22	6	5	6	2	19	2	15	5
TD10.12	TD10	D10	C2	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H42	6	5	6	2	19	11	15	5
TK36.01	TK36	K36	C2	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H42	6	5	6	2	19	11	15	5
TK36.07	TK36	K36	C2	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H42	6	5	6	2	19	11	15	5
TK36.13	TK36	K36	C2	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H42	6	5	6	2	19	11	15	5
TK32.10	TK32	M32	C2	MP3	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H42	6	5	6	2	19	11	15	5
TK36.01	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6
TK36.02	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6
TK36.05	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6
TK36.06	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6
TK36.07	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6
TK36.08	TK36	K36	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H27	6	5	6	2	19	12	15	6

TM32.20	M32	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP17.01	P17	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP17.03	P17	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP17.09	P17	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.01	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.03	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.04	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.06	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.08	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.14	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.16	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SP27.17	P27	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.03	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.06	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.07	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.08	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.11	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.12	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.13	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
SR16.14	R16	NA	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.02	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.11	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.12	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.13	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.14	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.15	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.18	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.21	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR16.22	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H06	6	5	6	2	18	11	7
TR16.23	R16	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.03	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.06	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.08	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.09	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.10	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.11	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.13	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.15	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.16	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.18	R22	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
TR22.20	R22	NA	Stem	<i>Solanum melongena</i>	Farmer	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.07	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.19	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.21	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.25	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.26	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
RD13.27	D13	MPI	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
TD13.24	D13	MPI	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H24	7	5	6	2	18	11	7
TM56.04	M56	MP4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H33	7	5	6	2	18	7	7
TM57.01	M57	MP4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H34	7	5	6	2	18	3	7
TM57.09	M57	MP4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H34	7	5	6	2	18	3	7
TQ42.10	Q42	MP6	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H24	7	5	6	2	18	11	7
TQ45.03	Q45	MP6	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H24	7	5	6	2	18	11	7
TK36.03	K36	NA	Stem	<i>Solanum melongena</i>	Farmer	H23	6	5	6	2	19	12	8
TK36.04	K36	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H04	6	5	6	2	19	12	8
TK36.16	K36	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H20	6	5	6	2	19	12	8
TK36.17	K36	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H05	6	5	5	2	19	12	8

TQ42.07	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TQ42.08	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TQ42.09	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TQ42.10	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TQ42.11	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TQ42.12	TQ42	C0	NA	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TD10.03	TD10	C1	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H37	7	5	6	2	18	12	15	9
RD15.04	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H32	7	5	6	2	18	10	15	9
RD15.05	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H35	7	5	6	2	18	3	15	9
RD15.06	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
RD15.09	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
RD15.10	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
RD15.12	RD15	D15	MP1	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
TF31.01	TF31	F31	MP2	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
TF31.07	TF31	F31	MP2	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
TM50.09	TM50	M50	MP4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H35	7	5	6	2	18	3	15	9
TP44.01	TP44	P44	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H35	7	5	6	2	18	3	15	9
TQ39.04	TQ39	Q39	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H35	7	5	6	2	18	3	15	9
TR44.17	TR44	R44	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E6	H19	7	5	6	2	18	7	15	9
TD05.12	TD05	D05	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H37	7	5	6	2	18	12	15	9
TD10.02	TD10	D10	MP1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H37	7	5	6	2	18	12	15	9
TF12.03	TF12	F12	C2	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H37	7	5	6	2	18	12	15	9
RQ26.11	RQ26	Q26	C2	Rhizosphere	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.01	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.02	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.03	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.04	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.05	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.06	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.07	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.08	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.09	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.10	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.11	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.12	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TF15.14	TF15	F15	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
TL35.13	TL35	L35	C4	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H25	7	5	6	2	18	9	15	9
SM37.09	SM37	M37	C0	Soil	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.14	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.15	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.19	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.22	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.25	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TN54.29	TN54	N54	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H10	6	5	6	2	19	7	12	10
TO44.01	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TO44.02	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H09	6	5	6	2	19	3	12	10
TO44.03	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TO44.07	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TO44.10	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TO44.13	TO44	O44	C0	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H13	6	5	6	3	19	2	12	10
TM37.09	TM37	M37	C1	Stem	<i>Solanum lycopersicum</i>	Farmer	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TM37.15	TM37	M37	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H21	6	5	6	2	19	2	12	10
TM37.18	TM37	M37	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H30	6	5	6	2	19	5	12	10
TM37.22	TM37	M37	C1	Stem	<i>Solanum melongena</i>	E8	H21	6	5	6	2	19	2	12	10

^a Strains are named depending of the zone of origin (R = Rhizosphere; T = Stem; S = Soil), their sampling point on the field and the number of the strains from the sampling point.

^b Haplotype determined using GenALEX v6.5 (2 ; 3).

^c DAPC cluster were determined using 'adegenet' package implemented under R software (4).

1. Guinard J, Latreille A, Guérin F, Poussier S, Wicker E. 2015. A new MLVA scheme for fine-tune monitoring and microevolution study of *Ralstonia solanacearum* phylo type I populations. *BMC Microbiology* soumis.
2. Peakall R, Smouse PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6:288-295.
3. Peakall R, Smouse PE. 2012. GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539.
4. R DCT. 2010. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Table S5. Sample sizes of each 7-loci MLVA haplotype in microplot collections, crop cycle collections, cycle-specificity and habitat specificity.

Haplotype	Allelic Profil							Ymp0875	MP1			MP3			MP5			MP6			Total Collections				Habitat		Global	Cycle specificity
	CMmp0131	GMch0754	CMmp0233	GMch3461	CMmp0985	GMmp0266	Ymp0875		C1	C2	C4	C1	C2	C4	C1	C2	C4	C0	C1	C2	C4	Rhizosphere	Soil	Stem				
H01	6	5	6	2	19	2	11									4								4	C0			
H02	5	4	9	2	19	12	15									1						1			1	C0		
H03	5	5	6	2	18	7	15									1						1			1	C0		
H04	6	5	2	2	19	12	12									1						1			1	C0		
H05	6	5	5	2	19	12	11									1						1			1	C0		
H06	6	5	6	2	18	11	11									1						1			1	C0		
H07	6	5	6	2	19	11	7									1						1			1	C0		
H08	6	5	6	2	19	21	11									1						1			1	C0		
H09	6	5	6	2	19	3	12									1						1			1	C0		
H10	6	5	6	2	19	7	12									1						1			1	C0		
H11	6	5	6	2	19	8	11									1						1			1	C0		
H12	6	5	6	3	19	21	17									1						1			1	C0		
H13	6	5	6	3	19	2	12									1						1			1	C0		
H14	6	5	6	3	19	10	2									1						1			1	C0		
H15	7	5	6	2	18	5	10									1						1			1	C0		
H16	7	5	6	3	18	11	15									1						1			1	C0		
H17	7	5	9	2	18	11	15									1						1			1	C0		
H18	9	5	6	2	18	11	15									1						1			1	C0		
H19	7	5	6	2	18	7	15									2						4			8	C0		
H20	6	5	6	2	19	12	11									1						7			8	C0		
H21	6	5	6	2	19	2	12									6						3			7	C0		
H22	6	5	6	2	19	2	15									10						3			12	C0		
H23	6	5	6	2	19	12	12									18						7			20	C0		
H24	7	5	6	2	18	11	11									34						3			39	C0		
H25	6	5	6	2	19	12	15									64						6			48	C0		
H26	7	5	6	2	18	11	15									12						1			26	C0		
H27	7	5	6	2	18	11	15									4						8			16	C0		
H28	6	5	6	2	18	9	15									20						60			357	C0		
H29	6	5	6	2	18	29	15									102						129			917	C0		
H30	6	5	6	2	19	5	12									1						1			1	C1		
H31	6	5	6	2	19	7	15									1						1			1	C1		
H32	7	5	6	2	18	10	15									1						1			1	C1		
H33	7	5	6	2	18	7	11									1						1			1	C1		
H34	7	5	6	2	18	3	11									2						1			2	C1		
H35	7	5	6	2	18	3	15									1						1			3	C1		
H36	7	5	6	2	19	12	15									19						19			2	C1		
H37	7	5	6	2	18	12	15									1						3			4	C1		
H38	7	4	6	2	18	11	15									1						2			4	C2		
H39	6	5	6	2	17	11	15									2						2			2	C2		
H40	7	5	6	2	19	11	15									2						2			2	C2		
H41	7	5	6	2	17	11	15									2						3			1	C2		
H42	6	5	6	2	19	11	15									1						5			5	C2		
H43	7	5	6	2	5	11	15									1						1			1	C4		
H44	9	5	7	2	18	11	15									1						1			1	C4		
H45	19	5	6	2	20	5	15									7						7			7	C4		
H46	6	5	6	2	18	12	15									10						10			10	C4		
Total général								90	225	205	53	167	195	9	292	193	7	14	50	319	223	684	593	236	85	1498	1819	

Table S6-1. Analysis of molecular variance based on strains grouped according to their host of origin (F, E6 and E8), the microplot (MP) for each cycle (C) they were extracted from. Significance code : *** ≤ 0.001 < ** ≤ 0.01 < * ≤ 0.05 \leq NS (Not Significant).

