



**HAL**  
open science

**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**

Aurore Lebeau

► **To cite this version:**

Aurore Lebeau. 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. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2010. Français. NNT: 2010LARE0026 . tel-00752358

**HAL Id: tel-00752358**

**<https://theses.hal.science/tel-00752358>**

Submitted on 15 Nov 2012

**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**  
**Faculté des Sciences et Technologies**

**UMR « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en milieu Tropical »**  
**CIRAD – Université de la Réunion**

**THÈSE**

Pour obtenir le diplôme de

**DOCTORAT**

Discipline : Sciences  
Formation Doctorale : Interactions plante-microorganisme  
Ecole Doctorale Interdisciplinaire E.D.I. n°0445

**Resistance 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.**

Présentée par

**Aurore LEBEAU**

Soutenue le 15 décembre 2010 devant le jury composé de :

Pascale BESSE, *Professeur, Université de la Réunion*  
Caitilyn ALLEN, *Professeur, Université du Wisconsin*  
Maria MANZANARES-DAULEUX, *Professeur, Agrocampus Ouest, Rennes*  
Marie-Christine DAUNAY, *Ingénieur de Recherche, INRA Avignon*  
Jacques DINTINGER, *Chargé de Recherche, CIRAD Réunion*  
Philippe PRIOR, *Directeur de Recherche, INRA/CIRAD Réunion*

Présidente du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

---

Les travaux de recherche présentés dans ce mémoire de thèse sont le fruit de trois années passées à l'UMR de PVBM au CIRAD 3P à Saint-Pierre, à la Réunion. A ce titre, je tiens à remercier Bernard Reynaud, directeur de l'UMR, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je remercie les différents partenaires privés, Vilmorin & Cie, Enza Zaden, Rijk Zwaan, Nunems, Gautier Semences et De Ruiter Seed qui ont financé ce travail de thèse.

Je remercie très sincèrement tous les membres de mon jury de thèse, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail : Pascale Besse, qui a accepté la présidence de ce jury, Caitilyn Allen et Maria Manzanara-Dauleux, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.

Au-delà de l'acquisition de techniques, de connaissances et du raisonnement scientifique, cette thèse m'a permis de gagner en maturité. Tout ceci n'aurait pu être réalisé sans un ensemble de personnes qui ont contribué de près comme de loin, au bon déroulement de mes travaux et à qui j'adresse mes plus sincères remerciements ainsi que mon plus profond respect.

Un grand merci à Philippe Prior, mon directeur de thèse, pour ses encouragements, ses conseils, son aide précieuse. Mes remerciements vont aussi à ma co-encadrante de thèse, Marie-Christine Daunay qui m'a accueillie dans son bureau, et m'a fait partager sa sagesse et ses conseils. Je les remercie tous les deux d'avoir cru en moi pour mener à bien cette recherche. Je remercie Jacques Dintinger, qui a encadré ce travail, sans qui la génétique serait restée un monde obscur, je le remercie pour la disponibilité dont il a fait preuve à mon égard. Je remercie Emmanuel Wicker avec qui j'ai partagé le même bureau. Je le remercie pour ses conseils, discussions et corrections.

Je remercie aussi les membres du Comité de Thèse qui ont contribué à enrichir ce travail de recherche, A. Frary, T. Jaunet. Je remercie aussi les chercheurs du CIRAD Réunion, notamment Fred Chiroleu, pour les soutiens en stat, et de l'INRA d'Avignon, Mathilde Causse, Véronique Lefebvre, Alain Palloix et Michel Pitrat, dont les éclairages ont guidé ce travail durant mes séjours en métropole.

Je remercie les techniciens Emmanuelle, Magalie, Jean-Michel, Jean-Jacques, Sylvain, mais également mon « petit » stagiaire Matthieu, pour leur gentillesse et toute l'aide qu'ils m'ont fourni.

Je remercie également l'ensemble des membres du CIRAD Réunion et l'équipe du DGAP de l'INRA d'Avignon pour leur aide ainsi que pour leur accueil chaleureux. Je remercie « Mr Patate » avec qui j'ai partagé le « chef », je remercie Gilles pour tous les petits conseils qui m'ont facilité la vie. Je remercie mes autres collègues doctorants Cathy, Rodolphe, Aline, Benjamin, Isabelle, Frédérique, Jéry, Magalie, Amalaa, Carine, Azali et aux neodocteurs

notamment Gabriel, Béné, Lan, Leila pour leurs conseils en tant qu'« anciens ». Je leur souhaite à tous bon courage pour la suite. Evidemment, je ne peux oublier tous les stagiaires et VCAT qui sont passés dans notre laboratoire bien que je les nomme pas un à un je leur remercie pour leur bonne humeur et leur dynamisme.

Je terminerai tous ces remerciements par ceux qui me sont les plus proches. Merci à mes amis pour tous les bons moments passés. Je remercie vivement toute ma famille en commençant par ma sœur Delphine et mon frère Guillaume qui ont dû me supporter depuis qu'ils sont nés, mes cousins, cousines, oncles et tantes, mes grand-mères pour les pique-niques et diverses réunions de famille Lebeau et Robert qui ont animé toutes ces années, les familles Rivière et Perez pour les dinés presque parfaits du mercredi soir, ma « belle famille » Agnes, Loulou, Julie, Alain, Juju qui m'ont accueilli chez eux durant mes séjours en métropole et tout le clan des Amouroux et des Aujoulat. Bien évidemment ma plus grande gratitude revient à mes parents Odette et Bernard pour leur soutien moral et financier, et pour m'avoir permis de faire des études me conduisant à présenter ce doctorat.

Enfin, je ne sais comment remercier celui qui a fait preuve de compréhension dans les moments difficiles, qui m'a soutenu et que j'aime tant. Merci à toi, Paul.

A Grand-mère Rose,

# Sommaire

<b>Sommaire</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>4</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>6</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>7</b>
<b>Liste des annexes</b>	<b>8</b>
<b>Introduction générale</b>	<b>9</b>
<b>Synthèse Bibliographique</b>	<b>12</b>
<b>1. Les Solanacées</b>	<b>12</b>
1.1. Présentation des espèces Tomate, Aubergine et Piment	13
Tomate	13
Aubergine	14
Piment	15
1.2. Ressources génétiques Tomate, Aubergine, Piment et utilisation	16
Tomate	17
Aubergine	18
Piment	19
<b>2. Ressources génomiques</b>	<b>20</b>
2.1. Ressources chez la Tomate, l'Aubergine et le Piment	20
Tomate	20
Aubergine	21
Piment	22
2.2. Génomique comparative chez les Solanacées	23
<b>3. Flétrissement bactérien causé par <i>Ralstonia solanacearum</i></b>	<b>26</b>
3.1. Symptomatologie	26
3.2. Le complexe d'espèce <i>Ralstonia solanacearum</i>	28
3.2.1. Caractéristiques générales de <i>Ralstonia solanacearum</i>	28
3.2.2. Diversité phénotypique et génétique	31
Classement en race	32
Classement en biovars	33
Description de la diversité génétique par des approches moléculaires	33
3.2.3. Eléments d'épidémiologie	35
3.3. Les déterminants du pouvoir pathogène	39
3.3.1. Taxie	39
3.3.2. La mobilité	40
3.3.3. Les lipopolysaccharides	41
3.3.4. Les enzymes extracellulaires	41
3.3.5. Les systèmes de sécrétion	42
3.3.6. Les effecteurs de type III	43
3.4. Stratégies de lutte	46

<b>4. Résistance au flétrissement bactérien</b>	<b>50</b>
4.1. Différents types de résistance chez la plante	50
4.2. Résistance chez la plante modèle <i>Arabidopsis thaliana</i>	51
Résistance chez l'écotype Nd-1	51
Résistance chez l'écotype Col-0	52
Voies hormonales impliquées dans la résistance chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
4.3. Résistance chez les solanacées (Tomate, Aubergine, Piment)	54
4.3.1. Mécanisme de résistance chez les solanacées	54
Voies hormonales impliquées dans la résistance chez la Tomate	55
4.3.2. Déterminisme génétique de la résistance chez les solanacées (tomate, aubergine, piment)	55
4.3.3. Génétique de résistance chez la Tomate	56
Résistance chez L285	57
Résistance chez Hawaii7996	58
4.3.4. Génétique de résistance chez le Piment	59
Résistance chez PM687 x Yolo Wonder	59
Résistance chez CM334	59
4.3.5. Résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine	59
Variétés résistantes	60
Modalités de la résistance	62
Déterminisme génétique et mécanisme(s) de résistance	62
Résistance au flétrissement bactérien chez les espèces apparentées	63
Résistance au flétrissement bactérien et résistance à d'autres maladies vasculaires	64
Travaux de sélection à l'IRAT et à l'INRA	64
Marqueurs et cartographie de la résistance	65
 <b>Matériel et Methodes</b>	 <b>68</b>
<b>1. Matériel biologique</b>	<b>68</b>
1.1. Matériel végétal	68
1.2. Souches bactériennes	68
<b>2. Méthode d'inoculation et dispositifs expérimentaux</b>	<b>69</b>
<b>3. Evaluation phénotypique</b>	<b>69</b>
<b>4. Etude génétique en utilisant le marquage moléculaire</b>	<b>70</b>
4.1. Extraction d'ADN génomique	70
4.2. Marquage moléculaire	70
4.3. Analyse des profils moléculaires	71
4.4. Méthodes statistiques	71
4.4.1. Calcul des variances et de l'héritabilité	72
4.4.2. La méthode du maximum de vraisemblance.	73
 <b>Chapitre 1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de <i>Ralstonia solanacearum</i></b>	 <b>75</b>
<b>1. Article 1 : Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the <i>Ralstonia solanacearum</i> species complex</b>	<b>77</b>
<b>2. Principales conclusions</b>	<b>96</b>
<b>3. Compléments à la publication</b>	<b>96</b>
Définition de Core-TEP2	96

---

Choix de la Core-Rs3-----	97
<b>Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25 -----</b>	<b>99</b>
1. Article 2 : Genetic mapping of a major dominant gene of resistance to <i>Ralstonia solanacearum</i> in eggplant-----	100
2. Complément d'article -----	117
Complément d'information concernant le déterminisme génétique de la résistance-----	117
<b>Conclusion et perspectives -----</b>	<b>119</b>
1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de <i>R. solanacearum</i> -----	119
2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25 -----	122
3. Perspectives-----	127
3.1. Sur le plan de la sélection de la résistance-----	127
3.2. Sur le plan académique-----	128
<b>Références bibliographiques-----</b>	<b>130</b>
<b>ANNEXES -----</b>	<b>151</b>



## Liste des abréviations

ABA	Acide Abscissique
ACURs	<i>Alternative Codon Usage Regions</i>
ADN (ou DNA)	Acide Désoxyribonucléique
ADNc (ou cDNA)	ADN complémentaire
ADNr (ou rDNA)	ADN ribosomique
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
Avr	Avirulence
AVRDC	<i>Asian Vegetable Research and Development Center</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BDB	<i>Banana Blood Disease</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAPS	<i>Cleaved Amplified Polymorphic Sequence</i>
CGH	<i>Hybridation Génomique Comparative</i>
CGIAR	<i>Consultative Group on International Agricultural Research</i>
CIM	<i>Composite Interval Mapping</i>
CIRAD	Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement
COS	<i>Conserved Orthologs Set</i>
DGAP	Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes (INRA)
DH	Lignées Haploïdes Doubles
egl	Endoglucanase
EPS	Exopolysaccharides
EST	<i>Expressed Sequence Tagged</i>
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GENTYANE	GENoTYpage en Auvergne
GEVES	Groupe d'Etude et de Contrôle des Variétés et des Semences
HR	<i>Hypersensitive Response</i>
Hrp	<i>Hypersensitive response and pathogenicity</i>
IBPGR	<i>International Board for Plant Genetic Resources</i>
INDEL	Insertion Deletion
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IPGRI	<i>International Plant Genetic Resources Institute</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
JA	Acide Jasmonique
LG	Groupe de Liaison
LOD	<i>Logarithm of the odds ratio</i>
LPS	Lipopolysaccharides
LRR	<i>Leucine-Rich Repeats</i>
MAMPs/PAMPs	<i>Microbial/Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
MCPs	<i>Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins</i>
NLS	<i>Nuclear localization Signal</i>
NS2/NS3	Niveau de Sécurité 2/3

PBI	<i>Planetary Biodiversity Inventories</i>
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
Pop	<i>Pseudomonas outer protein</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTI	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns triggered immunity</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
r	Taux de recombinaison
r bv	Race biovar
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphism DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RGA	<i>Resistance Gene Analog</i>
RIL	Lignées Recombinantes
SA	Acide salicylique
SAM	Sélection Assistée par Marqueurs
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i>
SCAR	<i>Sequenced Characterized Amplified Region</i>
SGN	<i>Solanaceae Genomics Network</i>
SIM	<i>Simple Interval Mapping</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOL	<i>International Solanaceae Genome Project</i>
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphisme</i>
SSR	<i>Simple Sequences Repeat</i>
SST2 ou SST3	système de sécrétion de type II ou de type III
STR	<i>Single Tandem Repeat</i>
STS	<i>Sequence-Tagged Site</i>
TED	<i>Tomato Expression Database</i>
TEP	Tomato, Eggplant, Pepper
THG	Transferts de Gènes Horizontaux
TTC	Chlorure de Triphéniltétrazolium
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i>
TYLCV	<i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i>
USDA-ARS-GRIN	United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service- Germplasm Resources Information Network
VBNC	<i>Viable But Nonculturable Cells</i>
VNTR	<i>Variation Number of Tandem Repeat</i>
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosome</i>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les espèces décrites du genre <i>Capsicum</i> (Mahbou Somo Toukam 2010). .....	15
<b>Tableau 2.</b> Cartes génétiques disponibles chez la tomate ( <i>Lycopersicon</i> spp.) développées à partir de différents croisements intra- and interspécifiques (Foolad 2007).. .....	21
<b>Tableau 3.</b> Résumé des cartes génétiques disponibles chez l'aubergine. ....	22
<b>Tableau 4.</b> Regroupement des souches <i>Musa</i> de <i>R. solanacearum</i> en fonction de leur spécificité d'hôtes.....	27
<b>Tableau 5.</b> Caractéristiques de <i>Ralstonia solanacearum</i> (d'après Hayward et al. 1964 ; He et al. 1983 ; Velupillai et Stall, 1984 ; Wall et Kaiser 1999 ; Tans-Kersten et al. 2001) .....	29
<b>Tableau 6.</b> Caractéristiques générale des génomes des souches de <i>R. solanacearum</i> CFBP2957, CMR135, PSI07, GMI1000, IPO1609 et Molk2 (Remenant et al. 2010). ....	29
<b>Tableau 7.</b> Classification en race en fonction du spectre d'hôte (Buddenhagen & Kelman 1964 ; He et al. 1983; Pegg & Moffett 1971 et Williamson et al. 2002, Denny 2006). ....	32
<b>Tableau 8.</b> Caractéristiques différentielles des biovars de <i>R. solanacearum</i> (Hayward 1964 ; Hayward 1992 et He et al. 1983).....	33
<b>Tableau 9.</b> Schéma de classification hiérarchique pour <i>R. solanacearum</i> (d'après Fegan & Prior 2005).....	34
<b>Tableau 10.</b> Modes de dissémination de <i>R. solanacearum</i> (Kelman 1994) .....	37
<b>Tableau 11.</b> Bactéries étudiées comme agents de contrôle biologique contre le flétrissement bactérien (Saddler 2005). .....	49
<b>Tableau 12.</b> Pourcentage moyens de survies des lignées du jeu international de sources de résistance au flétrissement bactérien évalué dans 12 champs et un essai en serre (Wang et al. 2000). ....	56
<b>Tableau 13.</b> Résumé des études portant sur la détection de QTLs de résistance au flétrissement bactérien chez la tomate (Mahbou Somo Toukam, 2010).....	58
<b>Tableau 14.</b> Détection des facteurs génétiques associés à la résistance de la souche <i>R. solanacearum</i> indonésienne (phylotype I) basés sur les analyses CIM et la SIM du pourcentage de plante flétries à 21 jours après inoculation chez la population RILs F <sub>6</sub> .....	118

### Listes des tableaux par chapitre

<b>Chapitre 1. Table 1.</b> .....	78
<b>Chapitre 1. Table 2.</b> .....	80
<b>Chapitre 1. Table 3.</b> .....	81
<b>Chapitre 1. Table 4.</b> .....	83
<b>Chapitre 2. Table 1.</b> .....	102
<b>Chapitre 2. Table 2.</b> .....	106
<b>Chapitre 2. Table 3.</b> .....	108
<b>Chapitre 2. Table 4.</b> .....	109

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Compatibilité de croisement entre les différents pools du genre <i>Capsicum</i> .....	19
<b>Figure 2.</b> Carte génétique de la tomate basée sur des marqueurs morphologiques (Butler 1952)..	20
<b>Figure 3.</b> Test simple pour observer l'exsudat bactérien provenant d'une tige de tomate infestée placée dans un verre d'eau (Denny 2006).	27
<b>Figure 4.</b> Photographies d'aubergine après inoculation d'une souche de <i>R. solanacearum</i> .....	27
<b>Figure 5.</b> Photographie de colonies de <i>R. solanacearum</i> sur milieu Kelman.....	31
<b>Figure 6.</b> Tableau de correspondances entre les différentes classifications de <i>R. solanacearum</i> (d'après Prior).	33
<b>Figure 7.</b> Arbre phylogénétique basée sur l'analyse de la séquence partielle du gène codant l'endoglucanase (egl).	34
<b>Figure 8.</b> Exemples de gel d'électrophorèse de PCR multiplexe (Fegan & Prior 2005).....	34
<b>Figure 9.</b> Modèle de flagelle bactérien.	40
<b>Figure 10.</b> Organisation génétique de <i>R. solanacearum</i> du cluster de gène <i>hrp</i> (Van Gijsegem et al. 2002).	42
<b>Figure 11.</b> Représentation schématique de la régulation des gènes <i>hrp</i> de <i>R. solanacearum</i> (Büttner and Bonas 2006).	43
<b>Figure 12.</b> Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III de <i>R. solanacearum</i> (Van Gijsegem et al. 2002).	43
<b>Figure 13.</b> Modèle en zig-zag qui illustre le système immunitaire des plantes (Jones et Dangl 2006).....	50
<b>Figure 14.</b> Dispositif expérimental. A. chambre climatique, B. serres.	69
<b>Figure 15.</b> Photographies de plantes en chambre climatique. A. tomate, B. aubergine, C. piment.....	69
<b>Figure 16.</b> Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par <i>Ralstonia solanacearum</i> sur l'aubergine (Photo M. Gouy).	69
<b>Figure 17.</b> Carte génétique issue du croisement entre MM738 et AG91-25 chez l'aubergine.....	117
<b>Figure 18.</b> Courbe de LOD obtenues suivant la méthode SIM sur le groupe de liaison 2, pour la variable indice de colonisation pour les souches CMR134, PSS366 et GMI1000.....	118

### Listes des figures par chapitre

<b>Chapitre 1. Fig. 1.</b> .....	79
<b>Chapitre 1. Fig. 2.</b> .....	84
<b>Chapitre 1. Fig. 3.</b> .....	84
<b>Chapitre 2. Fig. 1.</b> .....	107
<b>Chapitre 2. Fig. 2.</b> .....	107
<b>Chapitre 2. Fig. 3.</b> .....	110

## Liste des annexes

<b>ANNEXE 1.</b> Caractéristiques des espèces de tomates et d'espèces sauvages proches (Peralta et al. 2006; Peralta et al. 2008).....	151
<b>ANNEXE 2.</b> Résultat des croisements interspécifiques entre <i>S. melongena</i> et les espèces proches (Daunay 2008).....	154
<b>ANNEXE 3.</b> Cartes génétiques chez <i>Capsicum</i> . .....	157
<b>ANNEXE 4.</b> Extraction d'ADN à partir de feuilles d'aubergine .....	160
<b>ANNEXE 5.</b> AFLP protocole .....	164
<b>ANNEXE 6.</b> Protocoles de marquage .....	166
<b>ANNEXE 7.</b> Analyse du maximum de vraisemblance .....	173

# Introduction générale

## Introduction générale

La tomate (*Solanum lycopersicum*), le piment (*Capsicum* spp.) et l'aubergine (*Solanum melongena*) font partie des 40 espèces légumières les plus produites dans le monde (FAO, 2008). Ces trois solanacées sont cultivées sous tous les climats, notamment en zone tropicale, où leur production est en proie à de nombreuses contraintes biotiques, en particulier le flétrissement bactérien. Cette maladie causée par la phyto bactérie tellurique *Ralstonia solanacearum* Smith est un des problèmes phytosanitaires majeurs dans le monde. Le flétrissement bactérien affecte une gamme d'hôtes étendue à des centaines d'espèces différentes, appartenant aux clades des dicotylédones ou des monocotylédones, dans des régions agro-climatiques variées, tropicale, subtropicale et dans une moindre mesure tempérée (Hayward 1991).

Pour contrôler la maladie des méthodes basées sur la prophylaxie, les techniques culturales, la lutte chimique et biologique sont employées. Cependant l'exploitation de la résistance variétale est considérée comme la stratégie de contrôle la plus efficace. Depuis des décennies, les sélectionneurs ont recherché et exploité différentes sources de résistance au flétrissement bactérien chez les solanacées à graines, afin de créer des cultivars possédant, outre un niveau élevé de résistance, une bonne qualité agronomique et une bonne adaptation aux conditions tropicales, en particulier aux températures élevées. De nombreux géniteurs de résistance existent chez la Tomate, l'Aubergine et le Piment (TEP), et plusieurs d'entre eux ont été ou sont utilisés dans les programmes de sélection. Cependant, force est de constater que la sélection butte toujours sur la fluctuation des propriétés de résistance du matériel sélectionné, en particulier quand il est déployé dans des zones de production différentes de la zone de sélection. L'instabilité de la résistance est due à différents facteurs, agissant seuls ou en combinaison, comme:

- les interactions fortes, mal décrites ou méconnues entre les facteurs génétiques de la résistance et la diversité génétique de *R. solanacearum*,
- la méconnaissance des sélectionneurs de l'identité génétique des souches qu'ils utilisent dans leurs programmes de sélection variétale,
- la mondialisation du commerce des cultivars résistants, dans un contexte de connaissance très insuffisante de l'identité génétique des souches bactériennes dominantes dans les différentes zones géographiques où TEP sont cultivées,

- l'adaptation, dans le temps, de la bactérie qui parvient à contourner la résistance variétale qui lui est opposée.

Ainsi l'amélioration de la connaissance de l'interaction entre *R. solanacearum*, la plante hôte et l'environnement est indispensable à la mise au point de stratégies de contrôle génétique efficaces et durables.

Les avancées rapides de ces vingt dernières années dans le domaine de la biotechnologie ont fourni de nouveaux outils performants pour la sélection végétale. Les marqueurs moléculaires permettent la construction de cartes génétiques qui, selon la densité des marqueurs, rendent possible la cartographie plus ou moins fine des gènes impliqués dans des caractères d'intérêt à l'hérédité simple ou complexe (Paterson et al. 1991). L'utilisation de(s) marqueur(s) fortement lié(s) à un ou plusieurs gène(s) d'intérêt augmente l'efficacité et la rapidité de la sélection, notamment pour des caractères phénotypiques d'évaluation difficile, d'expression tardive ou fortement influencée par l'environnement.

La compréhension des raisons de l'échec partiel de la sélection de variétés résistantes au flétrissement bactérien fait l'objet de la première partie de ce travail de thèse. Afin de répondre à la question de recherche globale « quelles sont les interactions entre la diversité génétique de l'hôte pour la résistance et la diversité génétique de la bactérie ? », une core collection de géniteurs de résistance de Tomate, Aubergine et Piment a été définie et assemblée, au cours d'un travail de synthèse bibliographique et de communication internationale préalables. Elle a été confrontée à une core collection de souches de *R. solanacearum*, dont la constitution a été possible grâce à la mise en évidence récente des relations phylogénétiques des souches bactériennes composant ce complexe mondial d'espèces (Fegan and Prior 2005). Notre premier objectif était ainsi de construire un tableau complet, au vu des connaissances actuelles, des interactions hôte x pathogène sur le modèle TAP x *R. solanacearum*. Les résultats obtenus permettront de répondre à plusieurs questions d'ordre académique, notamment :

Existe-t-il des sources de résistance chez les solanacées à graines (TAP) capables de contrôler l'ensemble des souches de *R. solanacearum* ? Ou formuler inversement, existe-t-il des souches capables de contourner toutes les résistances disponibles chez TAP ?