Groups	Populations
Group 1 = C0	C0 F
Group 2 = C1	C1 E6 MP2 C1 E6 MP4 C1 E6 MP6 C1 E8 MP3 C1 E8 MP5 C1 E8 MP1
Group 3 = C2	C2 E8 MP5 C2 E8 MP3 C2 E8 MP1
Group 4 = C4	C4 E8 MP3 C4 E8 MP1 C4 E8 MP5

Distance method: No. of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	3	105.317	-0.29533	-38.08	0.98119	NS
Among population within groups	9	1445.637	0.71882	92.7	0	***
Among individuals within populations	1806	1271.329	0.35197	45.39	0	***
Total	1818	2822.283	0.77546			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	3	1860.79	0.29514	5.05	0.18594	NS
Among population within groups	9	1876.774	0.89549	15.33	0	***
Among individuals within populations	1806	16800.215	4.65122	79.62	0	***
Total	1818	20537.779	5.84185			

C0, C1, C2 and C4 : Cycle 0, cycle 1, cycle 2 and cycle 4 respectively

F = Farmer

E6 = resistant eggplant cv. E6

E8 = susceptible eggplant cv. E8

MP = Microplot

Table S6-2. Fst and Rst matrix between strains grouped according to their host of origin (F, E6 and E8) and the microplot (MP) for each cycle (C) they were extracted from. Significance code : ***≤0.001 < **≤0.01 < *≤0.05 ≤ NS (Not Significant).

Fst and Rst Matrix		RST																			
		C0 F	C1 E6 MP2	C1 E6 MP4	C1 E6 MP6	C1 E8 MP1	C1 E8 MP3	C1 E8 MP5	C2 E8 MP1	C2 E8 MP3	C2 E8 MP5	C4 E8 MP1	C4 E8 MP3	C4 E8 MP5	C4 E8 MP6	C4 E8 MP8	C4 E8 MP9				
C0 F		0.06042NS	0.05815NS	0.06431**	0.08102***	0.0217NS	0.16004*	0.16334***	0.24451***	0.17808***	0.14776***	0.23859***	0.13334***								
C1 E6 MP2	0.18359*		0.01531NS	0.05873NS	0.13548NS	0.00984NS	0.63916***	0.72454***	0.9493***	0.77974***	0.28965***	0.87291***	0.0437NS								
C1 E6 MP4	0.16336**			0.17631*	0.29503**	0.03098NS	0.3658*	0.71912***	0.84028***	0.76442***	0.52411***	0.81604***	0.21655**								
C1 E6 MP6	0.04398**				0.02876NS	0.02906NS	0.13205NS	0.1451***	0.39982***	0.18387***	0.10817***	0.34892***	0.06673**								
C1 E8 MP1	0.15815***					0.08577***	0.27411**	0.06671***	0.59286***	0.07958***	0.03576**	0.5275***	0.02512**								
C1 E8 MP3	0.26001***						0.07616NS	0.23193***	0.24989***	0.27345***	0.19818***	0.25475***	0.14679***								
C1 E8 MP5	0.31802***							0.83933***	0.92661***	0.90485***	0.52291***	0.5865***	0.14962*								
C2 E8 MP1	0.25063***								0.66763***	0.66591***	0.91569***	0.81376***	0.04789***								
C2 E8 MP3	0.43972***								0.45081***	0.05504***	0.8043***	0.02101***	0.04789***								
C2 E8 MP5	0.30555***								0.64417***	0.8771***	0.27458***	0.94336***	0.38117***								
C4 E8 MP1	0.28859***								0.57926***	0.13497***	0.86627***	0.94665***	0.05271***								
C4 E8 MP3	0.35784***								0.30167***	0.10869***	0.85809***	0.03233***	0.02546*								
C4 E8 MP5	0.28244***								0.79955***	0.42108***	0.13044***	0.82582***	0.35417***								
									0.23571*	0.53702***	0.10795***	0.02593***	0.85925***								

C0, C1, C2 and C4 : Cycle 0, cycle 1, cycle 2 and cycle 4 respectively

F = Farmer

E6 = resistant eggplant cv. E6

E8 = susceptible eggplant cv. E8

MP = Microplot

Table S7. Hierarchical analysis of molecular variance based on strains grouped according to the microplot (MP) for each cycle (C) they were extracted from. Significance code : *** \leq 0.001 < ** \leq 0.01 < * \leq 0.05 \leq NS (Not Significant).

MP1 vs MP2

Groups	Populations
Group 1 = MP1	D15 C1 E8 MP1
	D10 C1 E8 MP1
	D13 C1 E8 MP1
	E04 C1 E8 MP1
Group 2 = MP2	F31 C1 E6 MP2

Distance method: Number of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	0.867	-0.1681	-49.52	0.80257	NS
Among populations within groups	3	23.519	0.24194	71.28	0.000	***
Among individuals within populations	92	48.871	0.26561	78.25	0.000	***
Total	96	73.257	0.33945			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	14.733	-0.20073	-6.41	0.60059	NS
Among populations within groups	3	84.441	0.76146	24.3	0.0095	**
Among individuals within populations	92	473.362	2.57262	82.1	0.0000	***
Total	96	572.536	3.13335			

MP3 vs MP4

Groups	Populations
Group 1 = MP3	M32 C1 E8 MP3
	M30 C1 E8 MP3
	M37 C1 E8 MP3
Group 2 = MP4	M57 C1 E6 MP4
	M56 C1 E6 MP4
	M50 C1 E6 MP4

Distance method: Number of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	39.891	0.64141	36.91	0.30168	NS
Among populations within groups	4	24.286	0.68113	39.2	0.000	***
Among individuals within populations	58	48.167	0.41523	23.89	0.000	***
Total	63	112.344	1.73777			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	76.685	3.6184	13.6	0.09911	NS
Among populations within groups	4	74.388	-4.80844	-18.07	0.79218	NS
Among individuals within populations	58	3224.583	27.79813	104.47	0	***
Total	127	3375.656	26.6081			

MP5 vs MP6

Groups	Populations
Group 1 = MP5	Q27 C1 E8 MP5 Q25 C1 E8 MP5
Group 2 = MP6	O37 C1 E6 MP6 O38 C1 E6 MP6 O39 C1 E6 MP6 P44 C1 E6 MP6 Q39 C1 E6 MP6 Q42 C1 E6 MP6 Q45 C1 E6 MP6 R44 C1 E6 MP6

Distance method: Number of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	12.081	0.01893	1.92	0.53079	NS
Among populations within groups	8	73.05	0.84457	85.88	0.000	***
Among individuals within populations	49	11.75	0.1199	12.19	0.000	***
Total	58	96.881	0.9834	0		

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value	Significativity
Among groups	1	32.009	-0.21939	-3.57	0.47218	NS
Among populations within groups	8	258.16	2.28982	37.22	0.00515	**
Among individuals within populations	49	400	4.08163	66.35	0	***
Total	58	690.169	6.15206			

C0, C1, C2 and C4 : Cycle 0, cycle 1, cycle 2 and cycle 4 respectively

F = Farmer

E6 = resistant eggplant cv. E6

E8 = susceptible eggplant cv. E8

MP = Microplot

Table S9. Hierarchical analyse of molecular variance (AMOVA) performed on “coupled populations” from the same microplot but from different cycles. Significance code : *** ≤ 0.001 < ** ≤ 0.01 < * ≤ 0.05 \leq NS (Not Significant).