Existe-t-il des profils de virulence spécifiques aux souches de *R. solanacearum* partageant un même groupe génétique et phylogénétique, qui s'exprimeraient vis-à-



vis de TAP considérées collectivement (groupe de synténie) ou individuellement (Tomate, Aubergine, Piment) ?

La deuxième partie de la thèse a été conçue de façon à répondre à la question globale « quels sont les facteurs génétiques responsables de l'interaction chez le pathosystème Aubergine-*R. solanacearum* ? ». Pour cela, deux populations de cartographie ont été utilisées. La première est constituée par une population de lignées recombinantes issues d'un croisement intraspécifique entre une lignée sensible (MM738) et une lignée résistante (AG91-25) cumulant deux sources de résistance et sélectionnée par l'INRA aux Antilles dans les années 1980. L'autre population est interspécifique, et est constituée de lignées F<sub>3</sub> directement issues des plantes F<sub>2</sub> [*Solanum linnaeanum* MM195 X *S. melongena* MM738] à l'origine de la carte génétique de référence de l'aubergine qui est alignée sur celle de la tomate (Doganlar et al. 2002a; Doganlar et al. 2002b; Frary et al. 2003). L'interaction de ces deux populations avec une gamme de souches de *Ralstonia* permettra d'étoffer le modeste corpus de connaissances actuelles sur la génétique de la résistance de l'aubergine au flétrissement bactérien, et d'apporter les premiers éléments de réponse à des questions académiques, en particulier :

- les facteurs génétiques impliqués dans la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine varient-ils d'un fond génétique à l'autre ?
- Interviennent-ils dans la résistance vis-à-vis de toutes les souches testées ou sont-ils spécifiques de certaines souches seulement ?
- Dans quelle mesure sont-ils communs avec les facteurs décrits et cartographiés chez la tomate et le piment ?

L'ensemble des travaux ont été conduits au CIRAD de la Réunion, dont la plateforme scientifique et technique permet de conduire des expérimentations sur les organismes de quarantaine grâce à la disponibilité d'une zone de confinement biologique de niveau de sécurité 3 (NS3) adaptée à la conduite de tests sur des effectifs importants de plantes. Cette thèse fait partie d'un projet de recherche de trois ans impliquant un consortium regroupant le CIRAD (Centre International en Recherche Agronomique pour le Développement), l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), l'AVRDC-The World Vegetable Center (Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan), et six partenaires privés, Vilmorin & Cie, Gautier Semences, De Ruiters Seeds, Enza Zaden, Nunhems et Rijk Zwaan.

# Synthèse Bibliographique

## Synthèse Bibliographique

### 1. *Les Solanacées*

Parmi les angiospermes, la famille des *Solanaceae* est l'une des plus importantes pour l'alimentation humaine. Cette famille représente le troisième taxon d'importance économique de par la diversité des espèces cultivées. La famille comprend une centaine de genres et de l'ordre de 2500 espèces (Olmstead et al. 2008), dont une moitié appartient au genre *Solanum* (Weese and Bohs 2007). La classification des *Solanaceae* a été basée à ses débuts sur des critères morphologiques de la fleur, de la graine et de l'embryon, puis complétée au fur et à mesure des progrès des techniques par de nombreux autres critères comme par exemple le nombre et la forme des chromosomes, les métabolites secondaires, le polymorphisme des protéines, la structure des trichomes, etc. (Daunay et al. 2008b). Depuis l'avènement des marqueurs moléculaires révélateurs du polymorphisme de l'ADN, la classification des membres de la famille des Solanacées a été réorientée dans une logique phylogénétique et a été assez fortement remaniée (Olmstead and Bohs 2007; Olmstead et al. 2008), avec par exemple le passage des genres *Lycopersicon* (Spooner et al. 1993) et *Cyphomandra* (Bohs 2007) dans le genre *Solanum*.

La famille des *Solanaceae* inclue des plantes alimentaires économiquement importantes telles que la tomate (*Solanum lycopersicum* L.), l'aubergine (*S. melongena* L.), la pomme de terre (*S. tuberosum* L.), le piment (*Capsicum* sp.) et d'autres espèces moins connues comme le pépino (*S. muricatum* Ait.), la narangille (*S. quitoense* Lam) et le cocona (*S. sessiliflorum* Dunal). Elle comprend aussi le tabac (*Nicotiana tabacum* L.), ainsi que de nombreuses espèces utilisées à des fins pharmaceutiques ou ornementales (Daunay and Lester 1989). Les espèces appartenant à la famille des *Solanaceae* sont extrêmement diverses (Knapp 2001), à la fois en termes (1) de vigueur et biologie (des herbes annuelles aux arbres pérennes); (2) d'habitat (du déserts aux forêts tropicales humides); et (3) de morphologie, notamment des fleurs et des fruits, par exemple, Knapp, (2002). Le centre d'origine et de diversité de la majorité des *Solanaceae* est concentré en Amérique du Sud et Amérique centrale (D'Arcy 1991). Parmi les espèces cultivées, l'aubergine constitue une exception notable, puisqu'elle est originaire d'Asie (zone géographique s'étendant de l'Inde à la Chine).

## 1.1. Présentation des espèces Tomate, Aubergine et Piment

### TOMATE

Le mot « tomate » dérive du suffixe « tomatl » ou des mots « tomates » ou « miltomates » dans le langage nahuatl (Daunay et al. 2008a) qui était celui des anciens mexicains (Azèques) à l'époque de la découverte de l'Amérique. « Tomatl » désignait alors la tomate, le *Physalis* ainsi que d'autres Solanacées. Introduite en Europe au milieu du XVIème siècle, elle porta différents noms comme « mala aurea » en latin, « pomodoro » en italien, « pomme d'amour » en français, « love apple » en anglais et « liebesapfel » en allemand. D'abord considérée avec suspicion, elle fut rapidement consommée en Europe du sud, mais fut adoptée plus tardivement plus au nord.

Linné (1753) avait inclus la tomate dans le genre *Solanum*, en la nommant *Solanum lycopersicum* mais Miller (1754, 1768) la renomma *Lycopersicon esculentum*, en créant le genre *Lycopersicon* qui regroupait les différentes espèces de tomate. Le terme gréco-latin « *Lycopersicon* » signifie « pêche de loup » et le mot latin « *esculentum* » signifie « comestible ». Cependant seuls les fruits tournants ou mûrs sont comestibles car la plante et les jeunes fruits verts contiennent de la tomatine, un glycoalcaloïde potentiellement toxique. La taxonomie actuelle a replacé la tomate au sein du genre *Solanum*, section *Lycopersicon* qui regroupe 13 espèces (Spooner et al. 1993; Spooner et al. 2005), et son nom est désormais *Solanum lycopersicum* (Spooner et al. 1993).

La tomate et les espèces qui lui sont apparentées sont originaires de la région des Andes qui inclue la Colombie, l'Equateur, le Pérou, la Bolivie et le Chili (Rick 1973, 1979; Taylor et al. 1986; Warnock 1988), à l'exception de *S. cheesmaniae*, endémique des îles Galápagos (ANNEXE 1). La tomate cultivée est issue de la domestication de la forme semi sauvage *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, cette dernière étant un mélange de *S. lycopersicum* et de l'espèce sauvage *S. pimpinellifolium* (Peralta et al. 2008; Ranc et al. 2008). Cependant la question du lieu de la domestication demeure irrésolue par manque de données historiques et expérimentales et deux hypothèses coexistent : une domestication péruvienne et/ou mexicaine après migration de formes sauvages (*S. pimpinellifolium*) et/ou semi domestiquées (*S.*

*lycopersicum* var. *cerasiforme*) d'Amérique du Sud vers l'Amérique centrale (Peralta et al. 2008).

### AUBERGINE

*Solanum melongena* connu aussi sous le nom de « eggplant » aux Etats-Unis, « aubergine » en France, « brinjal » en Inde et « bringelle » à la Réunion, appartient au sous-genre *Leptostemonum* qui comprend de nombreuses espèces sauvages mais aussi d'autres espèces cultivées telles que *Solanum aethiopicum* (« scarlett eggplant », « garden egg » au Ghana) aux fruits rouge écarlate et *Solanum macrocarpon* (« gboma eggplant ») aux fruits rond coiffés d'un calice foliacé. Ces deux espèces sont principalement cultivées en Afrique pour leurs fruits et/ou leurs feuilles, mais on les cultive aussi en Amérique du Sud (*S. aethiopicum*) et en Asie (*S. macrocarpon*). Le sous-genre *Leptostemonum* comprend également des espèces de consommation localisée, comme *S. quitoense* et *S. sessiliflorum*, dans certains pays d'Amérique du Sud, et *S. repandum* et *S. lasiocarpum*, en Asie du Sud-Est. Le traitement taxonomique des espèces apparentées à l'aubergine n'est pas totalement terminé. Espèces annuelles en conditions tempérées, *Solanum melongena*, *S. aethiopicum* et *S. macrocarpon* sont pérennes en conditions tropicales humides et leur récolte peut s'étaler sur plus d'un an.

*S. melongena*, les espèces africaines *S. aethiopicum*, *S. macrocarpon* et les espèces qui leur sont apparentées sont originaires de l'ancien monde. *S. incanum* agg., le complexe d'espèces sauvages le plus proche génétiquement de *S. melongena*, est originaire d'Afrique de l'Est et du Moyen-Orient jusqu'en Arabie et en Iran, mais les formes sauvages de *S. melongena* se rencontrent dans tout le sud-est asiatique (Lester and Hasan 1991). La domestication des formes ancestrales de *S. melongena* a eu lieu à une époque encore imprécise faute de traces autres que linguistiques avant l'ère chrétienne, dans la vaste région comprise entre l'Inde et le Sud-Ouest de la Chine (ancienne Indochine). Le(s) centre(s) de diversification primaire de *S. melongena* est/sont localisé(s) en Inde et en Asie du Sud-Est, et le bassin méditerranéen est un centre de diversification secondaire. Pour *S. aethiopicum* et *S. macrocarpon*, les régions de plus grande diversité morphologique se situent en Côte d'Ivoire et dans les pays voisins (Lester et al. 1990).

*S. melongena* a été introduite en Europe au cours du Moyen Age, et sa culture dans l'Andalousie arabe est patente dès le 12<sup>ème</sup> siècle (Daunay and Janick 2007). Aux temps de la Renaissance, on la trouve dans les herbiers imprimés sous les noms de *poma amoris*, un nom

**Tableau 1.** Les espèces décrites du genre *Capsicum* (Mahbou Somo Toukam 2010).

<b>Sections</b>	<b>Nom des espèces</b>	<b>Zone de distribution (ou de collecte)</b>
<b>Complexe <i>Capsicum annuum</i></b>	<i>C. annuum</i> L. var. <i>glabriusculum</i> (wild) var. <i>annuum</i> (domestiqué)	Du nord de la Colombie et du sud des USA
	<i>C. chinense</i> Jacq.	Caraïbes, Amérique centrale et du sud
	<i>C. frutescens</i> L.	Amérique Centrale
<b>Complexe <i>Capsicum baccatum</i></b>	<i>C. baccatum</i> L. var. <i>baccatum</i> (sauvage) (syn. <i>C. microcarpum</i> ) var. <i>pendalum</i> (domestiqué)	Argentine, Bolivie, Brésil, Paraguay, Pérou
	<i>C. praetermissum</i> Heiser & Smith	Sud du Brésil
	<i>C. pubescens</i> Ruiz & Pav.	Haut plateaux d'Amérique latine (Bolivie, Pérou)
<b>Complexe <i>Capsicum pubescens</i></b>	<i>C. eximium</i> Hunz.	Argentine, Bolivie
	<i>C. cardenasii</i> Heiser & Smith	Bolivie
	<i>C. chacoense</i> Hunz.	Argentine, Bolivie, Paraguay
<b>Complexe additionnel : Espèces sauvages de <i>Capsicum</i></b>	<i>C. galapagoense</i> Hunz.	Galapagos Islands, Equateur
	<i>C. buforum</i> Hunz.	Brésil
	<i>C. Campilopodium</i> Sendt.	Sud du Brésil
	<i>C. coccineum</i> (Rusby) Hunz.	Bolivie, Pérou
	<i>C. cornutum</i> (Hiern) Hunz.	Sud du Brésil
	<i>C. dimorphum</i> (Miers)	Colombie
	<i>C. dusenii</i> Bitter	Sud-est du Brésil
	<i>C. hookerianum</i> (Miers)	Équateur
	<i>C. leptopodium</i> (Dunal)	Brésil
	<i>C. minutiflorum</i> (Rusby) Hunz.	Argentine, Bolivie, Paraguay
	<i>C. mirabile</i> Mart ex. Sendt	Sud du Brésil
	<i>C. parvifolium</i> Sendt.	Colombie, Nord-est du Brésil, Venezuela
	<i>C. scolnikianum</i> Hunz.	Perou
	<i>C. schottianum</i> Sendt.	Argentine, Sud du Brésil, Sud-est du Paraguay
	<i>C. tovarrii</i> (Eshbaugh WH)	Perou
	<i>C. villosum</i> Sendt.	Sud du Brésil

qu'elle partagea un temps avec la tomate, ou *mala insana* ou pomme malsaine, appellations qui traduisent l'ambiguïté de sa perception par les herbalistes de l'époque.

### PIMENT

Il appartient au genre *Capsicum.*, du grec kapsa [κψα] qui signifie capsule ou bien du latin 'capsa' qui signifie boîte / coffret, en référence à la forme creuse du fruit du piment qui fait penser à une petite boîte contenant le placenta sur lequel sont disposées les graines. Contrairement à la tomate, au physalis ou à la morelle, il n'y a pas de pulpe ou de gel à l'intérieur du fruit. Le nombre d'espèces recensées est très variable selon les auteurs. Dunal (1852) a décrit environ une soixantaine d'espèces. Aujourd'hui, les taxonomistes s'accordent sur 25 espèces (Baral and Bosland 2002) dont une vingtaine d'espèces sauvages (Eshbaugh 1980) et 5 espèces domestiquées : *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, *Capsicum pubescens* et *Capsicum baccatum* var *pendalum* (Eshbaugh 1977; McLeod et al. 1979; Pickersgill et al. 1979) (**Tableau 1**). Les piments les plus cultivés aujourd'hui appartiennent à l'espèce *C. annuum*. Il existe des piments cultivés n'appartenant pas à l'espèce *C. annuum*, les plus connus sont le tabasco (*C. frutescens*) et le piment habanero appelé également le piment antillais (*C. chinense*).

Le piment est un arbuste vivace dans des conditions climatiques favorables, et il peut survivre une dizaine d'années voire plus dans les régions tropicales d'Amérique Centrale et du Sud (Bosland 1996). Les fruits comestibles sont considérés comme des légumes mais botaniquement ce sont des baies. Les différents types de *Capsicum* sont communément classés selon les caractéristiques du fruit, saveur, couleur, forme, goût, taille et utilisation (Bosland 1992; Smith et al. 1987). Il existe des fruits brûlants et des fruits doux dans au moins quatre des espèces cultivées (Pochard et al. 1992). La saveur douce est souvent associée à une forme globuleuse du fruit mais il ne s'agit là que d'un repère visuel (trompeur) à l'usage des consommateurs et non d'une liaison génétique. Le caractère brûlant est dû à la présence de composés capsaïcinoïdes, propres au genre *Capsicum*. Les capsaïcinoïdes ont la caractéristique d'activer les récepteurs de chaleur, d'où la sensation de brûlure, alors qu'il n'y a pas d'augmentation de la température. La capsaïne (69%) le dihydrocapsaïne (22%) sont les composés capsaïcinoïdes les plus répandus et sont deux fois plus puissants en goût que les autres (norcapsaïcine, nordihydrocapsaïcine, nornordihydrocapsaïcine, homocapsaïcine, homodihydrocapsaïcine) qui sont considérés comme des capsaïcinoïdes mineurs en raison de leur teneur généralement faible dans les fruits (Bosland 1996).

Toutes les espèces du genre *Capsicum* sont originaires du nouveau monde. Les espèces du genre *Capsicum* proviendraient de trois centres d'origines distinctes (Crosby 2008; Eshbaugh et al. 1983; Pickersgill 1971). L'une des espèces ancestrales aurait donné les espèces à fleurs violettes et graines colorées, appartenant au complexe *C. pubescens* qui comprend les espèces sauvages *C. tovarii*, *C. eximium*, *C. cardenasii* et également l'espèce domestiquée *C. pubescens*. Les régions Andéennes de Bolivie et du Pérou de moyennes altitudes sont les centres primaires de diversité pour *C. pubescens*. Une autre espèce ancestrale serait à l'origine des espèces à fleurs blanches tachetées appartenant au complexe *C. baccatum* qui comprend *C. praetermissum* et *C. baccatum* var. *baccatum* ainsi que l'espèce cultivée *C. baccatum* var. *pendulum*. La diversité de *C. baccatum* est localisée dans les régions de basses et de moyennes altitudes de la Bolivie, du Pérou, et du Brésil, sud du bassin Amazonien, et dans une moindre mesure dans les régions de l'ouest du Brésil et la Colombie (Andrews 1984). Une autre espèce ancestrale aurait donné des espèces à fleurs blanches ou jaunâtre appartenant au complexe *C. annuum* et incluant des espèces sauvages et trois espèces cultivées : *C. chinense*, *C. frutescens*, et *C. annuum*. Le Mexique est le centre de diversité de *C. annuum* mais des formes sauvages existent au sud du Texas et de l'Argentine. Les régions Amazoniennes de l'Amérique du Sud constituent le centre de diversité de *C. chinense* and *C. frutescens*, avec des centres secondaires de diversification en Amérique Centrale et dans les Iles Caraïbes. La spéciation chez *C. baccatum* et *C. pubescens* aurait précédé la domestication alors que pour les trois autres espèces cultivées, la différenciation en espèces distinctes aurait été produite sous influence humaine. Le piment a été domestiqué il y a 9000 ans.

### **1.2. Ressources génétiques Tomate, Aubergine, Piment et utilisation**

Les collections de ressources génétiques patrimoniales, quelle que soit l'espèce agricole, sont composées de proportions variables, d'une collection à l'autre, des formes cultivées dans le monde, des formes sauvages, et des espèces apparentées qu'elles soient cultivées ou sauvages. Dans le cadre d'intérêts publics et privés, des collections de ressources génétiques patrimoniales des grandes espèces cultivées ont été créées depuis plus d'un siècle, dont la plus fameuse historiquement est celle constituée dans la première moitié du vingtième siècle par N.I. Vavilov. Depuis le début des années 1970 des collections internationales des grandes espèces agricoles ont été créées dans les centres internationaux de recherche agronomique



sous l'égide du Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR). L'International Board for Plant Genetic Resources -IBPGR-, créé en 1974, et renommé successivement International Plant Genetic Resources Institute -IPGRI- puis Bioversity international) fait partie des du dispositif du CGIAR et joue un rôle majeur pour initier ou favoriser la collecte de ressources génétiques dans de nombreux pays, qui se sont alors souvent dotés d'une banque de gènes nationale. En Europe (au sens géographique), l'IPGRI a constitué un programme collaboratif de gestion des ressources génétiques des plantes cultivées (The European Collaborative Programme for Plant Genetic Resources) qui fonctionne via plusieurs réseaux. Le réseau « légumes » comporte notamment un groupe de travail Solanacées, qui a notamment créé les bases de données européennes pour la tomate, l'aubergine et le piment, qui comportent à ce jour les données passeport de 21 000, 6 000 et 9 000 accessions de ces espèces (Daunay et al. 2011). En France, l'INRA (Montfavet, 84) entretient et exploite en recherche des collections de tomate, piment et aubergine comprenant chacune de l'ordre de 1500 introductions, et anime le réseau français des ressources génétiques de ces trois espèces, dont font partie une douzaine de sociétés de sélection, le GEVES (Groupe d'Etude et de Contrôle des Variétés et des Semences) et le CIRAD. Hors Europe, d'autres grandes collections de tomate, aubergine et piment existent, comme par exemple celle de l'USDA-ARS-GRIN à Griffin en Georgie (USA).

### TOMATE

Les ressources génétiques naturelles de la tomate ont été abondamment exploitées pour l'amélioration variétale en particulier pour l'amélioration de sa résistance à de nombreux agents pathogènes, et plus récemment de ses qualités organoleptiques. Malgré une très grande diversité apparente de taille, forme, couleur des fruits, port des plantes, etc., la tomate cultivée présente une biodiversité génétique très faible à la fois du fait de son introduction récente en Europe et de l'inévitable effet fondation, et du fait de son autogamie. Les espèces sauvages ont été très utilisées dans les programmes de sélection pour améliorer les caractéristiques agronomiques de l'espèce cultivée. Ainsi tous les gènes de résistance aux maladies des cultivars actuels proviennent des espèces sauvages (Philouze and Laterrot 1992), qui se sont également révélées être une source de variabilité très intéressante pour l'adaptation aux stress ou l'amélioration de la qualité des fruits (Rick 1979), par exemple *S. cheesmaniae* et *S. chmeilewskii* dont les fruits sont riches en matière sèche (Poysa 1993). Ainsi *S. habrochaites* anciennement appelé *Lycopersicon hirsutum*, dont l'habitat s'étend jusqu'à 3200 m d'altitude,

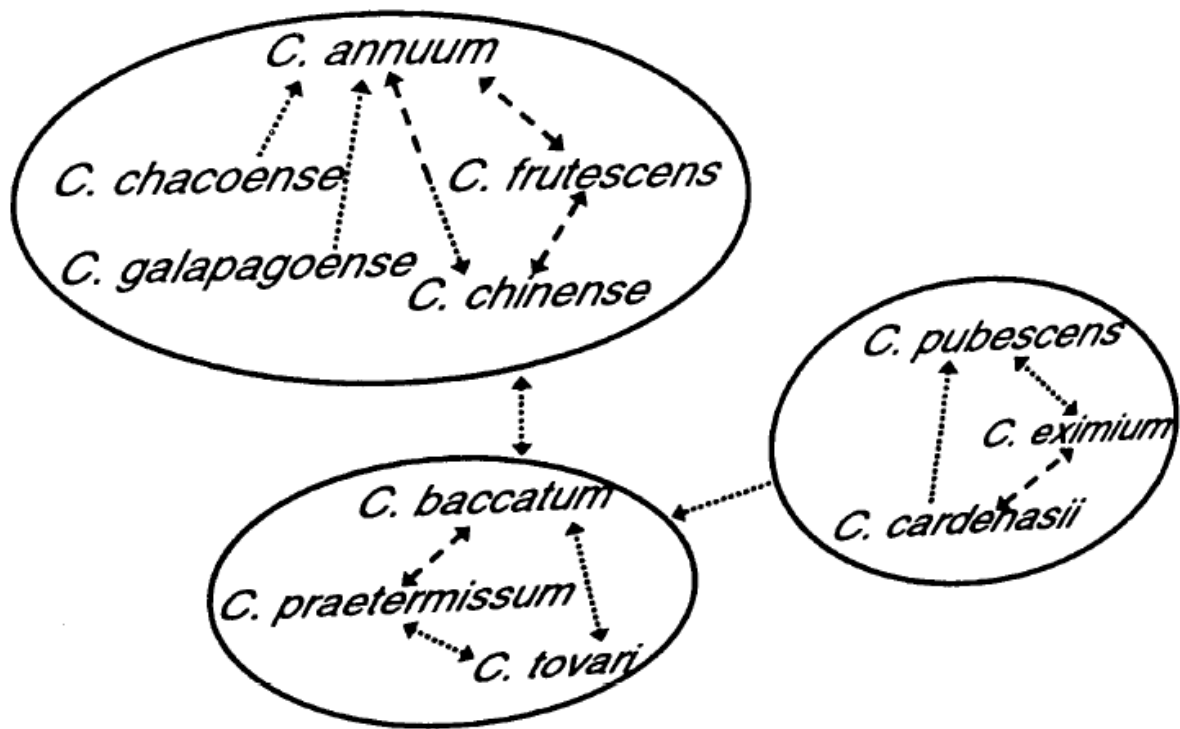
présente une résistance au froid *S. cheesmaniae* qu'on trouve en bord de mer dans les îles Galápagos possède une résistance au stress salin, *S. chilense*, grâce à un puissant système racinaire, et *S. pennellii*, grâce à son aptitude à retenir l'eau dans son feuillage, sont des géniteurs de résistance à la sécheresse (Philouze and Laterrot 1992).

Les croisements interspécifiques entre la tomate cultivée et les autres espèces sauvages sont réalisables assez facilement, sauf avec *S. peruvianum* [au sens large] et *S. chilense* qui nécessitent le recours à la culture d'embryons immatures (Philouze and Laterrot 1992).

### AUBERGINE

L'aubergine et les espèces qui lui sont apparentées sont hermaphrodites et préférentiellement autogames. En milieu ouvert les fleurs sont visitées par des insectes vibreurs (bourdons, différents types d'abeilles) qui sont responsables d'un taux d'allogamie variable selon les conditions environnementales et la morphologie florale, les fleurs longistyles étant plus sujettes à l'allopollinisation que les fleurs peristyles (stigmate à la même hauteur que les pores de déhiscence des anthères). Les ressources génétiques apparentées sont nombreuses, puisque plus d'une centaine d'espèces de *Solanum*, la plupart sauvages, ont été répertoriées (Daunay et al. 1999). La compatibilité en croisement avec l'aubergine a été tentée pour environ la moitié d'entre elles, avec un taux de succès moyen de 30% (Daunay 2008) (ANNEXE 2). Leur usage en sélection est encore limité, du fait que les espèces les plus intéressantes, en particulier *S. torvum* et *S. sisymbriifolium*, résistantes à plusieurs agents pathogènes telluriques (Daunay, 2008) ne donnent pas de descendances fertiles quand on les hybrides avec *S. melongena*. *S. aethiopicum* est l'espèce qui a été utilisée avec succès en sélection, pour introduire la résistance au flétrissement bactérien via croisement sexué (Ano et al. 1991), et la résistance au *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae* via l'hybridation somatique (Rizza et al. 2002).

*S. melongena* présente une très grande variabilité morphologique, notamment pour le poids, la forme, la couleur, la brillance et la fermeté du fruit. Les variétés sont encore très marquées par



**Figure 1.** Compatibilité de croisement entre les différents pools du genre *Capsicum*.

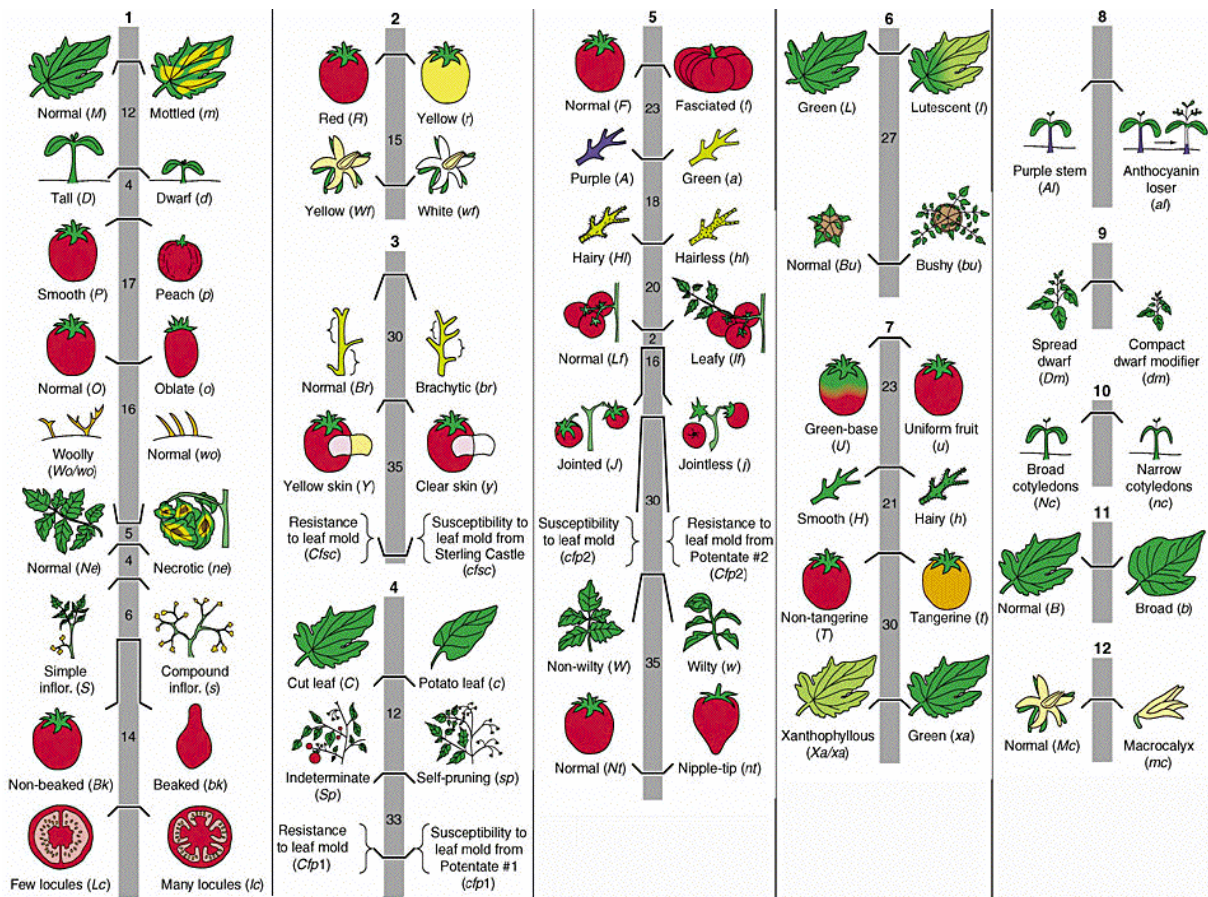
Les flèches sont pointées en direction du parent femelle. Les lignes en tirés indiquent que les hybrides sont obtenus relativement facilement. Les lignes en pointillés indiquent que très peu d'hybrides peu fertiles sont obtenus ou leur obtention dépend des accessions choisies comme parent (Palloix 2006).

leur origine géographique, du fait d'une sélection et commercialisation encore locales jusqu'à récemment : par exemple les variétés extrême orientales sont très précoces et ont une végétation souvent très anthocyanées, les variétés tropicales sont généralement tardives, et les variétés méditerranéennes traditionnelles ont en général une végétation vigoureuse. L'hybridation naturelle entre les variétés cultivées et les formes sauvages de *S. melongena* est commune en Asie, et de nombreux types de plantes intermédiaires entre les formes cultivées et sauvages existent.

### PIMENT

Les espèces du genre *Capsicum* sont hermaphrodites et préférentiellement autogames. Cependant le taux d'allogamie peut être élevé selon la morphologie des fleurs (stigmate plus long que les anthères) et les conditions environnementales, en particulier la présence d'insectes pollinisateurs. De ce fait, il est recommandé de prendre des précautions d'isolement des fleurs lors de la multiplication de lignées par autofécondation.

Le matériel génétique sauvage est, comme dans le cas de la tomate, une source importante de diversité qui peut être utilisée pour améliorer les variétés commerciales. Le matériel génétique sauvage, présent dans une vaste gamme de zones écologiques, constitue un réservoir de gènes. Les complexes, formés à partir de la combinaison des informations relatives à l'origine géographique, aux caractères morphologiques, au système de reproduction, au caryotype et aux marqueurs biochimiques et moléculaires, sont définis en deux groupes phylogénétiques principaux : le groupe des « fleurs blanches » comprenant les complexes *C. annuum* et *C. baccatum* et celui des « fleurs violettes » correspondant au complexe *C. pubescens*. *C. annuum* ne peut se croiser avec le groupe d'espèces à fleurs violettes (**Figure 1**). Bien que difficile, son croisement avec *C. baccatum* et *C. chacoense*, deux espèces riches en caractères utiles, est possible (Pickersgill 1980). Par contre il se croise facilement avec *C. chinense*. La valeur potentielle du matériel génétique sauvage pour l'amélioration du piment commercial est encore sous-exploitée (Bosland 1996).



**Figure 2.** Carte génétique de la tomate basée sur des marqueurs morphologiques (Butler 1952).

## 2. Ressources génomiques

### 2.1. Ressources chez la Tomate, l'Aubergine et le Piment

La richesse de la diversité génétique des Solanacées ainsi que les nombreuses ressources génomiques disponibles, notamment chez la tomate, fait de cette famille végétale un modèle de choix pour des études de génomique comparative. Les moyens pour accroître les connaissances en génétique moléculaire des solanacées sont concentrés sur la tomate dont l'étude génétique est ancienne riche en résultats. La communauté scientifique travaillant sur les solanacées s'est organisée depuis une dizaine d'année sous forme d'un International Solanaceae Genome Project (SOL) piloté par l'Université de Cornell (NY, USA), qui coordonne une partie des recherches en génomique, génétique, phénotypage et taxonomie des solanacées (et des Rubiacées) et rassemble les données acquises dans la base de données SGN (SOL Genomics Network), elle-même liée aux bases similaires des espèces modèles comme *Arabidopsis*. Cette base regroupe au fur et à mesure de leur publication toutes les données relatives aux cartes génétiques, marqueurs, gènes, séquences, bibliothèques de BAC et EST, phénotypes etc. des solanacées cultivées et offre des outils d'analyse de ces données. C'est dans le cadre de SGN que le génome de la tomate a été séquencé et mis à disposition de tous, en 2010. D'autres initiatives internationales importantes existent, qui sont en lien avec SGN, comme le projet "Planetary Biodiversity Inventories (PBI) *Solanum*: a worldwide treatment", financé par l'US National Science Foundation. Ce projet, démarré en 2004, regroupe les compétences et résultats associés aux ressources génétiques, génomiques et phylogénétiques pour le traitement taxonomique du genre *Solanum* (Knapp et al. 2004).

#### TOMATE

La tomate est une espèce diploïde avec 12 paires de chromosomes  $2n=2x=24$  chromosomes. La taille de son génome est composé de 77% de hétérochromatine et 23% d'euchromatine qui correspond aux régions riches en gènes (Diez and Nuez 2008). Cette taille est relativement faible (0,9 pg/génome haploïde 950 Mb) (Arumuganathan and Earle 1991) bien qu'environ six fois plus élevée que celle d'*Arabidopsis thaliana* (0,15 pg/génome haploïde, 120 Mb) et deux fois plus élevée que celle du riz, *Oryza sativa* (0,45 pg/ génome haploïde, 390 Mb), deux fois et demie plus petite que celle du maïs, *Zea mays* (2500 Mb) et presque 17 fois plus petite

**Tableau 2.** Cartes génétiques disponibles chez la tomate (*Lycopersicon* spp.) développées à partir de différents croisements intra- and interspécifiques (Foolad 2007).

Linkage map	Population type <sup>(a)</sup>	Population size	Number of markers	Type of markers <sup>(b)</sup>	Reference
<i>L. esculentum</i> × <i>L. esculentum</i> var. <i>cerasif.</i>					
1. Cervil × Levovil	F <sub>7</sub> -RIL	153	377	RFLP, RAPD, AFLP	[215]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. pimpinellifolium</i>					
1. M82-1-7 × LA1589	BC <sub>1</sub>	257	120	RFLP, RAPD, morphological	[166]
2. NC84173 × LA722	BC <sub>1</sub>	119	151	RFLP	[230]
3. Giant Heirlooom × LA1589	F <sub>2</sub>	200	90	RFLP, CAPS	[40]
4. E6203 × LA1589	BC <sub>2</sub> F <sub>6</sub> -BIL	196	127	RFLP	[231]
5. NC84173 × LA722	F <sub>10</sub> RIL	119	191	RFLP, RGA	Foolad et al. (unpubl.)
6. NCEBR1 × PSLP125	F <sub>2</sub>	172	256	RFLP, EST, RGA	Foolad et al. (unpubl.)
7. NCEBR1 × PSLP125	F <sub>6</sub> -RIL	172	255	RFLP, EST	Foolad et al. (unpubl.)
<i>L. esculentum</i> × <i>L. cheesmanii</i>					
1. UC204B × LA483	F <sub>2</sub>	350	71	RFLP	[232]
2. UC204B × LA483	F <sub>7</sub> -RIL	97	132	RFLP	[233]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. parviflorum</i>					
1. E6203 × LA2133	BC <sub>2</sub>	170	133	RFLP, SCAR, morphological	[234]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. chmielewskii</i>					
1. UC82B × LA1028	BC <sub>1</sub>	237	70	RFLP, Isozyme	[167]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. hirsutum</i>					
1. E6203 × LA1777	BC <sub>1</sub>	149	135	RFLP	[235]
2. E6203 × LA1777	NIL, BIL	111	95	RFLP	[236]
3. NC84173 × PI126445	BC <sub>1</sub>	145	171	RFLP, RGA	[217]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. pennellii</i>					
1. VF36 Tm2 <sup>(a)</sup> × LA716 (high-density map of tomato)	F <sub>2</sub>	67	1050	Isozyme, RFLP, morphological	[228, 229]
2. Vendor Tm2 <sup>(a)</sup> × LA716	F <sub>2</sub>	432	98		[237]
3. M82 × LA716	IL	50	375	RFLP	[238]
4. VF36 Tm2 <sup>(a)</sup> × LA716	F <sub>2</sub>	67	1242	AFLP, RFLP	[218]
5. E6203 (LA925) × LA716	F <sub>2</sub>	83	1500	COS	[198]
6. E6203 × LA1657	BC <sub>2</sub>	175	110	RFLP	[239]
7. E6203 × LA716	F <sub>2</sub>	83	152	SSRs, CAPs	[207]
<i>L. esculentum</i> × <i>L. peruvianum</i>					
1. E6203 × LA1706	BC <sub>3</sub>	241	177	RFLP, SCAR	[240]
<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasif.</i> × <i>L. pimpinellifolium</i>					
1. E9 × L5	F <sub>6</sub> -RIL	142	132	SSR, SCAR	[211]
<i>L. esculentum</i> var. <i>cerasif.</i> × <i>L. cheesmanii</i>					
1. E9 × L3	F <sub>6</sub> -RIL	115	114	SSR, SCAR	[211]
<i>L. peruvianum</i> × <i>L. peruvianum</i>					
1. LA2157 × LA2172	BC <sub>1</sub>	152	73	RFLP	[241]

<sup>(a)</sup> RIL: recombinant inbred line; NIL: near isogenic line; BIL: backcross inbred line.

<sup>(b)</sup> RFLP: restriction fragment length polymorphism; RAPD: randomly amplified polymorphic DNA; AFLP: amplified fragment length polymorphism; CAPS: cleaved amplified polymorphic sequence; RGA: resistance gene analog; EST: expressed sequence tag; SCAR: sequence characterized amplified region; SSR: simple sequence repeat.

que celle du blé (16000 Mb). Plus de 1300 gènes morphologiques, physiologiques (mâle stérilité, maturation du fruit, abscission du fruit, etc.) et gènes de résistance aux maladies ont été décrits chez la tomate, dont moins de 400 ont été cartographiés. La première carte génétique de la tomate, était basée sur des marqueurs morphologiques (Butler 1952) (**Figure 2**).

Les marqueurs moléculaires ont permis de révéler que la diversité génétique de la tomate cultivée est faible, en raison de l'apparition de goulots d'étranglement au cours de sa domestication, de sa migration en Europe. Plusieurs cartes génétiques ont été développées avec divers marqueurs moléculaires sur plus d'une vingtaine de populations de cartographie dérivées de croisements entre une tomate cultivée (*S. lycopersicum*) et des espèces sauvages *S. pennellii*, *S. pimpnellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites* et *S. peruvianum* (**Tableau 2**). Notamment, une population F<sub>2</sub> de cartographie nommée Tomato-EXPEN 1992, qui dérive d'un croisement entre *S. lycopersicum* cv. VF36 et une accession fixée (« inbred ») de *S. pennellii* LA716, a facilité le développement d'une carte de liaison haute densité, 1.030 loci, construite avec des marqueurs RFLP (Tanksley et al. 1992). La carte génétique de référence mise à jour (Tanksley et al. 1992) a permis l'ancrage de la carte physique.

La tomate a été la première espèce de plante pour laquelle un gène de résistance à une maladie a été cartographié puis cloné : le gène *pto* conférant la résistance contre la moucheture bactérienne qui est causée par *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Martin et al. 1993). Par la suite, la cartographie a permis le clonage de plusieurs gènes d'importance en dehors du gène *pto* (Pedley and Martin 2003), tels que *Mi-1.2* pour la résistance contre les nématodes, le QTL *fw2.2* pour le poids des fruits disséqué au niveau d'un seul gène (Frary et al. 2000). La première version de la séquence complète du génome de la tomate a été rendue publique au cours de l'année 2010, sur le site SGN.

### AUBERGINE

L'aubergine est aussi diploïde avec  $2n=2x=24$  chromosomes. La taille du génome haploïde est légèrement plus grande que celle de la tomate et contient 1100 Mb de DNA (2,4 pg/2C) (Arumuganathan and Earle 1991). En comparaison avec la tomate, la pomme de terre et le piment, la connaissance du contrôle génétique des caractères morphologiques et tolérance aux



**Tableau 3.** Résumé des cartes génétiques disponibles chez l'aubergine.

Type de population	Parents	Nombre d'individus	Nombre et type de marqueurs	Distance totale de la carte (cM)	Distance moyenne d'intervalle	Nombre de groupes de liaisons	Référence
F2 intraspécifique	<i>S. melongena</i> cv. EPL-1 x <i>S. melongena</i> cv. WCGR112-8	168	94 RAPD	716,7	8,8	13	Nunome et al. 1998
F2 intraspécifique	<i>S. melongena</i> cv. EPL-1 x <i>S. melongena</i> cv. WCGR112-8	168	88 RAPD 93 AFLP	779,2	4,9	21	Nunome et al. 2001
F2 interspécifique	<i>S. linnaeanum</i> MM195 x <i>S. melongena</i> MM738	58	233 RFLP	1480	7,6	12	Doganlar et al. 2002
F2 intraspécifique	<i>S. melongena</i> cv. EPL-1 x <i>S. melongena</i> cv. WCGR112-8	120	97 RAPD 58 AFLP 7 SSR	716,9	4,9	17	Nunome et al. 2003
F2 interspécifique	<i>S. linneanum</i> cv. PI1767 x <i>S. melongena</i> cv. Buia	48	117 RADP 156 AFLP	736	2,7	12	Sunseri et al. 2003
F2 intraspécifique	<i>S. melongena</i> cv. EPL-1 x <i>S. melongena</i> cv. WCGR112-8	94	229 SSR 7 EST-SSR	959,1	4,3	14	Nunome et al. 2009
F2 interspécifique	<i>S. linnaeanum</i> MM195 x <i>S. melongena</i> MM738	58	110 COSII 5 marqueurs dérivés de tomate 232 RFLP	1535,4	4,42	12	Wu et al. 2009

stress biotiques et abiotiques de l'aubergine est moindre (Daunay et al. 2001), et aucune carte génétique basée sur des caractères morphologiques n'a été construite. Cette situation est liée à la fois à une moindre mise en œuvre de moyens, et au contrôle oligogénique ou polygénique de la plupart des caractères agronomiques, ce qui complique leur dissection. Depuis l'avènement des marqueurs moléculaires, plusieurs travaux de cartographie ont été réalisés chez l'aubergine depuis une dizaine d'années (**Tableau 3**). Les marqueurs RAPD ont été les premiers à être utilisés (Nunome et al. 1998; Sunseri et al. 2003), suivis de marqueurs AFLP, RFLP et microsatellite (Doganlar et al. 2002a; Nunome et al. 2001; Nunome et al. 2009; Nunome et al. 2003). La première carte génétique complète et alignée sur celle de la tomate (Doganlar et al. 2002a) a été construite avec des marqueurs RFLPs sur une population F<sub>2</sub> issue du croisement interspécifique entre *S. linnaeanum* et *S. melongena*. Les QTLs impliqués dans la variation de nombreux caractères morphologiques ont été positionnés sur cette carte (Frary et al. 2003). La carte de référence basée sur les RFLP a été complétée avec des marqueurs COSII (Wu et al. 2009b).

Depuis la première synthèse des connaissances sur le génome de l'aubergine et sa cartographie (Frary et al. 2007), de nouvelles avancées ont eu lieu, avec le développement de banques de microsatellites génomiques ou dérivés d'EST d'aubergine (Nunome et al. 2009; Stigel et al. 2008), d'un jeu d'unigènes d'aubergine (Fukuoka et al. 2010b), de nouvelles cartes génétiques intraspécifiques (Barchi et al. 2010; Fukuoka et al. 2010b) et de marqueurs liés à des caractères d'intérêt comme la résistance au *Fusarium* (Mutlu et al. 2008; Toppino et al. 2008) et au flétrissement bactérien (Cao et al. 2009).

### PIMENT

Le piment est également une espèce diploïde avec 12 paires de chromosomes  $2n=2x=24$  chromosomes. La taille du génome haploïde est d'environ 2.702 Mbp/C (Arumuganathan and Earle 1991), qui est presque celle du génome humain et 18 fois supérieure à celle d'*Arabidopsis*. La première carte génétique du piment a été créée à l'INRA grâce à l'utilisation d'une série complète de trisomies obtenue chez *C. annuum*. Elle a été développée à partir de la descendance par autofécondation d'une plante haploïde appartenant au cultivar « Doux-des-Landes » (Pochard 1970). Les 12 chromosomes ont été ainsi individualisés et tous sont reconnaissables par leurs phénotypes auxquels ont été attribués des noms de couleurs (violet, indigo, bleu, vert, jaune, orangé, rouge, pourpre, noir, brun, bistre,

gris). Seulement trois des 12 chromosomes diffèrent significativement en longueur et sont cytologiquement identifiables : violet correspondant au chromosome I (chromosome le plus long), jaune correspondant au chromosome XI (petit chromosome à centromère subterminal) et pourpre correspondant au chromosome XII (chromosome le plus petit, acrocentrique et porteur de l'organisateur nucléaire). Les neuf autres sont métacentriques et ont des longueurs trop proches pour permettre leur distinction. Pochard (1977) a localisé plusieurs gènes majeurs par l'étude des ségrégations de descendances de plantes trisomiques : 16 gènes ont été attribués à 8 chromosomes différents dont les gènes *C* (présence de capsaïcine) sur le chromosome jaune, *up* (port dressé du fruit) sur le chromosome noir, *L* (résistance au virus de la mosaïque du tabac) sur le chromosome brun, *vy* (résistance au virus de la mosaïque de la pomme de terre) sur le chromosome orange. La construction de groupes de liaison chez le piment a débuté lors du positionnement sur la première carte chromosomique du piment de 14 gènes codant pour des enzymes (Tanksley 1984). Puis, le marquage moléculaire au moyen de 80 clones d'ADNc et de sondes génomiques a été fait à l'Université de Cornell (NY, USA) et a permis d'identifier 14 groupes de liaison (Tanksley et al. 1988). Par la suite, de nombreuses cartes moléculaires intraspécifiques et interspécifiques ont été construites, dont les caractéristiques sont indiquées dans le (ANNEXE 3). Il existe aussi des cartes consensus intégrant les marqueurs de plusieurs populations comme celle publiée par Barchi et al. (2007).

### **2.2. Génomique comparative chez les Solanacées**

De nombreuses études de cartographie comparative ont été réalisées avec des espèces de Solanaceae, entre la tomate ( $2n = 2x = 24$ ) et la pomme de terre ( $2n = 4x = 48$ ) (Bonierbale et al. 1988; Tang et al. 2008; Tanksley et al. 1992) entre la tomate et le piment ( $2n = 2x = 24$ ) (Livingstone et al. 1999; Prince et al. 1993; Tanksley et al. 1988; Wu et al. 2009a), la tomate et l'aubergine ( $2n = 2x = 24$ ) (Doganlar et al. 2002a; Wu et al. 2009b). Bien que les espèces-membres de la famille des Solanaceae soient phénotypiquement diverses, une analyse comparative des génomes de sept d'entre elles, dont la tomate, la pomme de terre, le piment, l'aubergine et le tabac, indique que leurs génomes sont très conservés. Ils ont subi peu de réarrangements et duplications génomiques et leur contenu et l'ordre des gènes sont très similaires. Des marqueurs COS (conserved orthologs set), orthologues chez plusieurs espèces,

ont été récemment décrits (Fulton et al. 2002; Wu et al. 2006) et utilisés pour aligner plusieurs cartes sur celles de la tomate.