D07 vs E08						
Groups	Populations					
Group 1 = D07	RD07 C2					
	TD07 C2					
Group 2 = E08	RE08 C2					
	TE08 C2					

Distance method: Number of different alleles (FST)						
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	1	0.304	0.00394	9.06	0.33267	NS
Among populations within groups	2	0.257	0.0024	5.52	0.51297	NS
Among individuals within populations	44	3.273	0.03719	85.43	0.00842	**
Total	47	3.834	0.04353			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)						
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	1	0.304	0.00394	9.06	0.32584	NS
Among populations within groups	2	0.257	0.0024	5.52	0.51634	NS
Among individuals within populations	44	3.273	0.03719	85.43	0.00703	**
Total	47	3.834	0.04353			

D10 vs D13						
Groups	Populations					
Group1 = D10	RD10 C1					
	TD10 C1					
Group2 = D13	RD13 C1					
	TD13 C1					

Distance method: Number of different alleles (FST)						
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	17.568	0.29672	51.08	0.33337	NS
Among habitat of location	2	12.881	0.16846	29	0	***
within location	70	16.2	0.11571	19.92	0	***
Total	73	46.649	0.58089			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)						
Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	22.203	0.29259	15.28	0.3403	NS
Among habitat of location	2	25.381	0.27098	14.15	0.01089	*
within location	70	189.2	1.35143	70.57	0	***
Total	73	236.784	1.915			

M37 vs K36

Groups	Populations
Group 1 = M37	RM37 C1 TM37 C1
Group = K36	TK36 C2 RK36 C2

Distance method: Number of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	1.842	-0.01299	-5.82	0.67644	NS
Among habitat of location	2	5.526	0.0612	27.42	0	***
within location	78	27.291	0.17494	78.4	0	***
Total	81	34.659	0.22315			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	153.84	0.14359	0.84	0.66594	NS
Among habitat of location	2	274.528	2.76671	16.28	0.01455	*
within location	78	2197.704	14.08785	82.88	0	***
Total	81	2626.072	16.99815			

Q20 vs Q26

Groups	Populations
Group 1 = Q20	RQ20 C2 TQ20 C2
Group 2 = Q26	RQ26 C2 TQ26 C2

Distance method: Number of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	0.779	0.00722	4.89	0.33931	NS
Among habitat of location	2	0.522	-0.00059	-0.4	0.42436	*
within location	68	19.172	0.14097	95.51	0	***
Total	71	20.473	0.1476			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among location	1	0.872	0.00696	3.67	0.33416	NS
Among habitat of location	2	0.745	0.00023	0.12	0.34802	*
within location	68	24.772	0.18215	96.2	0	***
Total	71	26.389	0.18934			

C0, C1, C2 and C4 : Cycle 0, cycle 1, cycle 2 and cycle 4 respectively

F = Farmer

E6 = resistant eggplant cv. E6

E8 = susceptible eggplant cv. E8

MP = Microplot

Table S10-1. Hierarchical analysis of molecular variance on strains grouped according to their microplot 1 (MP1) and cycles (C) of origin. Populaion are subdivided according to the habitat they were extracted from (R : rhizosphere, S : stem).

Groups	Populations
Group 1 = C1 MP3	S-C1-MP3
	R-C1-MP3
Group 2 = C2 MP3	R-C2-MP3
	S-C2-MP3

Distance method: No. of different alleles (FST)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	1	3.573	-0.00175	-0.87	0.33921	NS
Among population within groups	2	6.389	0.02403	11.88	0.00079	***
Among individuals within populations	311	111.962	0.18	88.98	0	***
Total	314	121.924	0.20228			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
Among groups	1	18.057	0.04199	4.37	0.32802	NS
Among population within groups	2	12.034	0.03603	3.75	0.12069	NS
Among individuals within populations	311	549.566	0.88355	91.89	0	***
Total	313	561.6	0.91958			

C1 and C2 : Cycle 1 and cycle 2 respectively
 MP = Microplot
 R: rhizosphere, S: stem

Table S10-2. Fst and Rst matrix between strains extracted from microplot 3 (MP3) and from different cycle (C). Populaion are subdivided according to their habitat of origin (R: rhizosphere, S: stem). Significance code : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (Not Significant).

Fst and Rst Matrix		RST			
		R-C1-MP1	R-C2-MP1	S-C1-MP1	S-C2-MP1
FST	R-C1-MP1		0.05778*	0.03121NS	0.12426***
	R-C2-MP1	0.18437***		0.01953NS	0.06869**
	S-C1-MP1	0.15435***	0.02257NS		0.04051*
	S-C2-MP1	0.15647***	0.03252NS	0.02481NS	

C1 and C2 : Cycle 1 and cycle 2 respectively
 MP = Microplot
 R: rhizosphere, S: stem

Table S10-3. Hierarchical analysis of molecular variance on strains grouped according to their microplot 3 (MP3) and cycles (C) of origin. Populaion are subdivided according to the habitat they were extracted from (R : rhizosphere, S : stem). Significance code : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (Not Significant).

Groups	Populations
Group 1 = C1 MP3	S-C1-MP3
	R-C1-MP3
Group 2 = C2 MP3	R-C2-MP3
	S-C2-MP3

Distance method: No. of different alleles (FST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
groups	1	10.373	0.02525	11.55	0.33188	NS
groups	2	9.119	0.06003	27.45	0	***
populations	216	57.626	0.13339	61	0	***
Total	219	77.118	0.21867			

Distance method: Sum of squared size difference (RST)

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	P value	Significativity
groups	1	369.846	1.00473	11.04	0.33396	NS
groups	2	302.91	1.94576	21.38	0.0105	*
populations	216	2657.08	6.15065	67.58	0	***
Total	218	2959.99	8.09641			

C1 and C2 : Cycle 1 and cycle 2 respectively

MP = Microplot

R: rhizosphere, S: stem

TableS10-4. Fst and Rst matrix between strains extracted from microplot 3 (MP3) and from different cycle (C). Populaion are subdivided according to their habitat of origin (R: rhizosphere, S: stem). Significance code : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (Not Significant).

Fst and Rst Matrix		RST			
		S-C1-MP3	R-C1-MP3	R-C2-MP3	S-C2-MP3
FST	S-C1-MP3		0.17962**	0.2059***	0.43135***
	R-C1-MP3	0.28109***		0NS	0.00397NS
	R-C2-MP3	0.31404***	0NS		0.00842NS
	S-C2-MP3	0.49982***	0.00397NS	0.00842NS	

C1 and C2 : Cycle 1 and cycle 2 respectively

MP = Microplot

R: rhizosphere, S: stem

Table S11. One dimension and two dimension Isolation By Distance (IBD) realized on each cycle (total) and on each microplot (MP). Significance code: *** ≤ 0.001 ** ≤ 0.01 * ≤ 0.05 ≤ 0.1 NS (Not Significant).

Cycle	Microplot	Genetic differentiation index	IBD	Z statistic between geographic and genetic matrix		Correlation between geographic and genetic matrix		Null hypothesis that $r=0$		Null hypothesis that $r=1$		Linear regression		r^2	p -value
				IBD	IBD	$r=0$	p	$r=1$	p	IBD	p	IBD	p		
C0	Total	One dimension	Fst	311028.5302	0.3065	$p = 0.9950$	$p = 0.0050$	0.0009412xDISTGEO+1.0924998	0.08716	0.0002849***					
			Rst	813.2578	0.3214	$p = 0.9970$	$p = 0.0030$	0.7131xlog(DISTGEO)-2.7115	0.09662	0.0001359***					
			Rst	48779.2601	0.0088	$p = 0.5760$	$p = 0.4240$	1.163e-05xDISTGEO+0.3535	-0.007385	0.9192 ^{NS}					
	MP1	Two dimension	Fst	145.1665	0.0669	$p = 0.7220$	$p = 0.2780$	0.06403xlog(DISTGEO)-0.05889	-0.002949	0.45388 ^{NS}					
			Rst	391.5128	-0.7464	$p = 0.041$	$p = 1$	-0.003943xDISTGEO+1.531348	0.4463	0.08834 ^{NS}					
			Rst	6.7125	-0.7632	$p = 0.0740$	$p = 0.9660$	-0.8811xlog(DISTGEO)+5.2600	0.478	0.07749 ^{NS}					
C1	MP3	One dimension	Fst	136.7639	-0.8246	$p = 0.0900$	$p = 0.9490$	-0.0016129xDISTGEO+0.6108748	0.5999	0.04346*					
			Rst	2.5813	-0.7181	$p = 0.0790$	$p = 0.9620$	-0.3070xlog(DISTGEO)+1.8500	0.3946	0.108 ^{NS}					
			Rst	800854.7166	-0.9175	$p = 0.354$	$p = 0.812$	-52.61xDISTGEO+13154.76	0.6838	0.2603 ^{NS}					
	MP4	Two dimension	Fst	19037.1097	-0.9657	$p = 0.354$	$p = 0.829$	-8597xlog(DISTGEO)+47221	0.865	0.1673 ^{NS}					
			Rst	799888.1738	-0.9177	$p = 0.3300$	$p = 0.8430$	-52.63xDISTGEO+13156.54	0.6842	0.2602 ^{NS}					
			Rst	19028.6265	-0.9657	$p = 0.3300$	$p = 0.8430$	-8599xlog(DISTGEO)+47231	0.8653	0.1671 ^{NS}					
C2	MP6	One dimension	Fst	801104.3863	-0.3329	$p = 0.4500$	$p = 0.5960$	-10.65xDISTGEO+3442.88	-0.1115	0.5191 ^{NS}					
			Rst	19042.2133	-0.1972	$p = 0.4500$	$p = 0.5960$	-826.7xlog(DISTGEO)+5614.2	-0.2014	0.7081 ^{NS}					
			Rst	800073.9382	-0.3329	$p = 0.4710$	$p = 0.5680$	-10.65xDISTGEO+3442.35	-0.1115	0.5191 ^{NS}					
	Total	Two dimension	Fst	19030.6678	-0.1972	$p = 0.4800$	$p = 0.5650$	-827.1xlog(DISTGEO)+5615.0	-0.2014	0.708 ^{NS}					
			Rst	36068.95	0.0094	$p = 0.5930$	$p = 0.4070$	0.008574xDISTGEO+5.7313647	-0.03837	0.962 ^{NS}					
			Rst	369.4247	0.1033	$p = 0.2470$	$p = 0.7530$	-1.547xDISTGEO+14.007	-0.02738	0.6008 ^{NS}					
C3	MP3	One dimension	Fst	3766.3135	-0.1235	$p = 0.1950$	$p = 0.8050$	-0.0012001xDISTGEO+0.936730	-0.02263	0.5314 ^{NS}					
			Rst	41.6156	-0.202	$p = 0.0640$	$p = 0.9360$	-0.3240xlog(DISTGEO)+2.3714	0.003909	0.3026 ^{NS}					
			Rst	18952222.2	-0.0079	$p = 0.3970$	$p = 0.6030$	-0.03858xDISTGEO+947.76632	-0.004303	0.9044 ^{NS}					
	Total	Two dimension	Fst	597392.4787	-0.0001	$p = 0.4240$	$p = 0.5760$	-0.2826xlog(DISTGEO)+914.3548	-0.004367	0.9999 ^{NS}					
			Rst	189119085.3	-0.0075	$p = 0.4290$	$p = 0.5710$	-0.03637xDISTGEO+942.99902	-0.004311	0.9999 ^{NS}					
			Rst	595671.7717	0.0002	$p = 0.4570$	$p = 0.5430$	0.7816xlog(DISTGEO)+904.6561	-0.004367	0.9971 ^{NS}					
C4	MP1	One dimension	Fst	2991.0653	-0.2025	$p = 0.1770$	$p = 0.8230$	-0.000811xDISTGEO+0.4202008	0.02603	0.1029 ^{NS}					
			Rst	37.0222	-0.1912	$p = 0.1850$	$p = 0.8150$	-0.13891xlog(DISTGEO)+0.97803	0.02149	0.1241 ^{NS}					
			Rst	3053.2781	-0.2076	$p = 0.1570$	$p = 0.8430$	-0.0008461xDISTGEO+0.4333676	0.09442	0.02814*					
	MP3	Two dimension	Fst	37.8943	-0.193	$p = 0.1970$	$p = 0.8$	-0.14273xlog(DISTGEO)+1.00396	0.02222	0.1206 ^{NS}					
			Rst	105.5659	-0.1271	$p = 0.3330$	$p = 0.6670$	11.82xlog(DISTGEO)-2576.50	0.5457	0.0000004776***					
			Rst	105.5659	-0.086	$p = 0.5870$	$p = 0.7060$	2777.30xlog(DISTGEO)-14492.1	0.3022	0.0001721***					
C5	MP5	One dimension	Fst	1.0851	-0.086	$p = 0.4030$	$p = 0.5970$	-0.003600xlog(DISTGEO)+0.032442	-0.0218	0.618 ^{NS}					
			Rst	1148.9759	0.0352	$p = 0.6720$	$p = 0.3280$	2.075e-05x(DISTGEO)+4.515e-02	-0.008454	0.7211 ^{NS}					
			Rst	11.8263	-0.0352	$p = 0.4380$	$p = 0.5620$	-0.003778x(DISTGEO)+0.069462	-0.008458	0.7215 ^{NS}					
	Total	Two dimension	Fst	1171.6354	0.0167	$p = 0.5660$	$p = 0.4340$	9.924e-06 x(DISTGEO)+4.899e-02	-0.009426	0.865 ^{NS}					
			Rst	12.1673	-0.0466	$p = 0.3770$	$p = 0.6230$	-0.005036x(DISTGEO)+0.077559	-0.007517	0.637 ^{NS}					
			Rst	86033235.2	0.1457	$p = 0.9940$	$p = 0.0060$	0.9460x(DISTGEO)+557.4105	0.01966	0.0002439***					
C6	MP3	One dimension	Fst	2506426.109	0.1906	$p = 1.0000$	$p < 0.0010$	712.3xlog(DISTGEO)+3220.0	0.03479	1.447e-06***					
			Rst	860357724.2	0.1457	$p = 0.9960$	$p = 0.0040$	0.9460x(DISTGEO)+557.3616	0.01967	0.0002435***					
			Rst	2506470.612	0.1906	$p = 1.0000$	$p < 0.0010$	712.3xlog(DISTGEO)+3220.2	0.03479	1.445e-06***					
	MP4	Two dimension	Fst	19504.799	0.2454	$p = 0.9460$	$p = 0.0540$	0.002298x(DISTGEO)+0.230948	0.05228	0.006893***					
			Rst	138.7046	0.2079	$p = 0.9530$	$p = 0.0470$	3.5690xlog(DISTGEO)-2.4977	0.03513	0.02267*					
			Rst	16786.3349	0.2096	$p = 0.9110$	$p = 0.0890$	3.8598x(DISTGEO)+843.4798	0.2355	0.0000002011***					
C7	MP3	One dimension	Fst	139.6803	0.1827	$p = 0.9130$	$p = 0.0870$	440.6xlog(DISTGEO)+2276.3	0.05711	0.00478***					
			Rst	64152.4042	0.0052	$p = 0.5550$	$p = 0.4450$	-0.1677xlog(DISTGEO)+3.2685	-0.008118	0.8384 ^{NS}					
			Rst	654.7299	-0.0188	$p = 0.4880$	$p = 0.5120$	0.0002334x(DISTGEO)+2.3282967	-0.008448	0.9554 ^{NS}					
	Total	Two dimension	Fst	62917.4789	0.0005	$p = 0.5600$	$p = 0.4400$	-0.1821xlog(DISTGEO)+3.2993	-0.008052	0.8244 ^{NS}					
			Rst	641.9322	-0.0205	$p = 0.4350$	$p = 0.5650$	0.0002254x(DISTGEO)+2.2844050	-0.008449	0.9568 ^{NS}					
			Rst	2686.8449	-0.0782	$p = 0.3090$	$p = 0.6910$	-0.001778x(DISTGEO)+0.1476091	-0.002307	0.3959 ^{NS}					
C8	MP4	One dimension	Fst	29.421	-0.0696	$p = 0.3320$	$p = 0.6770$	-0.02985xlog(DISTGEO)+0.26610	-0.003586	0.4499 ^{NS}					
			Rst	62917	0.0005	$p = 0.5600$	$p = 0.4400$	-0.001778x(DISTGEO)+0.1476091	-0.002307	0.3959 ^{NS}					
			Rst	641.9322	-0.0205	$p = 0.4350$	$p = 0.5650$	-0.001778x(DISTGEO)+0.1476091	-0.002307	0.3959 ^{NS}					
	Total	Two dimension	Fst	2729284096	0.1499	$p = 0.9980$	$p = 0.0020$	-0.02985xlog(DISTGEO)+0.26610	-0.003586	0.4499 ^{NS}					
			Rst	8713670.182	0.2501	$p = 1.0000$	$p < 0.0010$	1.3411xlog(DISTGEO)+1569.8626	0.0216	4.262e-07***					
			Rst	2728204033	0.1497	$p = 0.9920$	$p = 0.0080$	1.3399x(DISTGEO)+1570.0380	0.06171	< 2.2e-16***					
C9	Total	Two dimension	Fst	8710854.025	0.2499	$p = 1.0000$	$p < 0.0010$	1.278.5log(DISTGEO)+5532.9	0.06163	< 2.2e-16***					

C0, C1, C2 and C4: Cycle 0, cycle 1, cycle 2 and cycle 4 respectively
MP = Microplot

Table S13A. Analysis of variance (ANOVA) on disease incidence data in order to test the hypothesis that the cycle of origin of our strains have an effect on the strains aggressiveness (hypothesis 1). (A) ANOVA performed to test the trial effect between the two trial repetition. (B) ANOVA realized to test the effect of the cycle of origin on the aggressiveness of our strains (hypothesis 1). Dataset used in these analysis is the one presented in TableS12 (experiment 1). Significance code : P : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (NS: Not Significant).