Les génomes de la tomate et de la pomme de terre diffèrent de seulement quelques réarrangements chromosomiques, chacun d'eux impliquant une seule cassure proche du centromère résultant en inversions paracentriques (qui n'impliquent pas le centromère) des bras courts des chromosomes 5, 6, 9, 11 et 12 et du bras long du chromosome 10 (Bonierbale et al. 1988; Tang et al. 2008; Tanksley et al. 1992). L'inversion sur le chromosome 10 a démontré que les génomes de *S. lycopersicoides* et *S. sitiens* sont colinéaires (Pertuzé et al. 2002) suggérant ainsi que cette inversion était fixée dans l'ancêtre commun de la lignée des tomates.

Une comparaison entre les cartes de la tomate et l'aubergine a révélé une conservation de large région de marqueurs colinéaires (Doganlar et al. 2002a) similaire à celle observée chez la pomme de terre et le piment. Durant leur évolution, à partir de leur dernier ancêtre commun, l'aubergine et la tomate se sont différenciées par 24 inversions et 5 translocations chromosomiques, mais également par un certain nombre de transpositions de gènes possiblement apportés par des éléments transposables (Wu et al. 2009b). Le génome nucléaire de l'aubergine est de plus légèrement plus grand que celui de la tomate 1100 Mb d'ADN (1,2 pg/1C) K (Arumuganathan and Earle 1991).

Les génomes de la tomate et du piment présentent des réarrangements plus nombreux, essentiellement des inversions (19) dont seulement deux inversions péricentriques et des translocations depuis leur différenciation à partir de leur ancêtre commun (Livingstone et al. 1999; Wu et al. 2009a). Huit chromosomes chez le piment, excepté P2, P6, P7 et P10) étaient impliqués dans un évènement ou plus de translocations (Wu et al. 2009a)

A en juger par la comparaison des génomes de tomate, de pomme de terre, de piment, et d'aubergine, il semble que le mécanisme primaire intervenant dans l'évolution chez les Solanaceae soit l'inversion paracentrique (Doganlar et al. 2002a). Une récente étude comparative des séquences génomiques de sept espèces de Solanaceae, incluant la tomate, la pomme de terre, le piment, l'aubergine, le pétunia, le tabac, et *Nicotiana benthamiana*, a confirmé un haut degré de conservation de séquence entre espèces de solanacées (Buell et al. 2006). La comparaison de 27000 unigènes (sequences consensus unique) a révélé que 70%

des unigènes présents chez les solanacées ont des homologues identifiables dans le génome d'*Arabidopsis* (Van der Hoeven et al. 2002).

Trois bases de données rassemblant de nombreuses ressources génomiques sont consultables, deux sont spécifiques à la tomate et la 3ème est consacrée aux Solanacées:

- DFCI Tomato Gene Index, LeGI, <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=tomato>: représente une synthèse non-redondante de tous les unigènes identifiés chez la tomate avec les séquences consensus obtenues après assemblage des séquences d'EST, des données sur leurs fonctions et leurs profils d'expression. La dernière mise à jour de la base de données du 13 avril 2010 recense 299800 EST et 52502 unigènes (version 13.0).
- Tomato Expression Database, TED, <http://ted.bti.cornell.edu/>: rassemble des données d'expression essentiellement obtenues à partir de puces à ADN spécifiques de la tomate (Fei et al. 2006)
- Sol Genomics Network, SGN, <http://www.sgn.cornell.edu/>: réunit des informations sur la taxonomie, la génétique, et la génomique des espèces de la famille des Solanacées principalement (tomate, aubergine, pomme de terre, piment, pétunia) et du caféier de la famille des Rubiacées (Mueller et al. 2005).

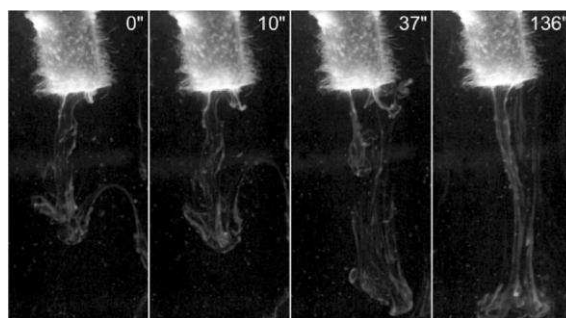
### **3. Flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum***

*R. solanacearum* est une bactérie vasculaire d'origine tellurique qui est responsable du flétrissement bactérien. Cette bactérie possède un large spectre d'hôte qui comprend plus de 200 espèces hôtes appartenant à au moins 50 familles et infecte aussi bien les monocotylédones que les dicotylédones (dont les Solanacées, les légumineuses...). Certaines de ces plantes hôtes présentent un intérêt économique important tel que la pomme de terre, la tomate, la banane, l'arachide, l'aubergine, le piment ou le tabac. *R. solanacearum* est présente sur les cinq continents, d'abord observée dans les zones tropicales, subtropicales, méditerranéenne, elle est désormais signalée dans des régions plus tempérées d'Europe ou d'Amérique du Nord (Hayward 1991). *R. solanacearum* a été observé en Europe sur des cultures de pomme de terre et de tomate et également sur des mauvaises herbes (*Solanum dulcamara*, morelle douce-amère) et sur *Pelargonium* sp. (Janse 1996).

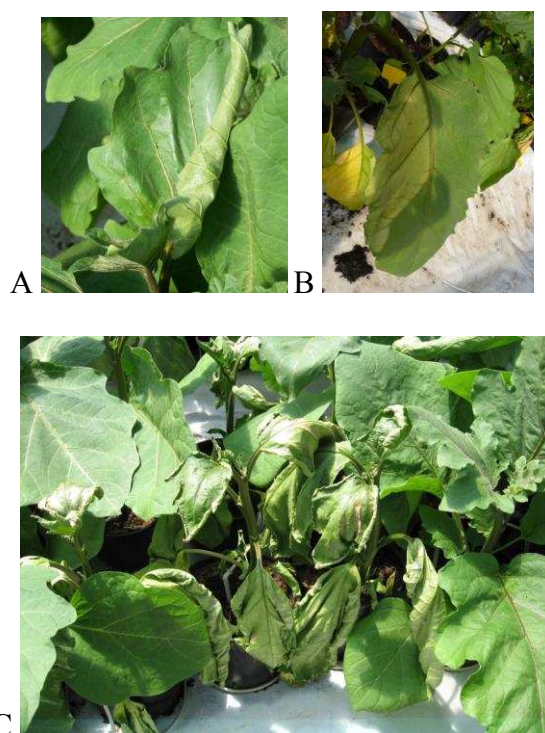
#### **3.1. Symptomatologie**

Le flétrissement soudain et irréversible de l'appareil végétatif aérien est le symptôme le plus caractéristique de la maladie chez la plupart des plantes hôtes de *R. solanacearum* (Buddenhagen and Kelman 1964). Cependant, la vitesse d'apparition et l'intensité de la maladie dépendent de l'hôte (espèce, cultivar, stade physiologique), de la nature de la souche et de la quantité de l'inoculum mais aussi surtout des interactions avec l'environnement (températures, humidité, type de sol, présence de nématodes, etc.).

Chez les Solanacées, le premier symptôme visible est l'enroulement et le flétrissement des feuilles, avec infléchissement des pétioles vers le bas (épinastie), pendant la période chaude de la journée comme si le flétrissement était dû à un manque d'eau. Les feuilles peuvent récupérer durant la nuit lorsqu'elle est fraîche (<24°C). Les feuilles flétries attachées à la tige conservent leur couleur verte. Lorsque la maladie évolue plus lentement, le flétrissement du système aérien voire même des feuilles correspondant aux tissus conducteurs colonisés est d'abord unilatéral. Les autres symptômes associés au flétrissement bactérien sont des chloroses, un retard de croissance, un rabougrissement, une courbure de l'apex de la plante. Au stade final de la maladie, la moelle et le cortex de la tige peuvent présenter des lésions



**Figure 3.** Test simple pour observer l'exsudat bactérien provenant d'une tige de tomate infestée placée dans un verre d'eau (Denny 2006).



**Figure 4.** Photographies d'aubergine après inoculation d'une souche de *R. solanacearum*.  
 A : Enroulement d'une feuille. A ce stade, on n'est pas sûr qu'il s'agisse d'un symptôme de flétrissement bactérien, cela pourrait être juste un symptôme de stress hydrique.  
 B : Flétrissement unilatérale d'une feuille d'aubergine.  
 C : Plantes flétries entourées par des plantes ne présentant pas de symptôme de la maladie.

**Tableau 4.** Regroupement des souches *Musa* de *R. solanacearum* en fonction de leur spécificité d'hôtes

Groupe de souches	Sequevar	MLG	Hôte
SFR et A	4	25	Bananier ( <i>Musa</i> du groupe AAA) Plantain ( <i>Musa x paradisiaca</i> du groupe AAB) Banane légume de type Bluggoe (ABB)
B	3	24	Bananier
H	3	24	Plantain

MLG : multilocus group

humides et brunes. Ce brunissement des vaisseaux du xylème peut être observé en faisant une coupe longitudinale dans les racines ou la tige de la plante infectée par *R. solanacearum*. Après une coupe transversale de la tige infectée, un exsudat blanc, jaunâtre peut suinter spontanément du tissu vasculaire coupé. Cet exsudat bactérien s'écoule librement sous la forme de filament hors des vaisseaux coupés du xylème si l'on suspend l'extrémité de la tige inférieure dans un verre d'eau (**Figure 3**). Ces filaments sont caractéristiques de *R. solanacearum* et ne sont pas formés par les autres agents pathogènes des Solanacées. Dans des conditions climatiques favorables (chaud et humide), le flétrissement apparaît rapidement sur l'ensemble des feuilles de la plante et précipite la mort de la plante. La tomate est probablement la culture la plus souvent affectée par le flétrissement bactérien en raison de sa répartition mondiale et de sa sensibilité à quasi toutes les souches dans l'arbre phylogénétique. Les premiers symptômes se manifestent souvent par l'épinastie foliaire de quelques folioles ou feuilles mais également par l'apparition sur les tiges de bourrelets et de racines adventives qui extériorisent l'accumulation d'acide indole-3-acétique dans les cellules végétales (Buddenhagen and Kelman 1964). Le piment manifeste plus rarement le symptôme de flétrissement. Une caractéristique spécifique du flétrissement bactérien chez le piment est la chute des feuilles suivie du dessèchement de la plante. Chez le tabac et l'aubergine, le flétrissement unilatéral est un des principaux symptômes (**Figure 4**). Enfin, chez la pomme de terre, *R. solanacearum* provoque un flétrissement des plants mais également la pourriture brune du tubercule (brown rot). Des symptômes externes peuvent être visibles ou non, selon l'état de développement de la maladie. Lorsque la maladie est avancée, le tubercule de pomme de terre peut exsuder la bactérie des yeux et du talon. Le tubercule finit par se décomposer, d'où le nom de pourriture brune. Une coupe du tubercule infecté de pomme de terre fait apparaître un anneau vasculaire brun noir, pouvant laisser s'échapper un exsudat bactérien de couleur crème sur la surface coupée.

Chez les Musaceae, le flétrissement bactérien porte un nom spécifique : la maladie de Moko. Les souches Moko de *R. solanacearum* peuvent provoquer des symptômes différents allant du nanisme et la distorsion d'organe jusqu'au flétrissement et la destruction du plant, selon la spécificité d'hôtes (**Tableau 4**) (Fiche ARP BAN-b1). Le schéma de développement de la maladie diffère selon que la souche a été disséminée par le sol, l'eau ou la machette d'une part, ou d'autre part, par les insectes ou les cicatrices après abscission des fleurs.

Les premiers symptômes de la colonisation bactérienne ascendante (sol-racine-xylème) se manifestent par des chloroses et le flétrissement des plus jeunes feuilles. Puis les feuilles les



plus anciennes flétrissent et le bananier meurt (syndrome de « pencil point » des anglo-saxons). Si le bananier contaminé porte un régime, la bactérie peut coloniser les tissus vasculaires via le rachis. Un jaunissement prématuré du fruit peut être observé due à l'accumulation d'éthylène. Une coupe transversale des fruits peut révéler un brunissement important de la pulpe.

Les premiers symptômes apparaissent sur les fleurs et les fruits, bien avant que les feuilles ne commencent à flétrir dans le cas de contamination aérienne par les souches Moko (insecte/machette-rachis-xylème). On peut observer un noircissement de la fleur mâle, un suintement d'exsudat bactérien au niveau des bourgeons, un jaunissement anormale, voir même des craquelures des fruits et également un brunissement vasculaire observable après une coupe transversale des fruits. Au niveau de la pulpe du fruit, peut également se développer une pourriture sèche et grisâtre.

Cas particulier aux Philippines, des souches de *R. solanacearum* indifférenciables des souches Moko provoquent ce qui est appelé la maladie de Bugtok ou Tapurok du nom vernaculaire des clones de bananier plantain consommés. Elle est également transmise par les insectes. Les symptômes différents de la maladie Moko sur les cultivars de plantain Carbada (ABB ou BBB), Saba (ABB ou BBB) et Latundan (AAB) sont un durcissement des fruits immatures, une pourriture importante sèche et gris-noire de la pulpe observable après coupe transversale des fruits, un jaunissement prématuré du régime à un stade plus avancé, une colonisation vasculaire importante du rachis avec production d'un brunissement brun-rouge. Contrairement à la Moko, la colonisation bactérienne est rarement systémique, ainsi, la maladie de Bugtok ne provoque pas de flétrissement généralisé du plant, mais un durcissement qui le rend inconsommable.

### **3.2. Le complexe d'espèce *Ralstonia solanacearum***

#### **3.2.1. Caractéristiques générales de *Ralstonia solanacearum***

Smith E. F. a décrit pour la première fois la maladie (bacterial wilt) en 1896 et la bactérie responsable du flétrissement bactérien fut alors appelée *Bacillus solanacearum* ou encore *Bacterium solanacearum*. En 1914, Smith, se basant sur le système classification taxonomique des bactéries proposé par Migula (1900) reclassa cette bactérie dans le taxon des Pseudomonacées en tant que *Pseudomonas solanacearum* (Smith 1914). La bactérie porta ce

**Tableau 5.** Caractéristiques de *Ralstonia solanacearum* (Hayward et al. 1964 ; He et al. 1983 ; Velupillai et Stall, 1984 ; Wall et Kaiser 1999 ; Tans-Kersten et al. 2001)

Famille	Pseudomonadacées
Morphologie	Bacille
Coloration de Gram	Négatif
Flagelle	≥ 1
Métabolisme des sucres	Oxydatif
Spore	-
Autotrophie avec H <sub>2</sub>	-
Production de pigments (LPGA)	d <sup>a</sup> (brun)
Production de pigments fluorescents (KingB)	-
Croissance à 40°C	-
Enzymes	Cytochrome c oxydase Catalase
Substance de réserve	Poly- β-hydroxybutyrate
Hydrolyse	
Amidon	-
Gelatine	-
Activité	
Arginine hydrolase	-
Lécithinase	-
Nitrate réductase	+
Oxydase	-
Catalase	-
Lipase	D
Phosphatase	D
Formation de mélanine	D
Utilisation	
D-galactose	D
D-glucose	+
D-ribose	D
D-xylose	-
Saccharose	+

<sup>a</sup> d : réponse différente selon les souches

**Tableau 6.** Caractéristiques générale des génomes des souches de *R. solanacearum* CFBP2957, CMR135, PSI07, GMI1000, IPO1609 et Molk2 (Remenant et al. 2010).

Souches	CFBP2957	CMR15	PSI07	GMI100	IPO1609	Molk2	Moyenne
Phylotype	IIA	III	IV	I	IIB	IIB	
Origine géographique	Antilles	Cameroun	Indonésie	Guyane française	Pays Bas	Indonésie	
Longueur Chromosome	3 594 081	3 508 632	3 539 015	3 716 413	NA	NA	3 589 535
Mégaplasmide	1 963 952	2 084 845	2 144 387	2 094 509	NA	NA	2 071 923
Plasmide	35 008	12 811	-	-	-	-	23 910
Génome	5 593 041	5 606 288	5 683 402	5 810 922	5 523 292	5 862 101	5 679 841
Ratio G+C (%)	66,9%	66,9%	66,3%	67,0%	66,7%	66,7%	66,7%
Séquence codante	5 310	5 149	5 247	5 635	5 203	5 438	5 330
Nombre d'opéron ARNr	1	3	1	4	1	1	1,7
Nombre d'ARNT	56	59	49	57	NA	NA	47,3

NA : données manquantes ; - : absence de plasmide

nom d'espèce une centaine d'années. Par la suite, sur la base de caractéristiques phénotypiques, l'analyse des acides gras et autres lipides cellulaires, l'analyse phylogénique des séquences nucléotidiques de l'ARN ribosomique 16S et l'homologie ADN-ARN, la bactérie est placée très furtivement dans le genre *Burholderia* (Yabuuchi et al. 1992) puis enfin placée sur la base des mêmes critères dans le genre *Ralstonia* pour être connu aujourd'hui sous le nom *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi et al. 1996).

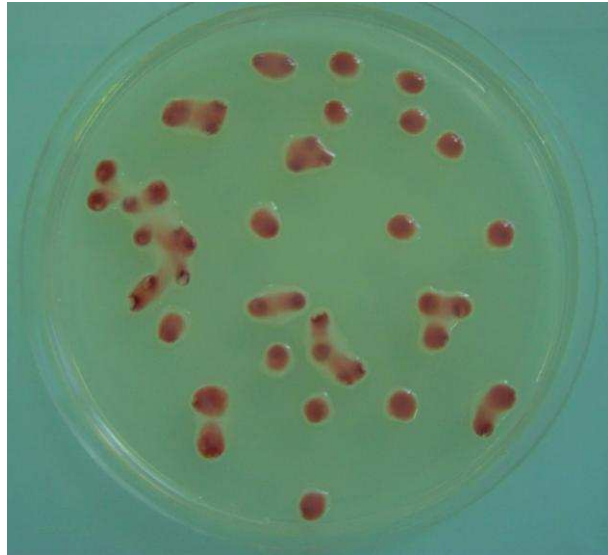
*R. solanacearum* est une  $\beta$ -protéobactérie de type gram négatif (Stackebrandt et al. 1988). Ce bacille de dimension moyenne de 0,5 x 1,5  $\mu\text{m}$  possède un ou plusieurs flagelles polaires lui permettant de se mouvoir. La mobilité contribue de façon importante à la virulence au flétrissement bactérien au cours des stades précoces d'invasion et de colonisation de la plante hôte (Tans-Kersten et al. 2001). Cette bactérie de type aérobie strict, non fluorescent, possédant une oxydase, métabolise le glucose par voie oxydative et accumule du poly- $\beta$ -hydroxybutyrate dans son cytoplasme à partir d'un milieu riche en carbone. Les principales caractéristiques de *R. solanacearum* sont regroupées dans le **Tableau 5**.

Le séquençage récent de souches de *R. solanacearum* couvrant l'essentiel de la diversité génétique établie à ce jour, a permis un progrès considérable des connaissances sur *R. solanacearum* et le déterminisme génétique du pouvoir pathogène. A l'heure actuelle, 6 souches ont été séquencés et les génomes publiés : GMI1000 (phylotype I) (Salanoubat et al. 2002), IPO1609 (phylotype IIB), Molk2 (phylotype IIB) (Guidot et al. 2009b), CFBP2957 (phylotype IIA), CMR15 (phylotype III), et PSI07 (phylotype IV) (Remenant et al. 2010). Les principales caractéristiques de ces six génomes sont résumées dans le **Tableau 6**. Deux autres souches BDB, agent responsable de la maladie du sang du bananier (blood disease of banana), et *R. syzygii* (anciennement nommé *Pseudomonas syzygii*) qui est pathogène du giroflier en Indonésie, appartenant au phylotype IV sont en cours d'analyse (Remenant, CIRAD). Pour l'essentiel, *R. solanacearum* possède un génome bipartite organisé en deux réplicons circulaires, un chromosome et un mégaplasmide (Salanoubat et al. 2002). C'est un des premiers organismes pour lequel une organisation génomique bipartite a été décrite (Genin and Boucher 2004). La taille moyenne du génome est approximativement de 5,7 Mb incluant le chromosome (3,6 Mb) et le mégaplasmide (2,1 Mb) (Remenant et al. 2010). La littérature fait très peu cas de la présence de plasmide. Cependant, en 1985, des petits plasmides, de taille inférieure à 100kb, ont été rapportés dans plusieurs souches de *R. solanacearum* (Morales and Sequeira 1985). Plus récemment, deux petits plasmides pRSC35 (35kb) et

pRSI13 (12,8kb) appartenant, respectivement, aux souches CMR15 (phylotype III) isolée au Cameroun et PSI07 (phylotype IV) isolée en Indonésie ont été séquencés (Remenant et al. 2010). Leur faible nombre de copies les rendraient difficile à purifier et donc difficile à détecter.

Le chromosome porte l'ensemble (80%) des gènes de ménage permettant la survie de la bactérie tels que les gènes contrôlant la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la transcription, la traduction et la division cellulaire. A l'inverse, le mégaplasmide ne porte pas de gènes indispensables au fonctionnement de la cellule qui ne soient pas déjà présents sur le chromosome. Cependant, il possède des gènes codant plusieurs enzymes impliqués dans le métabolisme primaire dont la synthèse de certains acides aminés et de cofacteurs. Le mégaplasmide héberge plusieurs facteurs qui sont impliqués dans la virulence de la bactérie, notamment les gènes contrôlant la production d'exopolysaccharides (EPS), les gènes codant pour les constituants du flagelle et les gènes *hrp* gouvernant le système de sécrétion de type III (TTSS, type three secretion system) et les effecteurs associés au TTSS. Ainsi, le mégaplasmide pourrait jouer un rôle important dans l'adaptation de la bactérie à différentes conditions environnementales. Bien que son origine soit clairement plasmidique (Salanoubat et al. 2002); le mégaplasmide est devenu un élément indispensable du génome. Les deux réplicons au sein de *R. solanacearum* ont co-évolué depuis longtemps (Coenye and Vandamme 2003; Guidot et al. 2007).

Les deux réplicons ont une structure mosaïque due aux nombreux réarrangements et acquisition de gènes par transferts horizontaux (Salanoubat et al. 2002). Près de 16% du génome de *R. solanacearum* soit 547 sur 3436 gènes analysés ont été acquis suite à des transferts horizontaux de gènes (Nakamura et al. 2004). Souvent associés aux éléments génétiques mobiles, certains gènes ou régions, nommés régions à usage de codon alternatif, ACURs (alternative codon usage regions), présentent un usage de codon et une composition en G+C différents de ceux trouvés dans le reste du génome, de 50 à 70% de variation du contenu en G+C par rapport à la moyenne 67% dans l'ensemble du génome de GMI1000 (Salanoubat et al. 2002). Chez GMI1000, 93 ACURs de taille variant de 1 à 20kb représentent plus de 7% du génome. Ces séquences d'insertions et ces régions acquises par transfert horizontaux codent souvent pour des fonctions d'adaptation comme des voies métaboliques supplémentaires, des résistances aux antibiotiques ou des facteurs de virulence. Guidot et al (2009a) ont détecté des transferts de gènes connus ou candidat de la pathogénicité tels que les



**Figure 5.** Photographie de colonies de *R. solanacearum* sur milieu Kelman.

gènes de la famille *hrp* contrôlant le système de sécrétion de type III, les gènes *popB* et *popC* codant pour les effecteurs associés. Sa capacité d'acquérir et de recombiner de l'ADN par transformation naturelle (Bertolla et al. 1999; Bertolla et al. 1997) suggère une grande plasticité du génome de *R. solanacearum*. Les caractéristiques de son génome pourraient être à l'origine de la diversité génétique de *R. solanacearum*, et de sa très large gamme d'hôte et de sa répartition géographique.