A. ANOVA on disease incidence for 3 strains common to the two trials and inoculated on susceptible (E8).

Effect	Degree of freedom	Deviance	Residual degree of freedom	Residual Dev	Pr(>Chi)	Statistical significance
Null			11	24.6187		
Strain	2	3.1979	9	21.4208	0.2021	NS
Trial	1	15.4419	8	5.979	8.51E-05	***
Strains:trial	2	3.6058	6	2.3732	0.1648	NS

B. ANOVA on AUDPC data for strains inoculated on susceptible (E8) eggplant.

Strain effect							
Trial	Effect	Degree of freedom	Sum Square	Mean Square	F value	Pr(>F)	Statistical significance
1	Strain	9	3228503	358723	4.4916	0.014	*
	Residuals	10	798646	79865			
2	Strain	9	1634531	181615	3.624	0.02861	*
	Residuals	10	501146	50115			

Cycle effect							
Trial	Effect	Degree of freedom	Sum Square	Mean Square	F value	Pr(>F)	Statistical significance
1	Cycle	1	302170	302170	1.4602	0.2425	NS
	Residuals	18	3724979	206943			
2	Cycle	1	185281	185281	1.7099	0.2074	NS
	Residuals	18	1950396	108355			

Table S13B. Analyse of variance (ANOVA) on disease incidence data in order to test the selection of strains by resistant eggplant hypothesis. (A) ANOVA performed to test the trial effect between the two trial repetition. (B) ANOVA realized to test the effect of the cultivar of origin on the aggressiveness of our strains (hypothesis 2). Dataset used in these analysis is the one presented in TableS12 (experiment 2). Significance code : P : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (NS: Not Significant).

A. ANOVA on disease incidence for 4 strains common to the two trials and inoculated both on resistant

Effect	Degree of freedom	Deviance	Residual degree of freedom	Residual deviance	Pr(>Chi)	Statistical significance
NULL			43	435.13		
Strain	6	3.9	37	431.23	0.6905	NS
Trial	1	2.06	36	429.17	0.1511	NS
Cultivar	1	371.24	35	57.93	<2e-16	***
Strain*trial ii	3	1.29	32	56.64	0.7311	NS
Strain*cultiv	6	8.96	26	47.68	0.1758	NS
Trial*cultiva	1	0.09	25	47.58	0.7597	NS
Strain*trial*c	3	4.3	22	43.28	0.2307	NS

B. ANOVA on AUDPC data for strains inoculated both on resistant (E6) and susceptible (E8) eggplant.

Effect	Degree of freedom	Deviance	Residual degree of freedom	Residual deviance	Pr(>Chi)	Statistical significance
Strain	6	200376	33396	0.4482	0.8405	NS
Cultivar	1	23187956	23187956	311.168	<2e-16	***
Strain*cultiv.	6	21705	3618	0.0485	0.9995	NS
Residuals	30	2235573	74519			

Table S13C. Analyse of variance (ANOVA) on disease incidence data in order to test the hypothesis strains E6-isolated (resistant eggplant) are more aggressive than E8-isolated strains (susceptible eggplant). **(A)** and **(B)** ANOVA performed respectively on disease incidence data and on AUDPC data to test the cultivar of origin effect on strain aggressiveness. Dataset used in these analysis is the one presented in TableS12 (experiment 1 and 2). Significance code : P : *** \leq 0.001<*** \leq 0.01<*** \leq 0.05 \leq NS (NS: Not Significant).

A. ANOVA on disease incidence for strains isolated on resistant (E6) and susceptible (E8) eggplant and inoculated on E8.

Trial	Effect	Degree of freedom	Deviance	Residual degree of freedom	Residual deviance	Pr(>Chi)	Statistical significance
1	NULL			5375	7441.6		
	Cultivar of origin	1	344.03	5374	7097.6	< 2.2e-16	***
	Repetition	1	29.38	5373	7068.2	6.31E-08	***
	Cultivar of origin	1	1.47	5358	6880.6	0.2268	NS
2	NULL			4703	6258.6		
	Cultivar of origin	1	107.08	4702	6151.6	< 2.2e-16	***
	Repetition	1	12.192	4701	6139.4	0.0004936	***
	Cultivar of origin	1	0.023	4688	5968.7	0.8808966	NS

B. ANOVA on AUDPC data for strains isolated on resistant (E6) and susceptible (E8) eggplant and inoculated on E8.

Trial	Effect	Degree of freedom	Sum Square	Mean Square	F value	Pr(>F)	Statistical significance
1	Cultivar of origin	1	638081599	638081599	969.6753	<2e-16	***
	Repetition	1	48040781	48040781	73.0063	<2e-16	***
	Cultivar of origin	1	1045284	1045284	1.5885	0.2076	NS
	Residuals	5372	3534971204	658036			
2	Cultivar of origin	1	190148503	190148503	323.6615	< 2.2e-16	***
	Repetition	1	20581276	20581276	35.0324	3.47E-09	***
	Cultivar of origin	1	414586	414586	0.7057	0.4009	NS
	Residuals	4700	2761211651	587492			

ANNEXES 3

Annexe 3.1. Phylotypes, origines géographiques, années et hôtes d'isolement des 91 souches représentatives de la phylogénie des phylotypes I, II et III de *R. solanacearum* sélectionnées pour cette étude. Les génomes des souches RUN0017, 36, 54 et 133 sont des génomes de référence des phylotypes IIB, IIA, I et III respectivement, et ont déjà été séquencés, publiés et sont disponibles dans les banques de données internationales.

Numéro RUN	Code	Nom alternatif	Phylotype	Hôte	Origine géographique	Localité	Année	Phenotype sur E6
17	CFBP6783	ANT75 - CIR02-075	IIB	<i>Heliconia caribea</i>	Martinique	Morne Rouge	2002	2
36	CFBP2957	MT5 - RUN0027	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Martinique	Case Pilote	1987	NA
39	CFBP3059	RUN0031	III	<i>Solanum melongena</i>	Burkina Faso	Vallée du Kou	1990	NA
47	CIP365	WP144	I	<i>Solanum tuberosum</i>	Philippines	NA	1989	NA
54	GMI1000	JS753	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane Française	Kourou	1978	0
58	JQ1143	NA	IIA	<i>Solanum tuberosum</i>	Ile de la Réunion	Bois Court	NA	1
59	JT510	NA	IIB	<i>Solanum tuberosum</i>	Ile de la Réunion	Notre Dame De La Paix (1700m)	1993	0
85	PSS190	RUN0273 - RUN0266	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	Taipei (North)	1995	NA
104	UW395	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Afrique du sud	Transvaal	1986	NA
106	UW397	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Afrique du sud	Transvaal	1986	NA
108	UW399	NA	I	<i>Nicotinia tabacum</i>	Afrique du sud	Transvaal	1986	NA
133	CMR15	CFBP6941	III	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Obala (ZAE5)	2005	NA
145	CFBP6942	CMR32	III	<i>Solanum scabrum</i>	Cameroun	Dschang (ZAE3)	2005	0
147	CFBP7029	CMR34 - RUN0275	IIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Baham (ZAE3)	2005	4
150	CFBP7032	CMR39	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroun	Dschang (ZAE3)	2005	NA
155	PSS366	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	Yunlin (West)	2003	NA
156	PSS216	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	Hsinchu (NW)	1996	NA
157	PSS4	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	Tainan (South West)	1988	4
158	ACH92	JS834	I	<i>Zingiber officinale</i>	Australie	Queensland (Nambour)	1966	NA
159	CMR	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	Yunlin (West)	2003	NA

Numéro RUN	Code	Nom alternatif	Phylotype	Hôte	Origine géographique	Localité	Année	Phenotype sur E6
215	CFBP7058	CMR134	I	<i>Solanum scabrum</i>	Cameroun	Bafia (ZAE5)	2005	NA
353	02-035	8307	I	<i>Capsicum annuum</i>	Martinique	Marigot	2002	NA
356	02-045	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne-des-Esses	2002	NA
523	CFBP4963	07-029	IIIC	<i>Solanum tuberosum</i>	Ile de la Réunion	NA	NA	0
657	CFBP2146	LNPV30.04	IIIC	<i>Pelargonium asperum</i>	Ile de la Réunion	NA	1980	1
811	02-048	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne des Esses	2002	NA
928	JQ1023	NA	IIIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	Ile de la Réunion	Mont Vert	1993	3
941	JQ1131	NA	IIIB	<i>Solanum tuberosum</i>	Ile de la Réunion	Piton Hyacinthe	1992	4
969	TO10	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang	2003	NA
994	RS82	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
996	JCRS23	TM-CR01-1 (CR3)	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
997	JCRS35	EP-CR03-1.0	I	<i>Solanum melongena</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
999	JCRS01	TM-CR0	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
1002	RS67	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1008	RS70	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1013	RS53	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Hazaribagh, Bihar	1997	NA
1029	RS22	NA	I	<i>Capsicum sp.</i>	Inde	Bhubaneswar, Orissa	1996	NA
1032	JCRS26	TM-HS02-1.1	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	NA	NA
1039	RS15	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	1995	NA
1040	RS32	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Bangalore, Karnataka	1997	NA
1042	RS14	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thaïlande	Chiang Rai	1995	NA
1047	RS51	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Inde	Hazaribagh, Bihar	1997	NA
1050	RS48	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA
1109	RS43	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA

Numéro RUN	Code	Nom alternatif	Phylo type	Hôte	Origine géographique	Localité	Année	Phenotype sur E6
1114	RS66	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
1143	02-047	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Martinique	Morne des Esses	2002	NA
1216	RS79	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1998	NA
1234	RS35	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Bangalore, Karnataka	1997	NA
1240	RS44	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonésie	Magelang, Central Java	1997	NA
1251	RS69	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Inde	Chikballapur, Karnataka	1998	NA
1533	CIV3	429	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon P7	2010	1
1538	CIV8	433	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon P8	2010	1
1539	CIV9	434	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Songon P8	2010	2
1546	CIV16	441	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Anguédédou	2010	3,1
1739	CIV18	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Bonoufia	2010	2
1740	CIV19	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Daloo	2010	2
1743	CIV22	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Daloo	2010	2
1744	CIV23	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Man	2010	2
1747	CIV26	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra P1	2010	4
1753	CIV32	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra P2	2010	5
1756	CIV35	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra P2	2010	3,2
1761	CIV40	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta P2	2010	4
1762	CIV41	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta P1	2010	1
1771	CIV49	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Souandala P1	2010	2
1792	CIV55	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Djebonoua-Kondoukro	2010	5
1793	CIV56	NA	III	<i>Solanum melongena</i>	Côte d'Ivoire	Djebonoua-Kondoukro	2010	2
1802	CIV65	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Agnibilekro-Attobro (Appromponou)	2010	1

Numéro RUN	Code	Nom alternatif	Phylotype	Hôte	Origine géographique	Localité	Année	Phenotype sur E6
1854	CIV98	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Yamoussoukro Nanan	2011	2
1861	CIV105	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta Houphouékrö (Divo)	2011	1
1867	CIV111	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Datta Houphouékrö (Divo)	2011	1
1884	CIV128	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Pakobo (Tiassalé)	2011	1
1898	CIV142	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2011	1
1900	CIV144	NA	I	<i>Solanum lycopersicum</i>	Côte d'Ivoire	Sinfra	2011	5
1916	CIV160	NA	I	<i>Capsicum annuum</i>	Côte d'Ivoire	Bassam	2011	1
1924	CIV168	NA	I	<i>Croton hirsutum</i>	Côte d'Ivoire	Bassam	2011	2
1947	CIR011-076	NA	IIB	<i>Capsicum annuum</i>	Guyane Française	Cacao	2011	3,2
1966	CIR011-152	NA	IIB	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Wayabo	2011	2
1976	CIR011-187	NA	IIB	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Corossoni 1	2011	2
1984	CIR011-206	NA	I	<i>Capsicum annuum</i>	Guyane Française	Javouhey	2011	NA
1986	CIR011-208	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Javouhey	2011	5
1987	CIR011-209	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Javouhey	2011	NA
1992	CIR011-219	NA	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Javouhey	2011	NA
1992	CIR011-239	NA	IIB	<i>Cucurbita pepo</i>	Guyane Française	Cacao	2011	2
1994	CIR011-242	NA	IIA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane Française	Montsinéry	2011	2
2004	CIR011-253	NA	IIB	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guyane Française	Corossony 1	2011	2
2174	012-011	E2A1	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Saint Laurent du Maroni	2012	NA
2175	012-012	E2A2	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Saint Laurent du Maroni	2012	NA
2176	012-013	E2A3	I	<i>Solanum melongena</i>	Guyane Française	Saint Laurent du Maroni	2012	NA

Annexe 3.2. Amorces PCR utilisées pour l'amplification des gènes de ménage et des gènes d'ET3.

Objectif	Gène	Domaine fonctionnel et fonction	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	T _m (°C)	T° d'hybridation	Taille attendu (bp)	Nombre de cycles	Référence
	<i>gyrB</i>	ADN gyrase, sous-unité B	gyrB-Rs113F	GGCACGGCCCTGCACCACC	63,08	63	1152	25	Cette étude
			gyrB-Rs-1264R	GCCCTTGGGGCGCGTCACTC	63,25				
	<i>gdhA</i>	glutamate déshydrogénase, NADP-spécifique, protéine oxydoréductase	gdhA-Rs-204F	CCGCATCGCCCACTTCGAG	58,06	54	1049	30	Cette étude
			gdhA-Rs-1252R	TGCAGAAATCCGGCTACAGGC	57,44				
	<i>leuS</i>	leucyl-tARN synthétase	leuS-Rs-29F	TCGAACAGCAGCGCGCAGCAACAC	62,78	59	978	30	Cette étude
			leuS-Rs-1006R	CGACCCACACGGGCACGGC	63,08				
Amplification des gènes de ménages pour	<i>rplB</i>	protéine L2 sous-unité 50S ribosomique	rpIB-RS01F	ATGGCACTCGTCAAGACCAA	53,75	50	814	30	Cette étude
			rpIB-RS814R	TTAACGCTTGTGACGGCG	53,26				
MLSA	<i>mutS</i>	Protéine du système de réparation des mésappariements de l'ADN	mutS-RsF.1570	ACAGGCCTTGAAGCCGGTACA	66	66	758	30	Prior et Fegan, 2005
			mutSRsR1926	GCTGATCACCGGCCCGAACAT					
	<i>adk</i>	adénylate kinase	AdkF	TCTGTTGGGGCCACCCGGC	62	62	420	30	Castillo et Greenberg, 2007
			AdkR	CCCAGCCGGAGTAGTAGTCC					
	<i>egl</i>	précurseur de l'endoglucanase	Endo-F	ATGCATGCCGCTGGTCCGCCG	70	70	750	30	Fegan et Prior, 2005
			Endo-R	GGTTGCCCGGCACGGAACACC					
	<i>fljC</i>	flagelline	Rsol-fljC-F	GAACGCCAACGGTGCGAAC	63	63	400	30	Schönfeld et al, 2003
			Rsol_fljC-R	GGCGGCCTTCAGGGAGGTC					
Amplification des ET3	RipPI	Acétyltransférase putative	ripPIE-260F	AAAAATCGGCACCTGTCAACC	59,7	55	947	30	Cette étude
			ripPIE-1214R	TGAACACCGTTGTCAGCGAT	60,3				
			rip1-GE_943F	TCATTATCTTGGAGCCGGCC	59,9				
			rip1-GE_1749R	GTCATCTCTGACGTAGCCGG	60,0				

RipP2	Acétyltransférase	popP2GE_169F	GAAGACTCCGGCCAAACCA	55	1189	30	Cette étude
		popP2GE_1357R	CGCAATCCCGCTTTTGCTC				
		popP2GE_126F	CAGTTATTTGGGGGGGCTCTCGTT	60,06			
		popP2GE_2090R	GCGGCTTCGAGTTGTTCCTTCGAGTT	60,01	1964	30	Cette étude
		ripP2E-O_404F	CAAAACGTAGCCACACCTAC	60,0			
		ripP2E-O_1358R	TCCTCGCCGAAATTCGTATT	60,1	949	30	Cette étude
		ripP2-E-O_1054F	GTCACTGAAAAACGTCGCAA	59,9			
		ipP2-E_O_1953R	TGGCTCTCCATCCAAATCGA	60,0	891	30	Cette étude
		ripG3E1-3_180F	GCTATCTCGTGAATGCCGC	59,1			
		ripG3E1-3_1177R	CTCGTCGCCGATCTGGTTC	60,6	997	30	Cette étude
RipG3	Protéine F-box LRR	ripG3E1-3_1425F	TCACGACCGCTGTTGATCGAA	60	791	30	Cette étude
		ripG3E1_2227R	TCAAATCCGCAGCGTCAAG	61,4			
		ripN-E_363F	GAATCCACGGCTTCTTCGC	59,9			
		ripN-E_1173R	GGTGTGGCCGATGTAGTTCA	60	811	30	Cette étude
Rip N	Domaine nudix hydrolase	ripN-E_905F	CGATGCAGCATTCGGTCAAC	60,2	1027	30	Cette étude
		ripN-E_1931R	GGACTTCCTGCCGGAGAT	59,5			
		ripAX2-ph1_309F	TGTAICTGCCCCCATCAGTTG	59,8			
		ripAX2-ph1_1167R	TTCAGGGAGCCATTGACAA	60,3	858	30	Cette étude
RipAX2	Zinc-dépendant metallo-protéase	ripEIE_282F	GTTCCGAGGTCAGGCCGAC	61,4			
		ripEIE_1155R	CCAGAAAGTGGTCGAAGTCGT	60,4	822	30	Cette étude
		ripEIE_975F	CATCCAGGAATCCATGTGGC	59,6			
		ripEIE_1970R	AGCGGCAFGTTCAICGTCAA	61,1	992	30	Cette étude
RipAU		ripAU-E-phly3_327F	GGGCACCCGGTTCGTTT	61,8			
		ripAU-E-phly3_1433R	CCCCATCTCCCGTTTGATA	60,7	1106	30	Cette étude
		ripAU-E-ph2-302F	CGACACCTGTTCGTTTGCC	60,4			
		ripAU-E-ph2_1265R	TCCACCGTCCGTTGTGATC	61	964	30	Cette étude
RipAJ		ripAU-E-phly3_327F	TGATCTCTCGGCCGTGG	60,6			
		ripAU-E-phly3_1433R	GAAAACACGGCAGCTGGAG	59,8	1178	30	Cette étude
		ripAU-E-ph2-302F	CAGACTGATGAACGTGGCGA	61	732	30	Cette étude