Les colonies de *R. solanacearum* cultivées sur milieu Kelman contenant du chlorure de triphéniltétrazolium (TTC) sont visibles après 2 ou 3 jours d'incubation à 28°C (Kelman 1954). L'aspect de cette bactérie sur ce milieu sélectif dépend de son pouvoir pathogène. Les colonies obtenues à partir de plants malades sont reconnaissables et présentent un morphotype dit « muqueux » ou fluide, dû à la production massive d'exopolysaccharides (EPS) (**Figure 5**). Ces colonies ont une forme irrégulière, fluide, lisse et sont opaques, leur couleur est blanchâtre à rosée au centre. Cette forme muqueuse est généralement associée à la virulence (Kelman 1954). Un variant spontané du morphotype muqueux, avirulent, forme des colonies dites « rugueuses » plus petites, rondes, et sèches car ce variant produit peu ou pas d'EPS. Le morphotype rugueux forme des colonies rondes de couleur rouge vif due à l'accumulation de formazan. La conversion phénotypique correspondant à la transition de la forme muqueuse à la forme rugueuse s'observe fréquemment en culture et également spontanément *in planta* (Buddenhagen and Kelman 1964). Cette conversion s'accompagne d'autres modifications : chez les mutants avirulents, la mobilité est accrue, la production de polygalacturonase est plus élevée mais les productions d'endoglucanase et de lipopolysaccharides (LPS) sont altérées (Brumbley et al. 1993; Brumbley and Denny 1990; Denny et al. 1994; Jeong and Timmis 2000). De plus, la réversion phénotypique (passage de la forme rugueuse à la forme muqueuse) est dépendante de la présence de plante hôte car elle a été observé *in planta* et *in vitro* mais seulement en présence d'exsudat racinaire de tomate (Poussier et al. 2003).

### 3.2.2. Diversité phénotypique et génétique

*R. solanacearum* présente une très grande variabilité phénotypique, génotypique et du pouvoir pathogène comme en atteste sa vaste gamme d'hôte et sa capacité à s'adapter à différents environnements agro-climatiques. La grande plasticité de cette bactérie peut expliquer en partie la diversité génétique. En effet, *R. solanacearum* est naturellement transformable. Cette compétence lui permet d'assimiler, d'intégrer et d'exprimer de l'ADN extracellulaire

**Tableau 7.** Classification en race en fonction du spectre d'hôte (Buddenhagen & Kelman 1964 ; He et al. 1983; Pegg & Moffett 1971 et Williamson et al. 2002, Denny 2006).

Race	Plantes hôtes
1	Solanacées Bananiers diploïdes Brassicacées Légumineuses Euphorbiacées Casuarinacées Rubiacées Anthurium Arachide Olivier Géranium Fraisier Eucalyptus
2	Musacées Heliconiacées
3	Pomme de terre Tomate Géranium
4	Zingiberacées
5	Mûrier

(Bertolla et al. 1999; Bertolla et al. 1997; Boucher et al. 1985; Coupat et al. 2008; Guidot et al. 2007). Ces transferts de gènes horizontaux (THG) pourraient ainsi être impliqués dans l'expansion de répartition géographique de *R. solanacearum* et aussi dans l'augmentation de la gamme d'hôtes par des mécanismes adaptatifs d'échappement des systèmes de défenses des plantes. Dans le but de caractériser les milliers de souches différentes qui constituent la biodiversité chez *R. solanacearum* et d'espèces phylogénétiquement proches, plusieurs systèmes de classification ont été proposés, établis soit sur la base de la gamme d'hôte (la race), soit sur les caractéristiques physiologiques ou métaboliques de la bactérie (le biovar), soit sur la base du polymorphisme de séquences nucléotidiques de gènes ou d'inter-gènes choisis (le phylotype).

### CLASSEMENT EN RACE

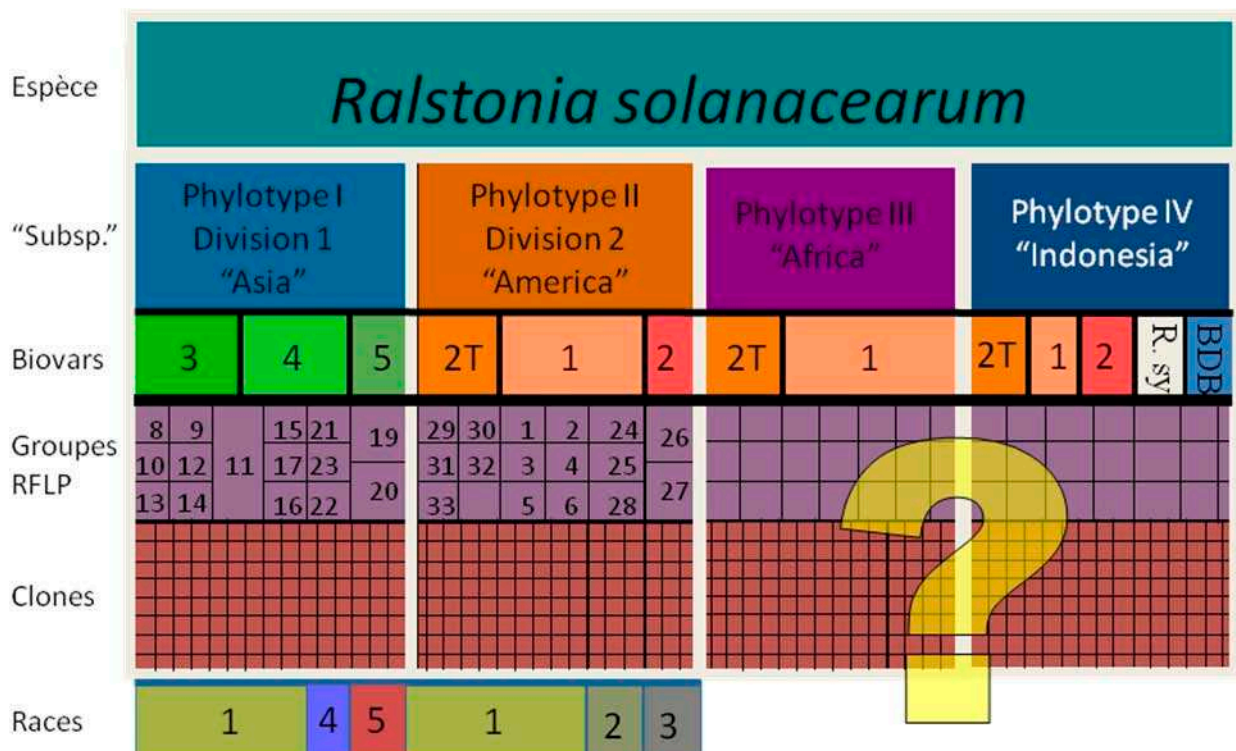
La diversité du pouvoir pathogène est divisée en cinq races en fonction du spectre d'hôtes des souches (**Tableau 7**) (Buddenhagen and Kelman 1964; He et al. 1983; Pegg and Moffett 1971; Williamson et al. 2002). Tout en étant le groupe de souches le plus répandu en climat tropical, la race 1 est très hétérogène puisqu'elle possède le spectre d'hôtes le plus vaste comparé aux autres races. Elle regroupe les souches pathogènes de nombreuses Solanacées telles que le tabac, la tomate, la pomme de terre, l'aubergine et le piment/poivron, etc., des bananiers diploïdes ornementaux et d'autres espèces de plantes appartenant aussi bien à des mono que des dicotylédones. Les races 2 et 3 présentent des spectres d'hôtes plus restreints. La race 2 présente en Amérique centrale, aux Caraïbes, et en Asie tropicale est responsable de la maladie de la Moko transmise par insecte et de la Maladie de Bugtok en Indonésie. Présente en zone méditerranéenne et tempérée, la race 3 initialement décrite comme inféodée à la pomme de terre est pathogène de la tomate mais faiblement virulente sur les autres cultures de Solanacées et est également pathogène sur le géranium (Williamson et al. 2002). Originaire des hauts plateaux andins (Prior & Samson, S. 1996), les souches de la race 3 dite « froides » en raison de sa capacité à infecter la pomme de terre dans des conditions de température basse. En effet, contrairement aux souches tropicales de plaine, l'agressivité de ces souches est forte dès 16°C, ont un optimum de température voisinant les 20-23°C au lieu de 25-30°C pour les autres souches « chaudes ». Les souches des races 4 et 5 ont une gamme d'hôtes encore plus restreinte puisque les souches de la race 4 sont pathogènes du gingembre et autres Zingibéracées (Pegg and Moffett 1971) et les souches de la race 5 sont inféodées au mûrier (He et al. 1983).



**Tableau 8.** Caractéristiques différentielles des biovars de *R. solanacearum* (Hayward 1964 ; Hayward 1992 et He et al. 1983).

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

+ : utilisation du sucre ou du sucre alcool ; - : pas d'utilisation



**Figure 6.** Tableau de correspondances entre les différentes classifications de *R. solanacearum* (d'après Prior).

La diversité génétique des phylotypes III et IV restent encore à explorer chez *R. solanacearum* et chez les autres espèces proches : *R. syzygii* (R. sy)

### CLASSEMENT EN BIOVARS

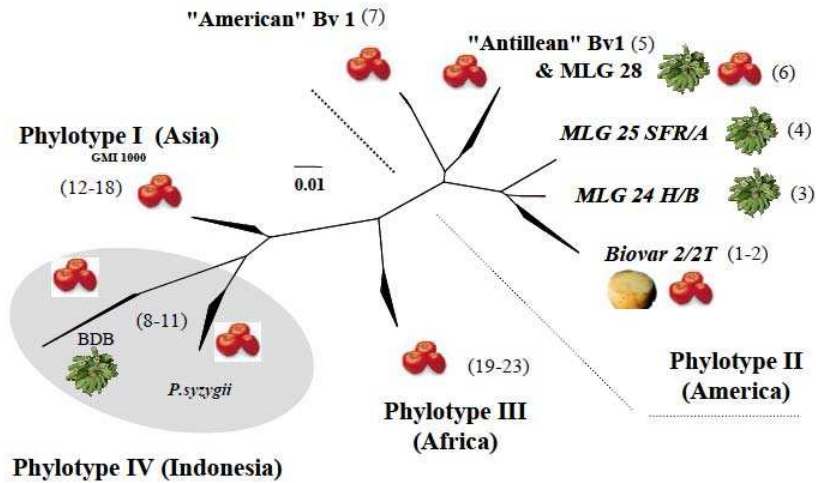
La classification de *R. solanacearum* en biovars définie par Hayward (1964) est basée sur la capacité des souches à utiliser trois disaccharides (cellobiose, lactose, maltose) et trois hexoses alcools (mannitol, dulcitol, sorbitol) (**Tableau 8**). Les souches étaient ainsi subdivisées en 4 « biotypes ». Depuis, deux autres biovars ont été mis en évidence : le biovar 5 (He et al. 1983) et le biovar N2 ou 2T, isolé de pomme de terre, possède une activité métabolique différente du biovar 2 de par sa capacité à hydrolyser un quatrième disaccharide, le D-tréhalose (Hayward et al. 1992). Les deux systèmes de classification (race et biovar) ne se recoupent pas à l'exception des souches des biovars 2 et 5 qui sont regroupées respectivement dans les races 3 et 5 (Hayward 1991; He et al. 1983) (**Figure 6**).

### DESCRIPTION DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE PAR DES APPROCHES MOLÉCULAIRES

L'utilisation de techniques de biologie moléculaire ont permis de révéler d'autres niveaux de diversité souvent complémentaires aux deux premiers systèmes de classification (race et biovar). Au sein même du complexe d'espèce de *R. solanacearum*, ces approches ont permis d'établir des corrélations avec l'origine géographique des souches. La classification basée sur des caractéristiques génétiques repose dans un premier temps sur l'analyse RFLP de l'ADNr 16S, puis, sur le séquençage de l'ADNr 16S, de la région ITS entre les ADNr 16S et 23S, des gènes *hrpB* et *egl*.

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction, RFLP (restriction fragment length polymorphism) a permis, à partir de 164 souches, de mettre en évidence 46 groupes RFLP appelés MGL (multi locus genotype) inscrit dans deux grandes « divisions » génétiquement et géographiquement distinctes : la division 1 nommée « *Asiaticum* » regroupant les souches des biovars 3, 4 et 5 originaires d'Asie et d'Australie et la division 2 nommée « *Americanum* » regroupant les souches des biovars 1, 2 et 2T originaires du Nouveau Monde, des Amériques (Cook et al. 1989, 1991; Cook and Sequeira 1994).

Des études plus récentes basées sur l'analyse du polymorphisme de séquence du fragment 16S de l'ADN ribosomique (ADNr) (Li et al. 1993a; Li et al. 1993b; Taghavi et al. 1996), de l'ITS (internal transcribed spacer) 16S-23S correspondant à la région comprise entre les fragments 16S et 23S de l'ADNr, et des gènes codant pour la polygalacturonase (*pgl*) et l'endoglucanase

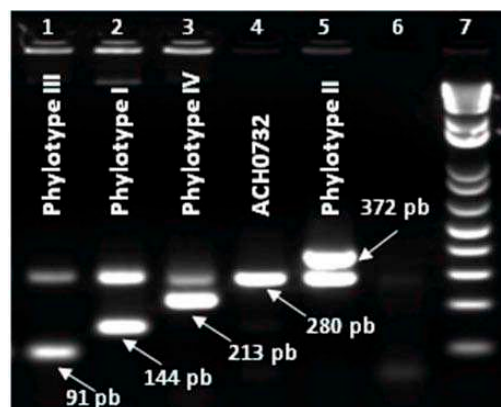


**Figure 7.** Arbre phylogénétique basée sur l'analyse de la séquence partielle du gène codant l'endoglucanase (egl).

Il montre les distances phylogénétiques entre les phylotypes et la corrélation avec les sequevars indiqués entre parenthèses (Prior et Fegan 2005). Les souches de *R. solanacearum* pathogènes de la tomate et globalement des solanacées sont symbolisées par une tomate. Les souches à spectre d'hôtes réduits sont symbolisées par une banane ou une pomme de terre.

**Tableau 9.** Schéma de classification hiérarchique pour *R. solanacearum* (Fegan & Prior 2005)

Niveau taxonomique	Equivalent taxonomique	Nomenclature	Méthode d'identification
Espèce	Espèces	Complexe d'espèces <i>R. solanacearum</i>	Amorce PCR (759/760)
Phylotype	Sous-espèces	Phylotypes I, II, III et IV	PCR multiplex basée sur la région ITS
Sequevar	Groupes infraspécifiques	Sequevars 1-52	Séquençage du gène de l'endoglucanase
Clone	Lignées clonales		Méthodes d'empreintes génomiques (rep-PCR, RAPD, AFLP, PFGE, etc.)



**Figure 8.** Exemples de gel d'électrophorèse de PCR multiplexe (Fegan & Prior 2005).

Puit n°1 : souche représentative du phylotype III ; Puit n°2 : souche représentative du phylotype I ; Puit n°3 : souche représentative du phylotype IV ; Puit n°4 : ACH0732 ; Puit n°5 : souche représentative du phylotype II ; Puit n°6 : contrôle négatif (espèce autre que *R. solanacearum*) ; Puit n°7 : marqueur de poids moléculaire 1kb.

(*egl*) (Fegan et al. 1998) confirme l'existence de ces deux subdivisions et révèle l'existence, au sein de la division II, d'une nouvelle subdivision « subdivision 2b » qui deviendra par la suite « *Indonesia* », incluant uniquement les souches originaires d'Indonésie. Dès lors, *R. solanacearum* est considéré comme un complexe d'espèce puisque la subdivision « *Indonesia* » inclue deux autres espèces proches de *R. solanacearum* : *R. syzygii* et BDB. Les travaux sur l'homologie ADN-ADN des souches de *R. solanacearum* justifient l'utilisation du terme complexe d'espèce attribuée à *R. solanacearum* puisque les relations entre les isolats de cette espèce étaient souvent inférieures au seuil de 70% d'homologie attendu pour différencier les espèces bactériennes (Fegan and Prior 2005).

L'existence d'une dernière subdivision dite « *Africanum* » constituée de souche de biovars 1 et 2-T originaire du Sud de l'Afrique est démontrée par plusieurs méthodes d'analyses, par PCR-RFLP des gènes *hrp* (*hypersensitive response and pathogenic*), par l'analyse de polymorphisme de taille des fragments amplifiés, AFLP (amplified fragment length polymorphism), et par la comparaison des séquences du fragment 16S de l'ARNr (Poussier et al. 2000 thèse) (Poussier et al. 2000b; Poussier et al. 1999). Ce dernier groupe a été confirmé par des analyses phylogénétiques du gène codant pour l'endoglucanase (*eglA*) et du gène *hrpB*, régulateur des gènes *hrp* (Poussier et al. 2000a).

Plus récemment, toujours dans ce but d'avoir une meilleure appréciation de la diversité génétique de *R. solanacearum*, Fegan et Prior (2005) ont proposé une nouvelle classification basée sur le polymorphisme de séquences de la région ITS, des gènes *egl* et *mutS*. Dans ce nouveau schéma de classification hiérarchique, les souches sont classées en quatre groupes phylogénétiques différents appelés phylotypes qui sont majoritairement corrélés à l'origine géographique des souches (**Figure 7**). Chaque phylotype est lui-même composé de sequevars. Les sequevars sont des groupes de souches qui présentent un haut niveau de conservation de séquences puisqu'ayant moins de 1% de polymorphisme au niveau de la séquence étudiée.

La caractérisation des souches de *R. solanacearum* se déroule en plusieurs étapes (**Tableau 9** et **Figure 8**). Tout d'abord, l'amorce 759/760 développée par Opina et al. (1997) permet de valider l'espèce, autrement dit, de vérifier que la souche concernée est bien du *R. solanacearum*. Toutes les souches de *R. solanacearum* mais également les souches d'espèces proches BDB et *R. syzygii* génèrent le fragment de 280 pb spécifique au complexe d'espèce de *R. solanacearum*. Puis, le phylotype est déterminé via PCR multiplexe au cours

de laquelle des amorces spécifiques à chaque phylotype, provenant de l'ITS, amplifient les séquences complémentaire de l'ADN des souches. Toutes les souches du complexe d'espèce de *R. solanacearum* testées avec la PCR multiplexe produisent un amplicon spécifique au phylotype à l'exception de la souche ACH0732 (et apparentées). La position phylogénétique de ACH0732 varie en fonction de la région génomique séquencée. Pour finir la caractérisation, le sequevar est déterminé par analyse phylogénétique du polymorphisme des séquences du gène *egl* (et du gène *mutS*).

### 3.2.3. Éléments d'épidémiologie

Son cycle infectieux passe généralement par un stade de survie saprophyte, sous forme rugueuse, dans le sol ou dans l'eau qui peut même durer plusieurs années. Cependant sa capacité de survie dans un sol nu est très discutée. Le temps de survie dépend du type de sol, du biovar et des conditions environnementales (Nicole 1995). La bactérie peut survivre 24 semaines au plus dans un mélange sol-sable, (Granada and Sequeira 1983) et 5 semaines au plus dans un sol contenant des plantes non hôtes tels que le maïs ou le haricot. *R. solanacearum* ne pourrait survivre dans un sol pendant une période prolongée dû au fait qu'il n'est pas un compétiteur suffisamment efficace par rapport à la microflore du sol (Sequeira et al. 1993). La bactérie ne survivrait pas dans un sol par elle-même mais en infectant continuellement les racines de plantes hôtes ou en colonisant la rhizosphère de plantes non-hôtes (Granada and Sequeira 1983).

La nature du sol peut influencer sur la conservation de *R. solanacearum* dans le sol. En fonction des caractéristiques physico-chimiques des sols, certains sont propices au flétrissement bactérien (conducteurs) tandis que d'autres sont supprimeurs (Hayward 1991). Les relations entre le type de sol et l'incidence du flétrissement bactérien sont contrastés. Par exemple dans le cas du flétrissement bactérien de l'arachide, Abdullah et al (1983) a montré que l'infection se produisait dans un sol sableux mais qu'elle était plus élevée dans un sol argileux ; de même Kelman en 1953 avait observé en Indonésie que la maladie était plus sévère dans un sol argileux, cependant en Chine, He et al (1990) a publié que la maladie était plus répandue dans un sol sableux et ne l'était pas dans un sol argileux (Hayward 1991). De façon générale, les oxisols (sols ferralitiques à argile de type halloysite ou kaolinite) sont propices au développement de la maladie alors que les vertisols (à montmorillonites) ont un effet

suppresseur (Bereau and Messiaen 1975; Prior et al. 1993). L'action suppressive des vertisols pourrait être due à l'argile présente dans ces sols. Sous l'action de la dessiccation, la fermeture du réseau poreux des argiles (tactoides) entraînerait progressivement l'incapacité à se multiplier, puis un effet d'écrasement létal pour les bactéries (Schmit & Robert 1984 ; Schmit et al. 1990). L'effet naturel suppressive des vertisols peut être altéré par un excès d'eau et la gravité du flétrissement bactérien peut être réduite par des amendements organiques (Prior et al. 1993).

*R. solanacearum* est capable de survivre dans l'eau qui est un bon milieu de conservation de la bactérie. Sa durée de survie planctonique est variable en fonction de la qualité de l'eau et de la température selon la souche concernée (Poussier 2000). Une eau purifiée (eau osmosée ou eau des villes) favorise la survie de la bactérie plusieurs mois contre 2 semaines au plus dans une eau d'irrigation (Poussier 2000). *R. solanacearum* survie également dans des eaux riches en matières organiques comme des eaux de surface (17 à 33 jours), ou un mélange eau/boue (6 à 24 jours) (Janse 1996; Janse et al. 1998).

Les plantes sont également propices à la conservation de *R. solanacearum* qui peut constituer des sources potentielles d'inoculum dans les débris organiques, les plantes flétries en décomposition car la bactérie est capable de dégrader les produits issus de la lignification. Tout matériel végétal (tubercule de pomme de terre, pieds de banane, rhizomes de gingembre ou d'héliconia, boutures, etc.) bien que ne présentant pas de symptôme de flétrissement bactérien mais porteurs d'infection latentes sont des réservoirs d'inoculum. Les adventices hôtes telles que la morelle noire et la morelle douce-amère mais aussi les plantes non-hôtes comme l'orge (*Hordeum vulgare*), le maïs (*Zea mays*) sont également des niches écologiques favorisant le développement de *R. solanacearum* (Álvarez et al. 2008b; Hayward 1991).

L'humidité du sol et la température sont des facteurs environnementaux qui influencent l'expression du flétrissement bactérien. Un sol humide et bien drainé favorise plus la survie de *R. solanacearum* qu'un sol sec ou inondé (Buddenhagen and Kelman 1964). La température affecte la survie mais également l'interaction hôte-pathogène (Hayward 1991; van Overbeek et al. 2004). À des températures inférieures à 0°C, la bactérie ne se maintient pas (Olsson 1976). Entre 0 et 10°C, la bactérie bien que présente dans le sol ne provoque pas de maladie (Kelman 1954). La température optimale se situe entre 30 et 35°C, exception faite, pour les souches « froides » de phylotype II (IIB sequevar 1, historiquement race 3 biovar 2), qui ont

**Tableau 10.** Modes de dissémination de *R. solanacearum* (Kelman 1994)

Origine de la contamination	Autres informations	Références
Matériel végétal planté	Tubercules de pomme de terre contaminés (infections latentes)	Hayward (1991)
	Rhizomes de gingembre	Lum (1973)
	Boutures de bananes depuis l'Amérique Centrale jusqu'au Philippines)	Rillo (1979), Buddenhagen (1986)
	Rhizomes d' <i>Heliconia</i> (d'Hawaï au Queensland en Australie)	Hyde et al. (1992)
Semences vraies	Arachide (Chine)	Zhang et al. (1993)
	Arachide (Indonésie)	Machmud et Middleton (1990)
	Semences de tomate (de l'Inde au Népal) Semences de tomate (autres lieux)	Shakya (1993) Devi et Manon (1980), Hayward (1991)
Boutures de tomate	Du Sud-Est des Etats-Unis vers les états du Nord et du Canada	Vaughan (1944), Layne et McKeen (1967), Gitaitis et al. (1992)
Plantules de fraisier	Taïwan	Hsu (1991)
Transmission par insecte	A partir d'inflorescences de bananiers atteintes de la maladie de Moko vers des inflorescences saines	Buddenhagen et Elsasser (1962)
Transmission mécanique		
par pincement	Sur tomate (Géorgie et Floride, Etats-Unis)	McCarter et Jaworski (1969)
par élagage	Sur bananier (Amérique Centrale)	Sequeira (1958)
par l'équipement de récolte	Sur <i>Perilla crispa</i> (Taïwan)	Hsu (1991)
par blessure des racines lors des pratiques culturales	Général	Kelman (1953)
Blessures dues aux nématodes	Divers hôtes	Kelman (1953), Lucas et al. (1955), Pitcher (1963), Jonhson et Powell (1969), Napière (1980)
Transmission de racine à racine	Libération des bactéries dans le sol à partir de racines infestées et contamination des racines voisines	Kelman et Sequeira (1965)
Transmission aérienne par dispersion des populations épiphytes lors de pluies	Sur tabac (Japon)	Hara et Ono (1985), Ono (1983)

une température optimale avoisinant les 23°C (Buddenhagen and Kelman 1964). L'adaptation des souches de race 3 aux températures plus froides explique la présence de ces souches sous des latitudes élevées dans le monde et aux altitudes élevées sous les tropiques (Thurston 1963). A 43°C, *R. solanacearum* est incapable de survivre dans le sol (Seneviratne 1988).