	ripAU-E-ph2_1265R	ATGGATGCGCAGGCTCTGATT	60.4			
	ripAZIE_69F	GGAACGGGAGGGGAAAGAC	61.1	57	775	30
	ripAZIE_858R	GCCAAAAATCCGGCGCTTG	61.3			
	ripAZIE_70F	GAACGGGAGGGGAAAGACAT	60.4	56	1527	30
RipAZI	ripAZIE_1635R	GACATGCTCAAACCACTGC	60			
	ripAZIE_840F	GCAAAGCCGCCGATTTTGG	61.3	56	519	30
	ripAZI_1376R	ATCCGCTGTCAATCCGAG	60.8			
	ripAS-Ephly3_391F	CCGAGTGAGCCCGTCCAT	62.9	58	755	30
	ripAS-Ephly3_1370R	GGCGGCAGGCTGTAGAAG	61.8			
	ripAS-Ephly3_1146F	CAGGGTCACGCTGTCCA	60.7	57	987	30
	ripAS-Ephly3_2132R	ATCAGCCGTGGAGAGATGTC	60.1			
RipAS	ripAS-Ephly3_2050F	CTGGAGCGGGCCATTACAG	61.9	57	943	30
	ripAS-Ephly3_2992R	CGTACCCGGTTCCAGGCATC	61.6			
	ripAS-Ephly3_2624F	TGAAACCTGGCCGATGAGG	60.2	57	800	30
	ripAS-Ephly3_3423R	CCGTCCCGTTCAACTTCTA	61			
Clonage dans le vecteur pEDV-6	RipAX2	Zinc-dépendant metallo-protéase ripAX2_GMII000_F CACCATGCTTATACAGACACAGTACCCCTGGGTTTTAC ripAX2_GMII000_R TTATGCGTTGGGTGGCTTG	61.82 62.98	57	657	35
Vérification de l'insertion du gène dans le vecteur pENTR	sites M13	M13_F GTAAAACGACGGCCAG M13_R CAGGAAACAGCTATGAC	51.51 44.37	58	Taille de l'effecteur + site d'attache M13	30
Vérification de l'insertion du gène dans le vecteur pEDV-6	sites avrRps4	avrRps4(pEDV6)_F TTCAAACCAGTTCAGTAAAATTCCA avrRps4(pEDV6)_R GTGACGATGAGCCAAATTGA	57.26 58.07	58	Taille de l'effecteur + site d'attache avrRps4	35
						Thermo Fisher Scientific Fabro et al., 2011

Annexe 3.3. Programmes PCR modifiés pour les couples d'amorces pour l'amplification des effecteurs sélectionnés. Les programmes PCR encadrés en rouge correspondent au programme pour lequel le maximum d'amplifications (sans bandes aspécifiques) a été obtenu parmi les souches soumises à l'amplification PCR.

Annexe 3.3.A. Programmes PCR pour les amorces internes

RipP1 = RSc0826 Primers 19F/1103R	
Programme 3	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	90 sec
72°	90 sec
72°	10 min
12°	pause
35 cycles	

RipP2 = RSc0868 Primers 169F/1357R	
Programme 2	
96°	5 min
94°	30 sec
52°	90 sec
72°	90 sec
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

RipG3 = RSp0023 Primers 537F/1448R	
Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

RipAX2 = RSp0572 Primers 60F/527R	
Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
55°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

RipE1 = RSc3369 Primers 665F/1278R	
Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

RipAJ = RSc2101 Primers ph1-488F/1319R	
Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

RipN = RSp1130 Primers 123F/1353R	
Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
56°	1 min
72°	2 min
72°	10 min
12°	pause
30 cycles	

Annexe 3.3.B. Programmes PCR pour les amorces externes.

RipP1 = RSc0826 Primers 260F/1214R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
55°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipP2 = RSc0868 Primers 3' ripP2E-O-1054F/1953R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
63°	1 min
72°	2 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipP1 = RSc0826 Primers 943F/1749R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipG3 = RSp0023 Primers 3' ripG3E1-3_180F/1177R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
56°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipP2 = RSc0868 Primers popP2-G-E126F/2090R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
63°	1 min
72°	2 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipG3 = RSp0023 Primers 5' ripG3E1-3_1425F/2227F

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipP2 = RSc0868 Primers 5' ripP2E-O-0404F/1358R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	2 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipE1 = RSc3369 Primers 3' ripE1E-282F/1155R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipE1 = RSc3369 Primers 5' ripE1E-957F/1970R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipN = RSp1130 Primers 5' ripN-E-363F/1173R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
56°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipAJ = RSc2101 Primers 5' ripAJ-ph1-25F/1226R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
57°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

RipN = RSp1130 Primers 3' ripN-E-905F/1931R

Programme 1	
96°	5 min
94°	30 sec
56°	1 min
72°	1 min
72°	10 min
12°	pause

30 cycles

Programme 1		
96°	5 min	
94°	30 sec	30 cycles
56°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 1		
96°	5 min	
94°	30 sec	30 cycles
56°	1 min	
72°	90 sec	
72°	10 min	
12°	pause	

RipAJ = RSc2101 Primers 3' ripAJ-ph1-701F/1432R

RipAX2 = RSp0572 Primers ripAX2-ph1-309F/1167R

Programme 1		
96°	5 min	
94°	30 sec	30 cycles
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

Programme 1		
96°	5 min	
94°	30 sec	30 cycles
57°	1 min	
72°	1 min	
72°	10 min	
12°	pause	

ABSTRACT

Ralstonia Solanacearum is a soilborn beta-proteobacterium responsible of bacterial wilt on Solanaceous crops. This bacterium is considered as one of the most harmful plant disease worldwide. This bacterium possesses the ability to infect more than 250 different species, including crops with major economic importance (tomato, potato, tobacco, eucalyptus...). *R. solanacearum* is divided into four phylotypes originated from different areas: I (Asian), IIA and IIB (American), III (African), IV (Indonesian). Among these phylotype, phylotype I is currently in demographic expansion, is highly recombinogenic and has a wide hosts range. Thus, altogether, these characteristics demonstrated that this phylotype has a high evolutionary potential (*sensu* McDonald and Linde, 2002). In order to control this bacterium, genetic plant resistance seems to be the most promising method. This method consists in using cultivars with different source of resistance such as resistance genes and/or resistant QTLs. The AG91-25 (E6), an eggplant cultivar possessing a major resistance gene (*ERs1*), is capable to control some of phylotype I strains of *R. solanacearum*. However, in order to optimize the management of this resistance and to avoid its fast breakdown, we need to deeply investigate the durability of this resistant gene. Durability can be estimated by studying the evolutionary potential of our pathogen faced to E6 source of resistance and by understanding the molecular mechanisms underlying the interaction between the host (*R* gene) and its pathogene (Type III Effector – T3E).

In order to study *R. solanacearum* evolutionary dynamics under selective pressure from E6 resistant cultivar, we set up an experimental evolution trial in the field. This trial consisted of three couples of resistant (E6) and susceptible eggplants (E8) microplots, implanted twice a year during three years, hence consisting of 5 cycles. A Multi-Locus VNTR Analysis (MLVA) scheme, consisting of 8 minisatellite *loci*, was developed in order to characterize the strains extracted from these crop cycles. These VNTRs were specific to *R. solanacearum* phylotype I strains, they were highly polymorphic and discriminatory at different scale: globally, regionally and locally.

Our results showed no breakdown of E6 resistance by *R. solanacearum* populations, which confirms that this resistance is durable. It seemed that this cultivar reduced the soil bacterial population, preventing bacterial population to infest the resistant host. At the same time, 100% of the E8 plants have died, starting at cycle 2. Bacterial wilt seemed to spread with a “plant-to-plant” dynamics within each microplot. Genetic diversity reduction was also observed during the successive cycle of susceptible eggplant, associated with the increase of frequency of two main haplotypes. However, we failed to identify a clear genetic structuration, neither at the plot scale nor at the microplot scale. Nevertheless, isolation-by-distance data seemed to show that a spatial structure is currently establishing. Altogether, our results suggested that our plot populations appeared to have a clonal epidemic structure.

We also looked into 10 T3Es’ involvement in the interaction between *R. solanacearum* and the resistant eggplant (E6). Their distribution was completely different within a collection of phylogenetically diverse strains (91 strains): *ripAJ* and *ripEI* are the most shared T3Es whereas *ripPI* and *ripP2* were the less common T3E within our collection of strains. Some T3Es showed few (*ripAJ*) or no length polymorphism at all (*ripEI* and *ripP2*) whereas some other (*ripAU*) are extremely polymorphic. Nevertheless, the T3E effector repertoire did not seemed to be correlated to a specific phenotype on E6 eggplant. Yet, we identified the effector gene *ripAX2* as having avirulence function on E6 resistant eggplant. Its recognition by E6 seemed to occur in the hypocotyle region rather than in the mesophyll, highlighting a possible organ-specificity of the interaction between *ERs1* and *ripAX2*. However, this effector variability and its genomic environment did not seem to be associated with the *R. solanacearum* strains virulence on E6.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, molecular epidemiology, genetic structure, type III effector, gene repertoire, MLVA

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Ralstonia solanacearum, une bêta-proteobactérie d'origine tellurique, est l'une des phyto bactérioses les plus nuisibles au niveau mondial. Cette bactérie est capable d'infecter plus de 250 espèces différentes dont certaines présentent un intérêt économique majeur (tomate, pomme de terre, tabac). *R. solanacearum* est divisée en 4 phylotypes distincts présentant des origines géographiques différentes : I (asiatique), IIA et IIB (américain), III (africain), IV (indonésien). Parmi ces phylotypes, le phylotype I est en expansion démographique, hautement recombino gène, réparti mondialement et possède une large gamme d'hôtes. Il possède donc un fort potentiel évolutif (*sensu* McDonald et Linde, 2002). Afin de contrôler cette bactérie, la lutte génétique reste la méthode la plus prometteuse : elle consiste à déployer des cultivars possédant différents sources de résistance (i.e., des gènes de résistance). La variété d'aubergine AG91-25 (E6) possède un gène majeur de résistance (*ERs1*) lui permettant de contrôler certaines souches de *R. solanacearum* de phylotype I. Cependant, la gestion de cette résistance requiert d'étudier au préalable sa durabilité afin d'en éviter le contournement. Cette durabilité peut être estimée en étudiant le potentiel évolutif d'un agent pathogène face à cette source de résistance, ainsi qu'en décryptant les mécanismes moléculaires de l'interaction entre l'hôte (gène *R*) et le pathogène (effecteur de types trois).

Afin d'étudier la dynamique évolutive de *R. solanacearum* sous une pression de sélection exercée par la variété résistante E6, nous avons mis en place un essai d'évolution expérimentale au champ. Cet essai est composé de trois couples de microparcelles d'aubergines résistantes E6 et d'aubergines sensibles E8, implantées deux fois par an, pendant trois ans (soit 5 cycles). Un schéma MLVA (« Multi-Locus VNTR Analysis ») composé de 8 *loci* minisatellites a été développé afin de caractériser les souches extraites de ces cycles de cultures. Ces VNTR sont spécifiques aux souches de *R. solanacearum* de phylotype I, hautement polymorphes et discriminants à toutes les échelles : mondiale, régionale et locale.

Nos résultats démontrent une absence de contournement de la résistance d'E6 par les populations parcellaires de *R. solanacearum*, confirmant le caractère durable de cette résistance. Cette variété aurait fortement réduit les populations bactériennes du sol, ne leur permettant plus d'infecter l'hôte résistant. Parallèlement, 100% des plants d'E8 sont morts à partir du cycle 2. La maladie au sein des microparcelles semble progresser selon une dynamique de « plante-à-plante ». Une baisse de la diversité génétique a aussi été observée au cours des cycles de culture répétés d'E8, associée à l'augmentation en fréquence de deux haplotypes. Cependant, aucune structuration génétique claire n'a été observée à l'échelle de la parcelle entière ou de la microparcelle. En revanche, les données d'isolement par la distance semblent indiquer qu'une structure spatiale semble être en cours d'établissement. L'ensemble de nos résultats suggère une structure épidémique clonale de nos populations parcellaires.

Nous nous sommes aussi intéressés à l'implication de 10 ET3 dans l'interaction *R. solanacearum* vs aubergine résistante (E6). La distribution des 10 ET3 candidats est variable au sein d'une collection de souches phylogénétiquement diverses (91 souches) : *ripAJ* et *ripE1* sont les ET3 les plus partagés alors que *ripP1* et *ripP2* sont les moins fréquemment. Certains ET3 présentent peu (*ripAJ*) voire pas (*ripE1* et *ripP2*) de polymorphisme de taille, alors que d'autres (*ripAU*) sont extrêmement polymorphes. Cependant la composition en effecteurs d'une souche ne semble pas être corrélée à un phénotype sur aubergine E6. Nous avons identifié le gène d'effecteur *ripAX2* comme ayant une fonction d'avirulence sur aubergine résistante E6. Sa reconnaissance par E6 semble s'opérer au niveau de la zone hypocotylaire. Cependant, la variabilité de cet effecteur ainsi que son environnement génomique ne semblent pas être associés à la virulence des souches de *R. solanacearum* sur E6.

Mots clés : *Ralstonia solanacearum*, flétrissement bactérien, épidémiologie moléculaire, structure génétique, effecteur de type III, répertoire de gènes, MLVA.

LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Jérémy GUINARD**....., en ma qualité de doctorant(e) de l'Université de La Réunion, déclare être conscient(e) que le plagiat est un acte délictueux passible de sanctions disciplinaires. Aussi, dans le respect de la propriété intellectuelle et du droit d'auteur, je m'engage à systématiquement citer mes sources, quelle qu'en soit la forme (textes, images, audiovisuel, internet), dans le cadre de la rédaction de ma thèse et de toute autre production scientifique, sachant que l'établissement est susceptible de soumettre le texte de ma thèse à un logiciel anti-plagiat.

Fait à Saint Pierre, le 10/03/2016

Signature :



Extrait du Règlement intérieur de l'Université de La Réunion
(validé par le Conseil d'Administration en date du 11 décembre 2014)

Article 9. Protection de la propriété intellectuelle – Faux et usage de faux, contrefaçon, plagiat

L'utilisation des ressources informatiques de l'Université implique le respect de ses droits de propriété intellectuelle ainsi que ceux de ses partenaires et plus généralement, de tous tiers titulaires de ces droits.

En conséquence, chaque utilisateur doit :

- utiliser les logiciels dans les conditions de licences souscrites ;
- ne pas reproduire, copier, diffuser, modifier ou utiliser des logiciels, bases de données, pages Web, textes, images, photographies ou autres créations protégées par le droit d'auteur ou un droit privatif, sans avoir obtenu préalablement l'autorisation des titulaires de ces droits.

La contrefaçon et le faux

Conformément aux dispositions du code de la propriété intellectuelle, toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle d'une œuvre de l'esprit faite sans le consentement de son auteur est illicite et constitue un délit pénal.

L'article 444-1 du code pénal dispose : « Constitue un faux toute altération frauduleuse de la vérité, de nature à causer un préjudice et accomplie par quelque moyen que ce soit, dans un écrit ou tout autre support d'expression de la pensée qui a pour objet ou qui peut avoir pour effet d'établir la preuve d'un droit ou d'un fait ayant des conséquences juridiques ».

L'article L335_3 du code de la propriété intellectuelle précise que : « Est également un délit de contrefaçon toute reproduction, représentation ou diffusion, par quelque moyen que ce soit, d'une œuvre de l'esprit en violation des droits de l'auteur, tels qu'ils sont définis et réglementés par la loi. Est également un délit de contrefaçon la violation de l'un des droits de l'auteur d'un logiciel (...) ».

Le plagiat est constitué par la copie, totale ou partielle d'un travail réalisé par autrui, lorsque la source empruntée n'est pas citée, quel que soit le moyen utilisé. Le plagiat constitue une violation du droit d'auteur (au sens des articles L 335-2 et L 335-3 du code de la propriété intellectuelle). Il peut être assimilé à un délit de contrefaçon. C'est aussi une faute disciplinaire, susceptible d'entraîner une sanction.

Les sources et les références utilisées dans le cadre des travaux (préparations, devoirs, mémoires, thèses, rapports de stage...) doivent être clairement citées. Des citations intégrales peuvent figurer dans les documents rendus, si elles sont assorties de leur référence (nom d'auteur, publication, date, éditeur...) et identifiées comme telles par des guillemets ou des italiques.

Les délits de contrefaçon, de plagiat et d'usage de faux peuvent donner lieu à une sanction disciplinaire indépendante de la mise en œuvre de poursuites pénales.