Un aspect encore largement méconnu chez *R. solanacearum* est sa capacité à survivre dans un état viable mais non cultivable, VBNC (viable but nonculturable cells) sous certaines conditions de stress comme une exposition au cuivre (CuSO<sub>4</sub>) dans une solution saline, dans un sol autoclavé (Grey and Steck 2001), incubation à faible température dans le sol ou dans l'eau (Caruso et al. 2005; van Elsas et al. 2000; van Overbeek et al. 2004) (van Elsas et al. 2001). Le VBNC est un état dans lequel la bactérie est viable mais incapable de se diviser suffisamment pour former des colonies sur un milieu solide non sélectif (McDougald et al. 1998). Il pourrait être considéré comme un mécanisme de dormance et de survie à long terme pour certaines bactéries ne formant pas de spore. La nature des conditions induisant l'état VBNC diffère et dépend du type de bactérie : stress osmotique, changement de température, présence de métaux lourds, etc. Dans certains cas, la bactérie peut « ressusciter » autrement dit quitter l'état VBNC pour recommencer les divisions cellulaires et ainsi redevenir cultivable (Poussier 2000). *R. solanacearum* dans l'état VBNC est capable d'infecter et de se multiplier dans les tissus. De plus, *R. solanacearum* sous la forme VBNC a été détecté dans des boutures asymptomatiques de géranium. Ainsi, la forme VBNC pourrait expliquer la persistance de l'infection dans la nature. La présence de cellules VBNC de *R. solanacearum* dans les eaux naturelles pose de nouveaux problèmes pour la détection (van Elsas et al. 2001) et la persistance de l'infection de *R. solanacearum* (Álvarez et al. 2008a; Grey and Steck 2001).

Les sources de dissémination sont diverses et variées comme en témoigne le **Tableau 10** (Kelman et al. 1994). Cependant, le principal responsable de la propagation de la maladie sur un plan local mais aussi international est l'Homme. Les eaux de ruissellement et d'irrigation lessivant les sols contaminés constituent un autre mode de dissémination de *R. solanacearum* (Frag et al. 1999; Hayward 1991; Janse et al. 1998; Poussier et al. 1999).

La dispersion de la maladie peut s'effectuer de racine à racine (Kelman and Sequeira 1965). Une plante flétrie génère, dans le substrat, une quantité importante de bactéries qui peuvent contaminer les plants proches. Cet inoculum ainsi formé en se mélangeant à l'eau d'irrigation



augmente le risque de contamination d'un plant à l'autre (Cariglia 2007). Autrement, la dissémination peut se produire par utilisation de matériel végétal abritant d'importantes populations de *R. solanacearum* sans présenter de symptômes (Hayward 1991). Les plantes participent ainsi au maintien de niveaux élevés d'inoculum même dans des régions où la maladie semble absente. Le transport par l'Homme de matériel végétal porteur d'infection latente (tubercule de pomme de terre, pieds de banane, rhizomes de gingembre, boutures, etc.) est la principale cause de dissémination de la bactérie d'un pays à l'autre, d'un continent à un autre (Granada and Sequeira 1983). Les conséquences de l'infection latente sont d'autant plus graves que les plants porteurs sains autrement dit qui n'expriment pas de symptômes, correspondent souvent à des cultures commerciales. L'importation de tubercules de pomme de terre et de boutures de géranium ou autres plantes ornementales porteurs d'infection latente a joué un rôle important dans la propagation de la maladie et est à l'origine des introductions de souches de race 3 en Europe (Janse 1996; Janse et al. 2004) et aux Etats-Unis (Kim et al. 2003; Norman et al. 2009; Williamson et al. 2002).

Pour finir, l'Homme intervient de nouveau dans la propagation de la maladie lors des interventions culturales telles que la taille et la récolte (Hsu et al. 1993).

L'infection de *R. solanacearum*, bactérie tellurique, se fait naturellement par le système racinaire. Les exsudats racinaires des plantes hôtes diffusant au niveau des bactéries et agissant comme stimuli provoqueraient un chimiotactisme des bactéries pathogènes vers les racines (Digat & Caffier, 1996). (Yao and Allen 2006) a montré que la souche *R. solanacearum* K60 est attiré activement par les exsudats racinaires de la tomate. La bactérie mobile (Tans-Kersten et al. 2001) progresse jusqu'à la surface des extrémités racinaires puis pénètre l'hôte par les racines soit en profitant de blessures provoquées par des nématodes tels que *Meloidogyne* spp. et insectes ravageurs, ou bien provoquées par l'Homme via les outils agricoles ou le repiquage des plantes, soit en profitant d'ouvertures naturelles comme l'émergence de racines secondaires, les lenticelles ou la zone d'élongation au niveau de l'apex des racines (Vasse et al. 1995). *R. solanacearum* colonise d'abord les espaces intercellulaires du cortex interne racinaire puis envahi les vaisseaux du xylème. Les cellules infectées des tissus adjacents aux vaisseaux du xylème émettraient des expansions vésiculeuses appelées thylles à l'intérieur desquels les bactéries sont présentes. Ces thylles s'invagineraient dans le xylème puis se rompraient libérant ainsi les bactéries dans le xylème

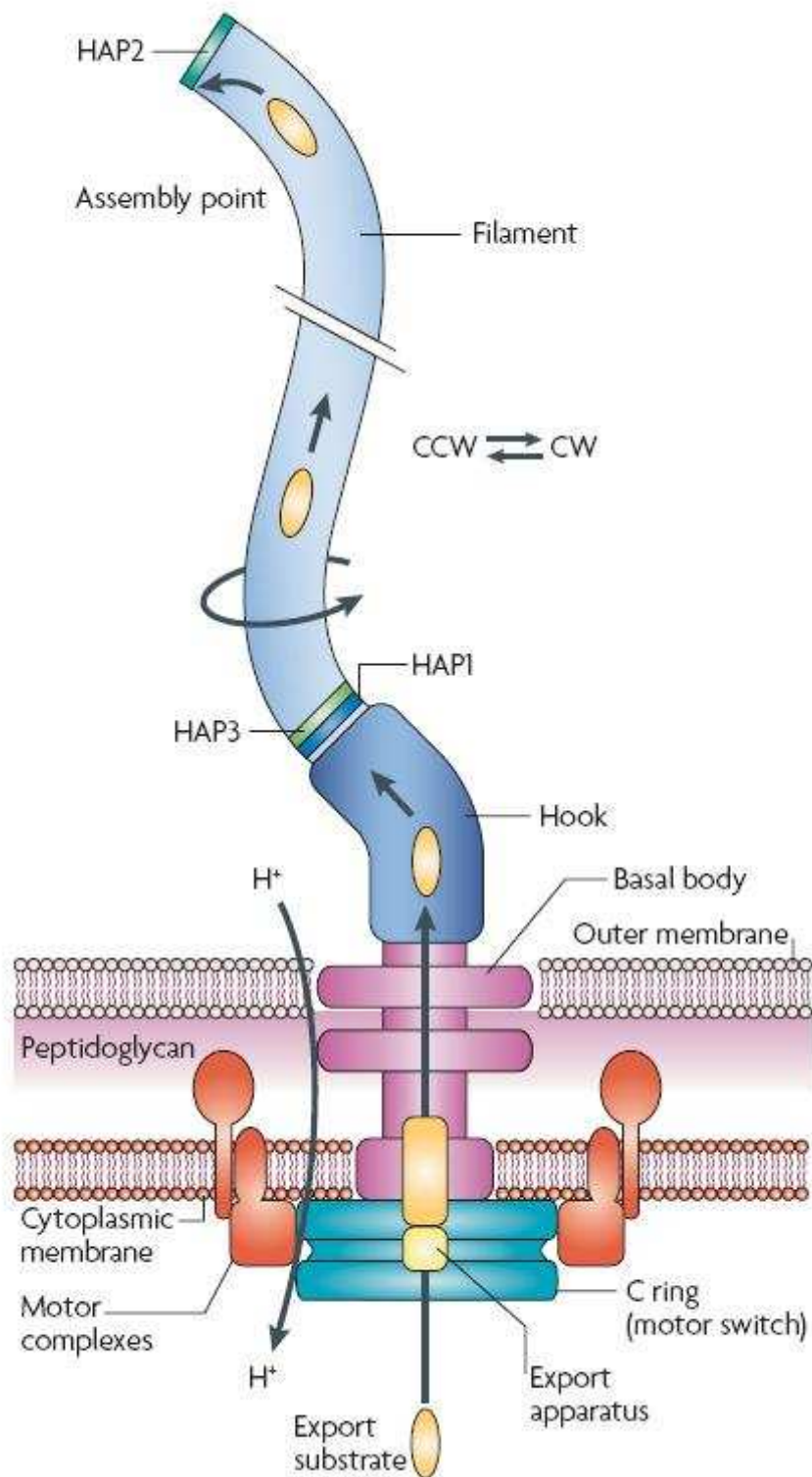
(Wallis and Truter 1978). Après pénétration dans les vaisseaux du xylème racinaire, les bactéries progressent jusqu'au niveau de la tige.

### 3.3. Les déterminants du pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène est défini par l'ensemble des gènes et leur régulation nécessaires à la colonisation, la survie, la multiplication, et les dégâts occasionnés par le pathogène dans l'hôte. Le pouvoir pathogène d'une souche est déterminé par sa virulence et son agressivité. La virulence, critère qualitatif, est la capacité d'induire des symptômes de la maladie chez un organisme qu'on appelle de ce fait hôte tandis que l'agressivité traduit l'intensité des symptômes induits par le pathogène.

#### 3.3.1. Taxie

De nombreuses bactéries utilisent un comportement complexe appelé taxie pour percevoir des substances chimiques (acides aminés, acides organiques, etc.) ou des conditions environnementales spécifiques et se déplacer vers ces substances ou conditions attractives (Adler 1966). La taxie bactérienne est impliquée dans les interactions avec leurs hôtes (de Weert et al. 2002; Dharmatilake and Bauer 1992; Yao and Allen 2006). Les mécanismes moléculaires impliqués dans taxie ont été étudiés chez *Escherichia coli* et ont montré que les récepteurs associées à la membrane cellulaire, appelés protéines du chimiotactisme accepteurs de méthyl, MCPs (methyl-accepting chemotaxis proteins) détectent les stimuli environnementaux et répondent par un changement de conformation. Ce changement de conformation entraîne l'autophosphorylation d'une histidine kinase cytoplasmique CheA, qui forme un complexe avec MCPs via une protéine dite de « couplage » appelée CheW. CheA transfère ensuite son groupe phosphate à un régulateur cytoplasmique, CheY. CheY phosphorylé altère la rotation du flagelle en interagissant avec le moteur flagellaire, ce qui a pour conséquence un déplacement vers des conditions favorables ou un déplacement loin des conditions défavorables. La mutation des gènes *CheA*, *CheY* ou *CheW* conduit à un phénotype « non-tactisme » chez *E. coli*. *R. solanacearum* dépend de la taxie pour localiser et coloniser les racines de plantes (Yao and Allen 2006, 2007). L'agressivité des mutants non-tactiques *cheA* et *cheW* de *R. solanacearum* est réduite sur plants de tomate après ajout de suspension



**Figure 9.** Modèle de flagelle bactérien.

Le flagelle bactérien est constitué de trois parties : le filament, le crochet et le corps basal. Les localisations et les rôles de nombreux de ces composants sont connus. CW, dans le sens des aiguilles d'une montre ; CCW dans le sens inverse des aiguilles d'une montre ; HAP : protéine associée au crochet.

bactérienne dans le sol alors qu'elle n'est pas affecté dans le cas d'une inoculation dans le pétiole. Yao et al. (2007) signale l'importance dans l'interaction *R. solanacearum* - tomate de l'aérotaxie, autrement dit le mouvement orienté déclenché par un gradient de tension d'air ou d'oxygène. Le génome de *R. solanacearum* encode deux protéines impliquées dans la transduction du signal d'aérotaxie, Aer1 et Aer2. Les plants de tomates inoculés soit avec le mutant *aer2* ou *aer1 / aer2* ont un léger retard dans le développement de la maladie. Les souches mutées au niveau des gènes impliquées dans la taxie se comportent comme des souches mutantes non mobiles (Yao and Allen 2007).

### 3.3.2. La mobilité

Chez *R. solanacearum*, la mobilité bactérienne conférée par l'action des flagelles joue un rôle important dans les étapes précoces de la virulence de la bactérie, l'entrée du pathogène dans l'hôte et la colonisation jusqu'au vaisseaux du xylème (Tans-Kersten et al. 2001). Le flagelle est constitué de 3 parties : le corps basal qui ancre la structure à la membrane bactérienne et contient le moteur flagellaire ; le filament d'environ 20 nm de diamètre agit comme une hélice et le crochet qui connecte le filament au corps basal (Jarrell and McBride 2008) (**Figure 9**). Les mutations des gènes *fliC* codant pour la flagelline, sous-unité du filament flagellaire, *fliM* codant une protéine du moteur flagellaire, et *flhDC* codant un régulateur majeur de la biosynthèse du flagelle et de la mobilité bactérienne, entraîne une perte de la mobilité et réduit significativement la capacité à causer le flétrissement bactérien chez les plantes (Tans-Kersten et al. 2004; Tans-Kersten et al. 2001). Cependant, *R. solanacearum* est essentiellement non mobile une fois dans les vaisseaux du xylème (Tans-Kersten et al. 2001). Le fait d'injecter un mutant *fliC* directement dans les pétioles de l'hôte restaure la virulence telle qu'observé chez la souche de *R. solanacearum* non mutée, suggérant ainsi que la mobilité contribue à la virulence dans les étapes précoces du développement de la maladie.

Un grand nombre de bactéries gram négatif incluant les bactéries phytopathogènes produisent un pilus de type IV (Mattick 2002; Roine et al. 2007). Le pilus est une structure filamenteuse d'environ 6 nm de diamètre constituée d'empilement de monomères de la protéine piline (Jarrell and McBride 2008; Mattick 2002). En fonction de l'organisme, le pilus de type IV peut jouer un rôle dans l'adhésion, l'agrégation, la formation de biofilm, le transfert horizontal de gène, le développement multicellulaire, la pathogénicité et la mobilité saccadée autrement dit the twitching motility (en anglais). Cette mobilité saccadée est une forme de

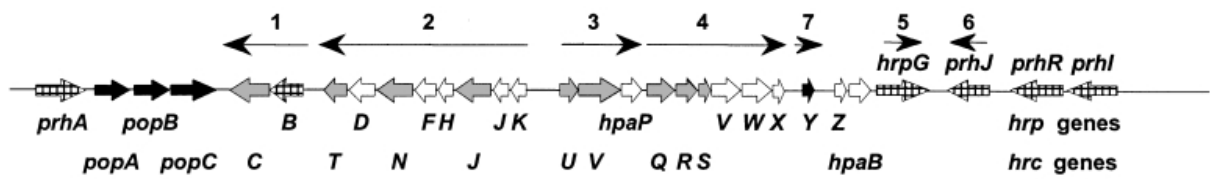
translocation des bactéries indépendante du flagelle sur une surface solide. Cette mobilité existe chez *R. solanacearum* en culture (Liu et al. 2001). Elle peut être éliminée après inactivation de gènes constitutifs du pilus de type IV, *pilA* (Kang et al. 2002), *pilQ* et *pilT* (Liu et al. 2001). Le gène *pilA* code pour le peptide signal de la piline. Le gène *pilQ* code pour une sécrétine localisée dans la membrane externe, formant un pore oligomérique qui permet le passage de sous-unités de piline. Le gène *pilT* code pour une protéine appartenant à la famille des ATPases requise pour la rétractation du pilus de type IV qui produit le mouvement cellulaire (Liu et al. 2001). Les mutants *pilA*, *pilQ* et *pilT* causent des symptômes de flétrissement bactérien moins sévères sur les plants de tomate (Kang et al. 2002; Liu et al. 2001). Le mutant *pilA* en plus de réduire l'agressivité, réduit également l'adhérence, l'autoagrégation, la formation de biofilm et inhibe le transfert horizontal de gènes.

### 3.3.3. Les lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants majeurs de la membrane externe des bactéries de type gram négatif. Les LPS jouent un rôle dans la virulence et particulièrement la reconnaissance du pathogène par la plante (Hendrick and Sequeira 1984) mais aussi dans l'attachement des bactéries avirulentes au niveau des parois des espaces intercellulaires (Duvick and Sequeira 1984). Les LPS agiraient comme une barrière protectrice captant les polypeptides antimicrobiens et seraient donc impliqués dans la résistance aux composés antimicrobiens produits par la plante (Titarenko et al. 1997).

### 3.3.4. Les enzymes extracellulaires

*R. solanacearum* produit de nombreuses enzymes extracellulaires, également appelées exoenzymes, lui permettant de dégrader la paroi pectocellulosique de la plante infectée. La bactérie sécrète des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques afin d'envahir les tissus de la plante puisque la paroi végétale est une barrière physique empêchant ainsi la pénétration de l'agent pathogène dans les tissus corticaux et l'entrée dans les vaisseaux du xylème. De plus, la paroi végétale est une source importante de carbone et la dégradation de cette paroi par les enzymes extracellulaires de la bactérie apporte des nutriments à l'agent pathogène. *R. solanacearum* produit six enzymes extracellulaires qui dégradent la paroi végétale : deux



**Figure 10.** Organisation génétique de *R. solanacearum* du cluster de gène *hrp* (Van Gijsegem et al. 2002).

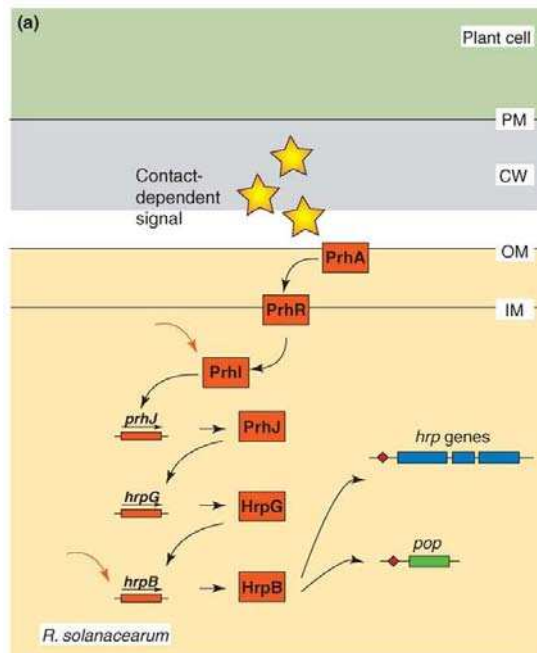
Les flèches fines indiquent les sept unités transcriptionnelles. Les flèches pleines indiquent les différents gènes, en gris les gènes conservés *hrc*, en noir les protéines sécrétées et en hachuré les gènes régulateurs.

endoglucanases EglA (Roberts et al. 1988) et ChbA (Liu et al. 2005), une endogalacturonase PglA (ou PehA) (Schell et al. 1988), deux exopolygacturonases PglB (PehB) et PglC (PehC) (Allen et al. 1997) et une pectine méthyle estérase. *R. solanacearum* n'est pas connu pour produire de pectate lyases (Pel). Les principales enzymes extracellulaires intervenant dans le pouvoir pathogène de *R. solanacearum* sont une endopolygalacturonase PglA (ou PehA) (Schell et al. 1988), deux exopolygacturonases PglB (PehB) et PglC (PehC) (Allen et al. 1991) et deux endoglucanases EglA (Roberts et al. 1988) et ChbA (Liu et al. 2005). L'endoglucanase (EglA) est une  $\beta$ -1,4-glucanase qui hydrolyse la paroi végétale au niveau des molécules de cellulose. Cette enzyme est fortement excrétée au niveau des souches virulentes de *R. solanacearum* (Schell 1987). Contrairement à d'autres bactéries telles qu'*Escherichia coli* où l'activité de l'endoglucanase est cellulaire, l'activité chez *R. solanacearum* est extracellulaire (Schell 1987).

### 3.3.5. Les systèmes de sécrétion

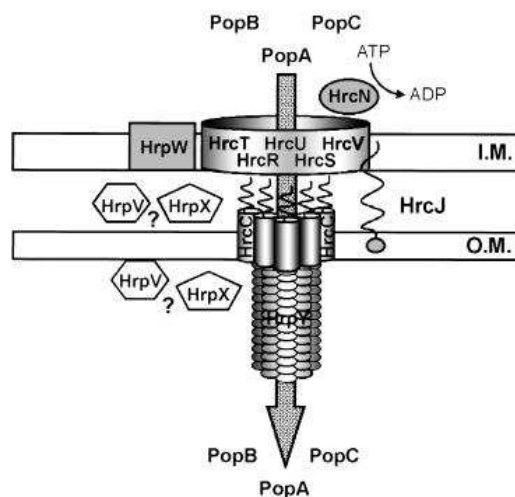
*R. solanacearum* exporte des centaines de protéines (enzymes, toxines, ou autres facteurs protéiques) à travers différents systèmes de sécrétion qui sont au nombre de huit chez *R. solanacearum* (Poueymiro and Genin 2009).

Le système de sécrétion de type II (SST2) participe au pouvoir pathogène de la bactérie (González et al. 2007). Une mutation du SST2 réduit considérablement la colonisation et la multiplication de la bactérie dans la plante (Kang et al. 1994). Le déterminant principal du pouvoir pathogène reste le système de sécrétion de type III (SST3). Il est très conservé au sein des nombreuses bactéries pathogènes d'animaux ou de végétaux (Cornelis and Van Gijsegem 2000; Galán and Collmer 1999; He et al. 2004). Chez les bactéries pathogènes de plantes, le SST3 est appelé système Hrp (Hypersensitive response and pathogenicity) parce qu'une mutation dans le SST3 provoque simultanément l'incapacité à induire des réactions d'hypersensibilité, HR (Hypersensitive Response) et la perte du pouvoir pathogène sur la tomate (Alfano et Collmer, 1997). Les gènes *hrp* jouent un rôle dans le développement de la réaction d'hypersensibilité chez les plantes hôtes résistantes et dans l'initiation des symptômes de maladie chez les plantes hôtes sensibles (Boucher et al. 1992). SST3 est composé d'une vingtaine de protéines codées par des gènes regroupés en cluster contigu de 23kb organisé en sept unités transcriptionnelles (Boucher et al. 2001; Brito et al. 1999; Schell 2000) (**Figure 10**). Chez *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp. et *Erwinia* sp., le cluster *hrp* est



**Figure 11.** Représentation schématique de la régulation des gènes *hrp* de *R. solanacearum* (Büttner and Bonas 2006).

La protéine de la membrane externe PrhA agit comme un récepteur du signal contact-dépendant de la paroi végétale et transmet ce signal à une cascade de régulation incluant la protéine membranaire PrhR et les activateurs transcriptionnels PrhI, PrhJ, HrpG et HrpB. La flèche rouge indique l'influence de stimuli externes supplémentaires sur l'expression des gènes *prhI* et *hrpB*. HrpB se lie à un élément conservé du promoteur des gènes *hrp*, la *hrp1*box (losange rouge) afin d'activer l'expression du régulon comprenant les gènes de structure du SST3 et les gènes codants pour les effecteurs. Abréviations : PM, membrane plasmique ; CW, paroi ; OM, membrane externe, IM, membrane interne.



**Figure 12.** Représentation schématique de l'appareil de sécrétion de type III de *R. solanacearum* (Van Gijsegem et al. 2002).

La partie basale constituée de protéines conservées Hrc est ancrée dans la double membrane de la cellule bactérienne. Elle se prolonge dans le milieu extracellulaire jusque dans la paroi végétale par le pilus Hrp, constitué principalement de la protéine HrpY.



chromosomal (Alfano et Collmer, 1997) alors que chez *R. solanacearum*, le cluster est localisé sur le mégaplasmide (Genin and Boucher 2004; Salanoubat et al. 2002). Chez *R. solanacearum*, les composants du SST3 Hrp sont codés par des gènes appartenant au cluster *hrp/hrc*, dont l'expression est contrôlée par un activateur transcriptionnel de type AraC, HrpB, qui est aussi codé par le cluster de gènes *hrp* (Genin et al. 1992; Van Gijsegem et al. 1995). Les mutations dans les gènes *hrc* (*hrp gene conserved*) codant pour les protéines de structure du SST3, induisent une incapacité du pathogène à proliférer dans les plantes hôtes (Boucher et al. 1987). Lorsque la bactérie entre en contact avec une cellule hôte, un composant de la paroi végétal induit un signal perçu par le récepteur PrhA qui déclenche alors une cascade de régulation qui se termine par l'expression des gènes de structure du SST3 et des gènes codants pour les effecteurs (**Figure 11**) (Aldon et al. 2000; Brito et al. 2002; Büttner and Bonas 2006; Cunnac et al. 2004a; Occhialini et al. 2005; Schell 2000; Valls et al. 2006). Le complexe SST3 isolé à partir de plusieurs bactéries pathogènes d'animaux telles que *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* et l'entérobactérie *E. coli*, est formé d'une structure cylindrique, similaire au corps basal du flagelle, qui est composée d'anneaux interne et externe, d'une tige interne qui traverse les deux anneaux et d'une seringue (Galán and Wolf-Watz 2006) (**Figure 12**). Le SST3, véritable seringue moléculaire, permet d'injecter dans la cellule cible de l'hôte des protéines, dites effecteurs de type III.

### 3.3.6. Les effecteurs de type III

Chaque agent pathogène possède un jeu spécifique de protéines effectrices impliquées probablement dans certains traits du pouvoir pathogène, en particulier le spectre d'hôte. Ces effecteurs ont des natures, des cibles et des fonctions variées. Chez *R. solanacearum*, 94 effecteurs ont été recensés dont 74 pour la souche GMI1000. Parmi les 74 effecteurs de type III de GMI1000, 34 sont particulièrement conservés car ils présentent des homologies de séquences de protéines avec d'autres bactéries pathogènes de plantes et d'animaux (Mukaihara et al. 2004; Occhialini et al. 2005; Poueymiro and Genin 2009). La sécrétion dans le milieu extracellulaire ou la translocation des effecteurs dans la cellule végétale a été démontrée pour 28 d'entre eux (Poueymiro and Genin 2009). Par ailleurs, la diversité des effecteurs de type III est également visible au plan de la localisation des gènes au sein du génome. Les gènes codant pour les effecteurs de type III régulés par le gène *hrpB* peuvent être localisés sur le mégaplasmide, en exemple, l'opéron contenant les gènes *popA*, *popB* et *popC*

(Guéneron et al. 2000) où sur le chromosome pour les gènes *popP2* et *popP3* (Deslandes et al. 2003; Lavie et al. 2004; Lavie et al. 2002).

Sept gènes codant pour des protéines effectrices de type III ayant des homologies de séquences avec les domaines LRR (Leucine-rich repeats) des plantes appartiennent à la famille des protéines GALA, nommé ainsi en raison de la présence de répétitions de 24 acides aminés de résidus conservés formant le motifs GAXALA dans leur LRR (Cunnac et al. 2004b). En interagissant avec la protéine SKP1-like, qui fait partie du complexe d'ubiquitine ligase de type SCF, certaines protéines GALA chez *R. solanacearum* sont capables d'interférer dans le processus d'ubiquitination (Angot et al. 2006). L'ubiquitination joue un rôle dans le turn-over des protéines puisqu'il consiste en l'ajout d'ubiquitine sur des protéines qui est un signal de dégradation via le protéosome commune aux cellules eucaryotes. Ainsi, les GALA interagiraient dans l'ubiquitination de protéines cibles qui seraient alors dégradées et permettraient le développement du flétrissement bactérien. A l'heure actuelle, on ne connaît pas les cibles de ce mécanisme. Seule la mutation cumulée des sept gènes *gala* affecte fortement la virulence de la souche GMI1000 sur *Arabidopsis* et dans une moindre mesure sur la tomate (Angot et al. 2006). La contribution individuelle d'un effecteur de type III donné peut varier en fonction de l'hôte. En effet, le gène *gala7* est une effecteur hôte-spécifique, requis pour la virulence de la souche GMI1000 sur *Medicago truncatula* mais pas sur d'autres plantes (Angot et al. 2006; Poueymiro and Genin 2009).

Les protéines PopB et PopC seraient des antagonistes des protéines végétales du fait des similarités de structure qu'elles ont avec des protéines végétales, notamment les protéines de résistance (protéines R) de la plante hôte, entraînant la modification de la cascade de transduction du signal ou de l'interaction des protéines R avec les effecteurs de *R. solanacearum* (Guéneron et al. 2000). La protéine PopB ciblerait le noyau de la cellule végétale puisque le gène porte une séquence fonctionnelle de localisation nucléaire tandis que la protéine PopC interviendrait dans les interactions protéines-protéines via son domaine LRR (Leucine Rich Repeat).

A ce jour, trois effecteurs de type III reconnus comme facteur d'avirulence ont été caractérisés, le produit du gène *avrA* qui est responsable de l'élicitation de la HR chez le tabac (Carney and Denny 1990; Robertson et al. 2004), et les produits des gènes *popP1* et *popP2*

dont la reconnaissance entraîne la résistance à la souche GMI1000 chez le Pétunia et Arabidopsis, respectivement.

*avrA* est un gène d'avirulence chez *R. solanacearum*, mais la mutation de ce gène n'induit pas pour autant le développement de la maladie (Carney and Denny 1990; Robertson et al. 2004). Seule la double inactivation des gènes *avrA* et *popP1* provoque le flétrissement des plants de tabac par la souche GMI1000 (Poueymiro et al. 2009). La séquence avec les 58 premiers acides aminés en position N-terminal de la protéine AvrA suffiraient pour son injection dans la cellule végétale. De plus, une région de 18 acides aminés dans laquelle l'insertion de nombre variables en tandem, VNTR (variable numbers of tandem repeats), est présente, est spécifiquement impliquée dans l'élicitation de la HR chez *Nicotiana benthamiana*. Le gène *avrA* apparaît être la cible de nombreuses insertions VNTR ou d'élément mobile qui permette probablement à *R. solanacearum* pour contourner la reconnaissance et les réponses de défense des plants de tabac (Poueymiro et al. 2009). De plus, le gène *avrA* jouerait un rôle dans les étapes précoces de l'infection racinaire de *Medicago truncatula* (Turner et al. 2009).

Les gènes *popP1*, *popP2* et *popP3* (*Pseudomonas outer protein*) codant pour des cystéases qui ont des cibles différentes : la protéine PopP1 resterait dans le cytoplasme après translocation dans la cellule végétale (Lavie et al. 2002), la protéine PopP2 ciblerait le noyau de la cellule puisqu'elle possède une fonction de la localisation nucléaire (Deslandes et al. 2003), et la protéine PopP3 seraient associée à la membrane de la cellule hôte puisqu'elle possède un site de myristilation (Lavie et al. 2002). De plus, ces trois effecteurs sont phylotypes spécifiques puisque présentes chez les souches des phylotypes I et III et absentes du phylotype II (Lavie et al. 2004). PopP1 et PopP2 sont des facteurs d'avirulence de la souche GMI1000 sur pétunia St40 et sur l'écotype Nd-1 d'Arabidopsis, respectivement. PopP1 a la particularité d'avoir une expression constitutive et donc de ne pas être co-régulé avec la transcription des gènes *hrp* (Lavie et al. 2002). PopP2 interagit avec le gène de résistance *RRS1* d'Arabidopsis.

Les harpines, protéines sécrétées par le SST3 de bactéries phytopathogènes, telles que HrpN d'*E. amylovora* (Wei et al. 1992), HrpZ de *P. syringae* (He et al. 1993), PopA (Arlat et al. 1994) et PopW (Li et al. 2010) de *R. solanacearum* ne présentent pas d'homologies dans leur séquences primaires. Cependant elles possèdent plusieurs caractéristiques communes : ce sont des protéines riches en glycine qui sont capables d'induire une HR après infiltration dans une

feuille de tabac et qui gardent leurs activités après un traitement à 100°C (Boucher et al. 2001; Li et al. 2010). Les harpines PopA et PopW dont la synthèse est régulée par *hrpB*, ne semblent pas être des facteurs majeurs de virulence puisque les mutants *popA* et *popW* ne sont pas altérés dans leur pouvoir pathogène respectivement sur pétunia et sur tomate (Arlat et al. 1994; Li et al. 2010). Ces protéines se distinguent des autres protéines sécrétées par le SST3 car leurs rôles dans le pouvoir pathogène ne sont pas clairement établis.

### 3.4. Stratégies de lutte

Comme pour toutes les maladies causées par des agents phytopathogènes, la compréhension de l'interaction avec l'hôte a permis de développer différents principes de stratégies de contrôle des maladies de plantes (Plant Disease Development and Control. National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1968) :

- Prévention – sélectionner une période de l'année ou un site où il n'y a pas d'inoculum ou encore lorsque l'environnement n'est pas favorable à l'infection ;
- Exclusion – empêcher l'introduction de l'inoculum ;
- Eradication – éliminer, détruire ou inactiver les inocula ;
- Protection – prévenir l'infection au moyen de barrières (prophylaxie, de produits chimiques toxiques) ;
- La résistance de ces plantes- cultivars résistants ou tolérants ;
- Thérapie – cure de plantes qui sont déjà infectés. Dans le cas du flétrissement bactérien, la thérapie n'est pas envisageable car les symptômes de flétrissement sont irréversibles.

La lutte prophylactique s'appuie sur un ensemble de mesures préventives, additives, à effet partiels, qui limitent la dissémination des bactéries vers des sites non infectés. Il ne s'agit pas d'éradication mais bien de la réduction du potentiel d'inoculum et des capacités d'infection. Par exemple, il est recommandé d'utiliser du matériel végétal sain (tubercules de pomme de terre, semences, boutures non contaminées) sur un sol ou un substrat sain avec un équipement désinfecté (machines, outils, bottes, etc). L'eau d'irrigation ainsi que les fertilisants doivent aussi être contrôlés. Sur une parcelle déjà infectée, une des mesures consiste à l'élimination (arrachage et brûlage) des plantes (plantes cultivées et adventices) contaminées autrement dit

les sensibles mais aussi les porteurs sains qui sont des réservoirs d'inoculum naturels permettant aux bactéries de survivre et de se multiplier.

Les rotations culturales avec des cultures non hôtes tels que, par exemple, le maïs (*Zea mays*), le riz (*Oryza sativa*), le soja (*Glycine max*), le gombo (*Abelmoschus esculentum*), le haricot (*Vigna unguiculata*) à la suite de culture d'espèces hôtes est une mesure efficace pour réduire les populations bactériennes présentes dans un sol et donc de réduire l'incidence de la maladie. Suivant la souche de *R. solanacearum* présente, les rotations culturales sont plus ou moins efficaces et nécessitent une période de culture de plantes non hôtes qui peut durer plusieurs années (Machmud 1993; Melton and Powell 1991; Michel et al. 1997; Saddler et al. 2005).

Le choix de la plante non hôte est important dans le cas de rotation culturale mais aussi d'association culturale puisque certaines espèces de plantes notamment les alliées possèdent des propriétés d'assainissement, autrement dit ces espèces non hôtes sont capables de provoquer une diminution de la population bactérienne de *R. solanacearum* et donc diminuer l'incidence du flétrissement bactérien (Yu 1999).

La culture de crucifères est connue pour casser le cycle de vie de graves pathogènes du sol tels que *Gaeumannomyces graminis var tritici*, agent du piétin-échaudage du blé (Angus et al. 1994). Des plants de Brassicacées ont été sélectionnés au Queensland (Australie) pour la première fois pour le contrôle de la bactérie tellurique pathogène, *R. solanacearum* (Akiew et al. 1996). Dans un essai en serre, la population de *R. solanacearum* décline quand on ajoute dans le sol, des résidus en décomposition de moutarde (*Brassica juncea*) et de canola (*Brassica napus*), une variété de Colza sélectionné au Canada dont la teneur en acide érucique a été abaissée. Lors d'un essai au champ où des accessions de tomate sensibles au flétrissement bactérien sont plantés dans un sol infesté par *R. solanacearum* amendé par des résidus de moutarde et de canola, la moutarde et le canola réduit l'incidence de la maladie de 59% et 28% respectivement. Selon Arthy et al. (2002) des résultats similaires de protection par amendements de Brassicacées sont observés sur des plants de tabac dans un sol infesté de *R. solanacearum*.

Les amendements organiques des sols (un mélange appelé S-H, les boues de station d'épuration, la bagasse de canne à sucre, la farine de soja, l'urée, l'urée combiné à l'oxyde de calcium) (Chang and Hsu 1988; Sun and Huang 1985) favorisent la résistance des plantes aux agressions parasitaires et l'utilisation de bio-fumigants telles que les huiles essentielles

comme le thymol (phénol contenu dans l'huile de thym), l'huile de palme, huile de citronnelle, huile d'eucalyptus (Paret et al. ; Pradhanang et al. 2003) permettent de réduire dans certains les populations bactériennes et de réduire ainsi l'incidence du flétrissement bactérien. Ces modifications de l'interaction entre l'hôte et le pathogène peuvent être dû à la production d'une ou plusieurs substances toxiques (durant la transformation de l'urée en présence d'oxyde de calcium).

Différents traitements du sol ont été testés pour lutter contre *R. solanacearum* par amendement chimique avec  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  (Hartman et al. 1993) ; par application de fumigants tels que le bromure de méthyle, la chloropicrine, le formol, l'hypochlorite de sodium (Chellemi et al. 1994; Enfinger et al. 1979; Fortnum and Martin 1998) ; application d'herbicides pour éliminer les plantes adventices colonisées par *R. solanacearum* (Machmud 1993); application d'antibiotique comme la streptomycine, l'ampicilline, la tétracycline et la pénicilline (Farang et al. 1982; Hartman and Elphinstone 1994). Dans le cas de culture hors-sol, la désinfection du substrat par ces différentes méthodes ou des eaux d'irrigation par traitement à la javel, ou au détergent désinfectant contenant un agent bactéricide tel que le AVDN5®, le tomaxil®, le désogerme microserre® (Cariglia 2007), ont montré une réduction voire une élimination de la population bactérienne. Ces traitements sont souvent onéreux, limités dans le temps et également pour quelques un dangereux pour l'environnement, certains produits comme le bromure de méthyle sont interdits. Une alternative est d'utiliser un éliciteur de défense de plante, par exemple l'Acibenzolar-S-methyl utilisé en pulvérisation augmentait la résistance de lignées de tomate faiblement résistantes à *R. solanacearum* (Anith et al. 2004; Pradhanang et al. 2003). Cet éliciteur serait un analogue fonctionnel de l'acide salicylique induisant la voie de signalisation de la SAR (systemic acquired resistance) qui est un mécanisme de défense induite conférant une protection contre un large spectre de microorganismes.

La solarisation consiste à recouvrir le sol nu de plastique en saison chaude, le réchauffement du sol ainsi provoqué jusqu'à une vingtaine de centimètre de profondeur permet de réduire la pullulation de nombreux pathogènes telluriques : champignons, nématodes et bactéries.

Par ailleurs, la lutte biologique par utilisation de bactéries antagonistes ou avirulentes (sauvages ou mutantes) de *R. solanacearum* est aussi une stratégie de la lutte testée par de nombreuses équipes internationales. Le principe est d'inhiber la croissance de l'agent

**Tableau 11.** Bactéries étudiées comme agents de contrôle biologique contre le flétrissement bactérien (Saddler 2005).

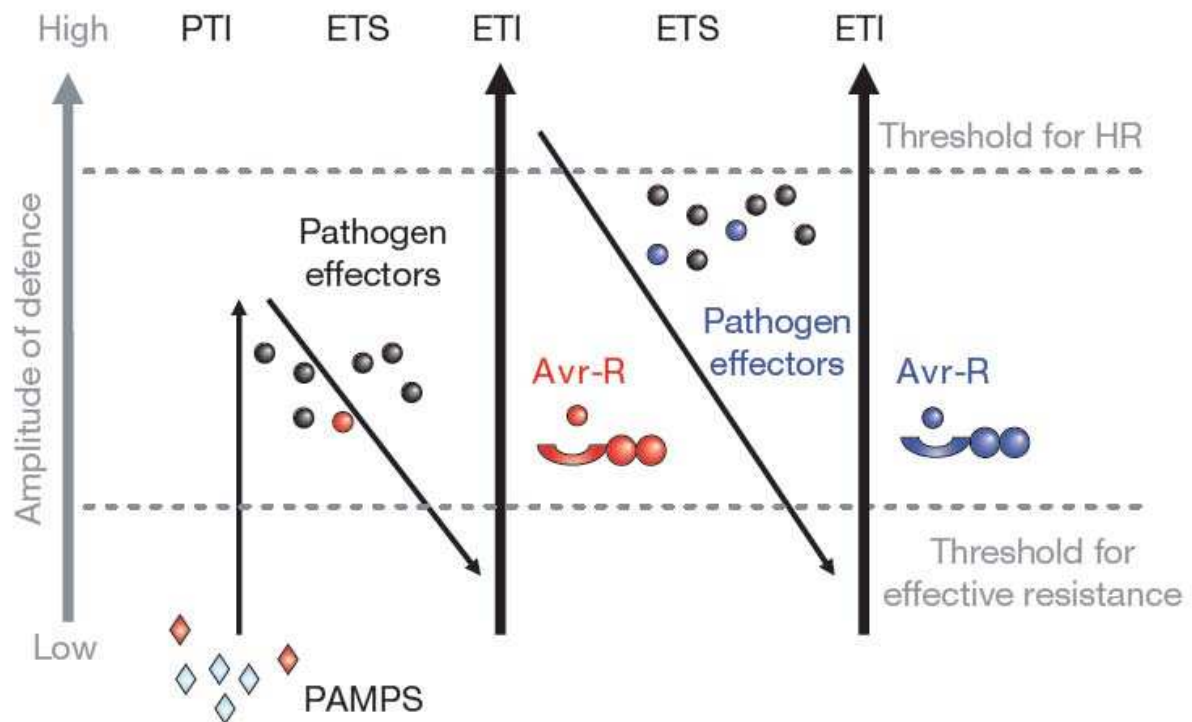
Bactérie	Hôte
<i>Pseudomonas aeuginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>Bulkhoderia glumae</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus</i> <i>pumilus</i> , <i>Bacillus atrophaeus</i> , <i>Streptomyces mutabilis</i> , actinomycètes	Tomate
<i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>B. subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , actinomycètes	Pomme de terre
<i>Corynebacterium</i> sp., <i>Bacillus</i> spp., <i>B. subtilis</i> , <i>Escherichia</i> sp., <i>Serratia</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp.	Piment
<i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>P. fluorescens</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>B. subtilis</i>	Banane Aubergine Tabac Mûre

pathogène, en mettant en compétition l'agent biologique et le pathogène cible. Les souches notamment *P. fluorescens*, *Bacillus* sp., *Bulkolderia* sp., sont capables d'inhiber la croissance de *R. solanacearum* (Hartman et al. 1993; Ji et al. 2008; Shekhawat et al. 1993; Wydra et al. 2005) Sunaina et al. 1997; Ji et al. 2008 ; Wydra et al. 2005) (**Tableau 11**). Contrairement à la plupart des souches mutantes non pathogènes de *R. solanacearum*, ces souches d'espèces différentes ne sont pas forcément de bon compétiteur au sein de la rhizosphère ou de la niche écologique à laquelle appartient *R. solanacearum* (Cook 1985). Les mutants dépourvus des déterminants *hrp* colonisent le système racinaire et les tissus conducteurs de la tige des plantes hôtes ce qui empêche la colonisation de la plante par les souches pathogènes (Trigalet and Trigaletdemery 1990).

Toutes ces méthodes sont sérieusement limitées par la stabilité génétique et phénotypique de l'agent de lutte biologique, sa production, sa formulation et son application.

Finalement, la résistance variétale reste la stratégie de choix car elle reste la plus efficace pour lutter contre le flétrissement bactérien (Hayward 1991). Elle consiste à identifier les sources de résistance ou de tolérance (colonisées et absence de symptômes) adaptées aux conditions climatiques de la zone de production. Les gènes de résistance sont repérés parmi les collections de ressources génétiques ce qui nécessite des tests d'évaluation (Carmeille et al. 2006a; Carmeille et al. 2006b; Wang et al. 1998). L'étape suivante consiste à rechercher les facteurs génétiques (gènes ou QTLs, Quantitative trait Loci) impliqués dans la résistance puis il faudra introgresser ces facteurs génétiques dans des fonds génétiques sensibles mais à haute valeur agronomique. Depuis les années 60, de nombreux chercheurs et sélectionneurs ont évalués et sélectionnés des accessions résistantes de cultures de Solanacées contre des souches race/biovar locales dans des zones géographiques spécifiques.





**Figure 13.** Modèle en zig-zag qui illustre le système immunitaire des plantes (Jones et Dangl 2006).

En phase 1, La plante détecte des MAMPs/ PAMPs (Microbial/Pathogen-Associated Molecular patterns, losanges rouges) via les PRRs (Pattern Recognition Receptors) pour déclencher une résistance basale, PTI (PAMP-triggered immunity). En phase 2, les pathogènes victorieux libèrent des effecteurs de virulence qui interfèrent avec la PTI, ou permettent la nutrition et la dispersion des pathogènes, résultant en un ETS (Effector-Triggered Susceptibility). En phase 3, un effecteur Avr (petit cercle rouge) est reconnu par une protéine R de type NB-LRR, activant une nouvelle résistance appelée ETI (Effector-Triggered Immunity), une version amplifiée de la PTI qui permet souvent de dépasser le seuil d'induction d'une réaction hypersensibilité (HR). En phase 4, des isolats de l'agent pathogène ayant perdu l'effecteur rouge, et peut être ayant acquis de nouveaux effecteurs (cercles en bleu) peuvent contourner l'ETI en produisant ces nouveaux effecteurs qui ne seront pas reconnus par la première protéine R. La plante devient sensible à ses nouveaux isolats du pathogène. La sélection favorise de nouveaux allèles NB-LRR de plante qui peuvent reconnaître l'un des effecteurs nouvellement acquis, ce qui permet à nouveau le développement d'une résistance de type ETI.

#### 4. *Résistance au flétrissement bactérien*

Face à la diversité des agents pathogènes, les plantes ont développé des systèmes de défenses qui leur permettent de s'adapter aux attaques des organismes pathogènes en variant la nature des réponses, constitutives ou inductibles. En effet, malgré l'existence de barrières constitutives préexistantes (paroi végétale, métabolites secondaires antimicrobiens etc..) qui confèrent à la plante une résistance plutôt générale avec différent degré d'efficacité, l'induction de défenses plus spécifique à chaque classe de phytopathogène, est souvent nécessaire. Ainsi, les plantes ont élaboré des stratégies de défense naturelles contre les différents stress biotiques, régulés par deux mécanismes de défense : la résistance non-hôte et la résistance hôte.

Le développement d'une résistance à une maladie donnée dépend bien de la capacité de la plante à reconnaître le(s) signal(aux) produit par l'agent pathogène, en particulier dans la phase précoce de l'infection. Les événements qui président à la mise en place de la résistance de la plante sont successivement : (i) la reconnaissance de molécules produites par le pathogène pendant l'infection, (ii) la mise en place d'une signalisation capable de transformer la reconnaissance initiale en signal intracellulaire qui conduit à (iii) l'expression des gènes impliqués dans diverses réponses cellulaires liées à la résistance aux maladies. La cinétique de cette signalétique est importante dans la résistance des plantes, car une détection trop lente est souvent la cause de la sensibilité de l'hôte (Jones and Dangl 2006) (**Figure 13**).

##### 4.1. Différents types de résistance chez la plante

Il existe deux types de résistances, la résistance spécifique et la résistance quantitative (à déterminisme polygénique). Les résistances spécifiques sont généralement à déterminisme monogénique issue d'une reconnaissance gène pour gène entre l'agent pathogène et son hôte alors que les résistances quantitatives impliquent plusieurs gènes.

Dans le cas de la résistance spécifique, on parle aussi de résistance qualitative en référence à son expression tout ou rien, le pathogène est incapable d'infecter la plante (Flor 1955, 1971; McDonald and Linde 2002). Le gène de résistance spécifique code pour une protéine de résistance (R) qui reconnaît spécifiquement une protéine d'avirulence (Avr) codée par un

gène d'avirulence présent chez le pathogène associé. Deux modèles de reconnaissance entre la protéine R et la protéine Avr ont été exposés. Le modèle d'interaction directe récepteur-ligand entre les deux protéines induit une cascade de signaux biochimiques qui conduisent aux réponses de défense de la plante telle que la réponse d'hypersensibilité (HR), qui a pour conséquence la mort cellulaire programmée des cellules infectées afin de limiter l'infection. Le modèle d'interaction indirecte implique des complexes multi-protéiques récepteurs qui permettent la détection de la protéine d'avirulence. Pour résumer, si un pathogène possède un gène d'avirulence, il est reconnu par la plante qui met en œuvre des mécanismes de résistance. Cependant si le pathogène perd le gène d'avirulence, il n'est plus reconnu par la plante, il n'y a plus de résistance spécifique.

La résistance quantitative appelée également résistance partielle confère à la plante des mécanismes de défense, comme par exemple, la sécrétion de molécules telles que les phytoalexines ou des enzymes hydrolytiques contre l'infection, sans toutefois lui permettre d'éviter totalement l'infection (McDonald and Linde 2002). Cette résistance implique plusieurs gènes ce qui lui confère une variation quantitative de son niveau d'expression. Tous les individus du même pathogène sont capables d'infecter la plante résistante mais l'efficacité d'infection, la durée de la période de latence, où la progression systémique est altérée par rapport à celles constatées sur les variétés sensibles. Les mécanismes impliqués dans ce type de résistance sont en général peu connus.

### **4.2. Résistance chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana***

#### RÉSISTANCE CHEZ L'ÉCOTYPE ND-1

Le gène de résistance *RRS1* identifié chez la lignée *d'Arabidopsis* résistante Nd-1 confère une résistance large-spectre à plusieurs souches de *R. solanacearum* (Deslandes et al. 1998). Ce gène code pour une protéine chimérique, RRS1, nommée aussi AtWRKY52/RRS1, possédant un domaine spécifique de protéine R intracellulaire (protéine NBS-LRR) et en position C-terminal un domaine du facteur de transcription WRKY Group III du domaine TIR-NBS-LRR (Toll/interleukin-1 receptor - nucleotide-binding site - leucine-rich repeat) (Deslandes et al. 2002; Rushton et al. 2010). Une mutation dans le domaine WRKY entraîne une activation conditionnelle des réponses de défenses et une perte de liaison aux « W boxes » (Noutoshi et al. 2005). De plus, AtWRKY52/RRS1 agit avec la protéine de résistance RPS4 pour fournir

une double résistance contre les pathogènes bactérien et fongique. Ceci suggère que la protéine TIR-NBS-LRR-WRKY pourrait permettre de contourner la voie ETI, conduisant à l'activation de gène de défense. En plus d'AtWRKY52/RRS1, AtWRKY16/TTR1 et AtWRKY19, les protéines NBS-LRR-WRKY sont présentes chez d'autres dicotylédones.

Le gène de résistance *RRS1* d'*Arabidopsis* interagit avec la protéine Avr PopP2. RD19 est une cystéine protéase requise pour la résistance sous la médiation de *RRS1* et son expression est induite par l'inoculation de *R. solanacearum* (Bernoux et al. 2008). Normalement localisée dans des compartiments cellulaires associés à la vacuole, RD19 est spécifiquement relocalisée au niveau du noyau suite à l'expression de PopP2. Dans le noyau, la protéine RD19 interagit avec PopP2 permettant alors l'activation de la résistance.

Bien que génétiquement défini comme récessif, ce gène R se comporte comme un gène dominant dans les plantes transgéniques (Deslandes et al. 2002). Les arguments favorisant l'hypothèse que *RRS1-R* serait un gène R dominant sont (1) il possède des séquences similaires aux autres gènes R ; (2) la résistance médiée par *RRS1-R* est partiellement dépendante de l'acide salicylique et de NDR-1, suggérant l'existence d'une voie de signalisation similaire à celles contrôlées par les gènes de résistance spécifique ; (3) l'observation dans les plantes Nd-1 transgéniques résistantes portant l'allèle sensible *RRS1-S* n'induit pas le flétrissement bactérien.

### RÉSISTANCE CHEZ L'ÉCOTYPE COL-0

La résistance de la lignée résistante Col-0 en réponse à la souche 14.25 serait polygénique est gouvernée par au moins trois locus : deux QTL sur le chromosome 2, *QRS1* et *QRS2* (Quantitative Resistance to *R. solanacearum*) et le dernier sur le chromosome 5, *QRS3*, expliquant respectivement 36, 41 et 13% de la variation phénotypique (Godiard et al. 2003). Le gène *ERECTA* codant pour une protéine réceptrice de la famille des LRR-RLK (leucine-rich repeat receptor-like kinase) intervient dans le développement des organes aériens des plantes (Torii et al. 1996). Il se trouve à proximité de *QRS1* et participerait à la résistance face à *R. solanacearum*. En effet, la transformation de la lignée sensible d'*Arabidopsis Ler* (Landsberg *erecta*) avec le gène *ERECTA* lui confère une résistance accrue à la bactérie, suggérant ainsi une interaction entre des voies régulant le développement et la défense des plantes (Godiard et al. 2003). Ce gène intervient également dans la résistance chez *Arabidopsis* à d'autres pathogènes : le champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina*

(Llorente et al. 2005) et un oomycète responsable de la fonte des semis *Phythium irregulare* (Adie et al. 2007). Dans le cas de l'interaction avec le champignon *Plectosphaerella cucumerina*, la protéine ERECTA jouerait un rôle spécifique dans la régulation de la résistance à la maladie dépendante de la paroi cellulaire végétale (Sánchez-Rodríguez et al. 2009).

### VOIES HORMONALES IMPLIQUÉES DANS LA RÉSISTANCE CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA*

L'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène, l'auxine sont des phytohormones intervenant dans la résistance des plantes. La phytohormone acide salicylique (SA) joue un rôle clé dans la résistance à de nombreux pathogènes, cependant SA apparaît avoir un effet mineur sur la résistance médiée par *RRS1-R* et n'est pas requis pour la résistance basale au flétrissement bactérien (Deslandes et al. 2002; Hirsch et al. 2002).

En revanche, un retard dans l'apparition des symptômes est observé chez la plante *ein2-1* altérée dans la voie de signalisation de l'éthylène, en réponse à plusieurs souches virulentes de *R. solanacearum*. Chez le mutant *ein2-1*, les bactéries envahissent et se multiplient jusqu'à atteindre des concentrations légèrement plus faibles que celles détectées chez la plante sensible, Col-0, mais un à deux log plus élevé que chez la plante résistante, Nd-1. Ce retard dans le développement des symptômes de la plante *ein2-1* et l'accumulation de transcrits correspondant aux deux gènes sensibles à l'éthylène, *PR-3* et *PR-4*, uniquement chez la plante sensible, Col-0, et pas chez *ein2-1* et Nd-1, suggèrent que l'éthylène joue un rôle important dans le développement du flétrissement bactérien.

Durant l'interaction entre la lignée résistante Nd-1 d'Arabidopsis et la souche GMI1000, peu de gènes sont spécifiquement régulés positivement chez Nd-1 (Hu et al. 2008). En revanche chez Col-5, lignée sensible d'Arabidopsis, des gènes impliqués dans la voie de l'acide abscissique (ABA), de la sénescence sont régulés positivement (Hu et al. 2008). Cette hormone étant impliquée dans la régulation du stress hydrique, il est possible que l'invasion massive du xylème, empêchant les flux hydriques, soit une des causes de l'induction massive de cette voie chez la lignée sensible. De plus, l'implication directe de la voie de signalisation de l'ABA dans la résistance à *R. solanacearum* chez Arabidopsis est soutenue par l'augmentation de la sensibilité des mutants ABA, *abi1* et *abi2* (mutants insensibles à l'ABA) et *aba1* (mutant déficient pour cette hormone) (Hernandez-Blanco et al. 2007). L'expression constitutive de régulateurs de la signalisation ABA incluant *ABI1-1* et *ABI2-1* dans les mutants *irx* (*irregular xylem*) affectant les protéines CESA requises dans la synthèse de la

cellulose de la paroi cellulaire secondaire végétale, induit une résistance accrue à *R. solanacearum* (GMI1000) et à d'autres pathogènes fongiques tels que *Plectosphaerella cucumerina* (phytopathogène responsable de maladie sur des espèces appartenant à 22 familles différentes), *Botrytis cinerea* (responsable de la pourriture noble sur la vigne, le tournesol, la tomate, la fraise), *Erysiphe cichoracearum* (responsable de l'oïdium sur cucurbitacées) (Hernandez-Blanco et al. 2007).

### **4.3. Résistance chez les solanacées (Tomate, Aubergine, Piment)**

#### **4.3.1. Mécanisme de résistance chez les solanacées**

A notre connaissance, peu d'études traitent des mécanismes de résistance au flétrissement bactérien chez la tomate, l'aubergine et le piment. Deux études d'histopathologie comparative sur les variétés de *C. annuum* cv. Long Chilli455 (sensible) et cv. Kulai (résistante) chez le piment (Rahman et al. 1999) et *S. lycopersicum* cv. Floradel (sensible) et cv. Caraïbo (résistante) chez la tomate (Grimault et al. 1994), ont montré que la résistance au flétrissement bactérien chez Kulai était associée à une limitation de la pénétration de la bactérie dans la plante qui a été attribuée à l'induction de barrières morphologiques et physiques chez la plante résistante (Grimault et al. 1994; Rahman et al. 1999). Cependant, *R. solanacearum* peut tout à fait infecter et coloniser les cultivars sensibles Floradel (tomate), Aranguez (sensible), Yolo Wonder et Piperade (piment), et les cultivars résistants, Hawaii7996 et Caraïbo (tomate), SM6, Kalenda et Ceylan (aubergine) et Narval (piment) (Grimault and Prior 1993, 1994). L'étude comparative chez ces trois solanacées, portant sur l'invasion racinaire par *R. solanacearum* a montré que la résistance n'était pas associée à la limitation de la pénétration de la bactérie dans les tissus vasculaires des racines. Les cultivars résistants de tomate et d'aubergine se caractérisent par la limitation de la colonisation bactérienne par la plante, au contraire du cultivar résistant piment, Narval, qui présentait un taux élevé de densité bactérienne bien que plus faible que celui observé pour les cultivars sensibles piments. Les résultats de cette étude suggèrent que le mécanisme de résistance chez l'aubergine doit être similaire à celui de la tomate et différent de celui du piment.

### VOIES HORMONALES IMPLIQUÉES DANS LA RÉSISTANCE CHEZ LA TOMATE

Chez la tomate, une approche protéomique mise en place pour appréhender les mécanismes moléculaires de la résistance au flétrissement bactérien chez les cultivars résistants (Roma, Riogrande) et sensibles (Pusa Ruby et Plant Bahr) de la tomate a permis d'identifier neuf protéines différentiellement induites entre les cultivars résistants et sensibles dont une protéine chaperonne de 60kDa et un antigène de la membrane apicale qui sont régulés positivement chez les cultivars résistants (Afroz et al. 2009). Le traitement à JA et à SA provoquent des changements significatifs de la concentration d'antigène de la membrane apicale et de la protéine disulfide-isomérase, protéine chaperonne qui serait induit en réponse à un stress biotique incluant les infections bactériennes et fongiques (Afroz et al. 2009; Ray et al. 2003). Ainsi, l'antigène de la membrane apicale pourrait être impliqué dans le processus de résistance au flétrissement bactérien via l'induction de la voie SA chez la tomate (Afroz et al. 2009).

L'implication de la SA dans la résistance de la tomate est également mis en évidence par l'analyse avec extinction du gène *NPRI* chez Hawaii7996, lignée de tomate résistante au flétrissement bactérien, qui devient incapable de transmettre le signal SA (Chen et al. 2009)

#### 4.3.2. Déterminisme génétique de la résistance chez les solanacées (tomate, aubergine, piment)

L'hérédité de la résistance à au flétrissement bactérien, chez la tomate, est complexe et les résultats peuvent différer en fonction du matériel (croisements de plante et souches) utilisé. Les gènes de résistance ont pu être définis comme récessifs sur une population ( $F_1$ ,  $F_2$  et BCs) dont la résistance provient d'un matériel HES 5808-2 présentant un haut niveau de résistance issu d'une sélection à partir de *S. pimpinellifolium*, PI 127805 (Acosta et al. 1964), comme partiellement récessif avec dominance incomplète vers la sensibilité sur deux populations  $F_1$  issue des croisements D-9 (parent résistant) x TPL-5 (parent sensible) et TPL-5 x Hawaii7998 (parent résistant) (Monma et al. 1997) ; comme monogéniques dominants sur population ( $F_1$ ,  $F_2$  et BCs) dont la résistance provient d'un matériel de Hawaii, Hawaii7998 et Hawaii7996 dont l'origine de résistance vient de *S. pimpinellifolium*, PI 127805 (Grimault et al. 1995; Scott et al. 1988) ; comme polygéniques (Acosta et al. 1964; Mohamed et al. 1997)



**Tableau 12.** Pourcentage moyens de survies des lignées du jeu international de sources de résistance au flétrissement bactérien évalué dans 12 champs et un essai en serre (Wang et al. 2000).

Entry	Location <sup>w</sup>												Mean <sup>x</sup> GH <sup>y</sup>	
	JPN	AVR	TSS	PLP	NEP	IND	AUS	MAR	REU	GDL	FLA	BRA		
H7996	100.0	84.8	100.0	96.7	100.0	87.0	100.0	96.0	100.0	96.8	100.0	100.0	97.0	93.7
BF-Okitsu	100.0	68.3	100.0	100.0	97.4	100.0	100.0	53.7	100.0	96.8	100.0	96.7	92.7	87.1
H7997S	64.0	80.0	100.0	93.3	97.6	100.0	90.0	86.3	100.0	93.6	100.0	100.0	92.6	97.9
H7997L	90.0	85.0	98.3	93.3	100.0	85.0	90.0	76.7	100.0	94.8	95.8	100.0	92.6	95.8
TML46	79.5	83.1	100.0	90.0	100.0	90.0	95.0	88.3	92.9	83.9	95.8	100.0	91.9	100.0
H7998S	32.0	63.3	100.0	96.7	100.0	100.0	95.0	100.0	100.0	95.2	100.0	100.0	91.8	81.2
TML114	35.0	77.4	100.0	100.0	100.0	97.5	100.0	88.3	100.0	94.9	83.3	100.0	91.0	97.9
H7998M	75.0	54.0	94.0	83.3	100.0	100.0	90.0	100.0	100.0	98.5	93.8	100.0	90.9	87.3
R3034	90.0	71.7	96.7	86.7	95.2	94.0	80.0	76.7	100.0	98.5	100.0	100.0	90.6	95.8
CRA66P	100.0	43.3	98.3	96.7	100.0	100.0	100.0	41.7	84.7	88.4	100.0	96.3	87.6	74.7
F7-80 pink	60.0	54.4	97.9	96.7	97.4	82.5	85.0	76.7	100.0	85.3	100.0	100.0	87.1	97.9
CRA66S	70.0	61.7	98.1	93.3	95.3	52.5	95.0	55.7	100.0	82.9	100.0	100.0	85.2	60.4
L285	100.0	36.5	92.3	83.3	95.2	65.5	100.0	43.3	98.6	88.7	100.0	100.0	84.3	70.8
Caraibo	10.0	41.7	98.3	96.7	100.0	93.5	95.0	65.0	100.0	87.3	97.9	96.7	84.0	77.1
GA1565	94.5	41.7	93.9	90.0	97.2	74.5	85.0	35.7	98.6	92.3	97.9	100.0	83.6	50.0
Caravel	10.0	76.7	83.7	96.7	90.5	74.0	50.0	85.0	100.0	72.2	100.0	92.5	78.7	85.4
I. Putih	37.5	75.0	100.0	90.0	95.1	71.0	30.0	88.0	100.0	72.3	89.6	93.3	78.0	95.8
CLN65	5.0	22.6	100.0	83.3	100.0	80.0	95.0	62.7	100.0	60.1	100.0	100.0	77.7	75.0
MT-1	21.5	56.9	100.0	93.3	100.0	84.5	65.0	53.3	98.6	71.3	67.1	100.0	75.9	85.4
CLN1464	0.0	46.7	100.0	93.3	97.4	73.0	90.0	61.7	90.3	39	72.9	59.6	69.7	81.2
CLN1463	0.0	26.7	88.3	90.0	100.0	83.5	100.0	44.7	95.6	54.5	81.3	50.7	69.5	91.6
GA219	10.0	25.0	98.3	80.0	95.2	55.0	80.0	15.3	41.7	75.6	100.0	100.0	68.8	50.0
CL5915	0.0	16.7	98.3	70.0	92.3	73.0	70.0	51.3	91.6	68.0	70.8	86.3	67.0	72.9
TBL-1	25.0	16.7	98.0	80.0	100.0	76.5	80.0	37.0	91.6	44.9	75.0	69.6	66.4	47.9
GA1405	0.0	33.3	98.1	66.7	75.8	37.5	100.0	0.0	98.6	58.9	87.5	92.5	65.5	35.8
Kemir	0.0	8.3	89.8	90.0	81.4	88.5	70.0	31.7	58.6	46.9	95.9	77.7	63.4	72.9
MT-11	5.0	26.8	94.1	73.3	66.3	79.5	65.0	48.0	72.7	33.7	50.0	82.3	57.8	70.8
BRS-1	0.0	27.6	64.6	90.0	68.9	81.5	75.0	40.7	65.1	60.1	63.5	33.3	57.3	66.7
Rodade	0.0	8.3	76.4	56.7	76.9	92.0	65.0	33.3	47.0	60.5	70.4	73.0	56.5	64.5
TBL-2	0.0	1.7	83.8	66.7	81.7	72.0	55.0	38.7	61.0	61.1	31.3	68.5	51.3	64.6
TBL-4	0.0	3.3	73.0	60.0	50.0	69.0	20.0	20.0	83.9	45.4	78.2	70.0	47.3	62.5
Redlander	0.0	6.7	77.2	73.3	85.7	77.0	40.0	68.7	57.4	29.0	46.2	7.4	46.9	79.1
FLA7421	0.0	0.0	43.5	60.0	66.7	2.5	50.0	1.7	31.7	42.2	95.9	73.3	43.2	20.8
TBL-3	0.0	3.3	74.2	63.3	46.2	47.5	35.0	19.0	55.5	28.0	58.4	60.0	41.1	58.3
Ranti	0.0	0.0	5.5	23.3	19.9	0.0	0.0	0.0	54.2	25.7	74.6	70.1	24.1	18.7
L390(Susc.)	0.0	0.0	0.0	6.7	0.0	0.0	0.0	1.7	5.6	36.9	56.3	23.3	13.3	47.9
Mean	33.7	39.7	86.5	80.6	86.6	73.3	73.2	52.4	82.7	68.4	84.1	77.4	71.3	72.7
WD LSD <sup>z</sup>	23.1	19.4	14.8	25.6	19.6	19.5	26.0	33.2	55.6	26.3	27.0	22.6	11.9	15.7

<sup>w</sup> Field trials conducted in Japan (JPN) from 4/21 to 9/1/1995, AVRDC (AVR) from 6/21 to 8/23/1995, Taiwan Seed Improvement and Propagation Service (TSS) from 8/17 to 10/27/1995, Philippines (PLP) from 1/2 to 3/1/1995, Nepal (NEP) from 7/1 to 9/5/1995, India (IND) from 4/13 to 7/6/1995, Australia (AUS) from 9/19 to 12/16/1996, Mauritius (MAR) from 3/25 to 6/25/1996, Reunion (REU) from 9/19 to 12/16/1996, Guadeloupe (GDL) from 6/27 to 8/5/1995, Florida, USA (FLA) from 7/27 to 10/17/1995 and Brazil (BRA) from 11/29/1994 to 1/23/1995 (month/day/year).

<sup>x</sup> Percent survival means of entries over 12 field trials.

<sup>y</sup> A greenhouse trial (GH) conducted at AVRDC.

<sup>z</sup> LSD values at  $p = 0.05$  level based on Waller-Duncan K-ratio t test.



notamment sur la population croisement interspécifique entre *S. lycopersicum* cv. Hawaii7996 (parent résistant) et *S. pimpinellifolium* cv. WVa700 (parent sensible) confrontées à différentes souches de *R. solanacearum* (Carmeille et al. 2006a; Mangin et al. 1999; Thoquet et al. 1996a; Thoquet et al. 1996b; Wang et al. 2000). De plus, l'étude sur populations (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et BCs) issues de deux croisements LA1421 x Cascade et LA1421 x Caraïbo ont montré que la résistance identifiée chez *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* LA 1421 pouvait être différent en fonction du parent sensible utilisé (Mohamed et al. 1997).

Contrairement à la tomate, peu d'études portent sur la résistance de l'aubergine et du piment au flétrissement bactérien. Ce sont pour la plupart des études de screening de ressources génétiques. L'hérédité de la résistance au flétrissement bactérien chez le piment a été décrit comme oligogénique sur une population d'haploïdes doublés obtenue à partir du croisement intraspecific *C. annuum* PM687 (résistant) x Yolo Wonder (sensible) (Lafortune et al. 2005; Mahbou Somo Toukam 2010).

### 4.3.3. Génétique de résistance chez la Tomate

Malgré des décennies de travaux, les chercheurs d'organismes privés et publiques ont seulement eu des succès limités dans le développement d'un cultivar de tomate à gros fruit et à niveau élevé de résistance contre le flétrissement bactérien dans différentes zones géographiques. Des niveaux utiles de résistance existent dans *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* comme L285, et dans *S. pimpinellifolium* (en particulier PI127805A), certaines lignées de sélection, et quelques cultivars créés par introgression d'un ou de plusieurs loci dans *S. lycopersicum*. Quand la résistance au flétrissement bactérien a été évaluée chez 35 lignées de tomate et dans 11 sites à travers le monde (**Tableau 12**), L285 affichait une résistance intermédiaire tandis que Hawaii7997 (et les lignées proches H7998, H7996 ayant la même origine de résistance au flétrissement bactérien, *S. pimpinellifolium* PI127805A) se montrait résistant dans tous les sites et avait la moyenne du taux de survie la plus élevée (97%) (Wang et al. 1998). Des croisements entre L285 et H7997 (trois lignées résistance supplémentaires) ne produisaient pas de descendants F<sub>1</sub> qui étaient significativement plus résistants au flétrissement bactérien que les parents (Hanson et al. 1998). Malheureusement Hawaii7996 est sensible à certaines souches de *R. solanacearum* (Jaunet and Wang 1999), ainsi, sa résistance n'est pas universelle.

Les méthodes de génétiques modernes assistées par marqueurs révèlent que la résistance au flétrissement bactérien chez L285 et Hawaii est polygénique et est portée par 2 chromosomes ou plus.

### RÉSISTANCE CHEZ L285

Danesh et al. (1994) ont croisé une lignée résistante sauvage *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* L285 et la lignée sensible CLN286BC1F2-25-14-7, puis ont développé une carte de liaison RFLP avec 79 marqueurs qui couvrent environ 75% du génome. L'infection par voie racinaire des descendants F<sub>2</sub> avec la souche UW364 (phylotype I, r1bv4, Chine) a révélé un QTL sur le chromosome 6 flanqué des marqueurs CT184 et TG240 qui participe à 77% de la variation de la réponse à la maladie. Ce locus est également trouvé associé à la résistance contre la souche PSS4 (phylotype I-15, r1bv1, Taïwan) (Wang et al. 2000). Un locus mineur sur le chromosome 10 entre les marqueurs RFLP CT225b et TG230 participait à 24% de la variation. Des QTLs sont aussi trouvés quand les plants F<sub>3</sub> sont inoculés avec UW364, et ils sont partiellement dominants. La présence d'un QTL majeur sur le chromosome 6 est intéressante puisque de très nombreux gènes impliqués dans la résistance à d'autres agents pathogènes sont aussi portés par ce chromosome.

Chez la tomate, l'extrémité du bras long du chromosome 6 est donc très riche en gènes contrôlant des résistances qualitatives et quantitatives à différents pathogènes, notamment, le gène *Mi* codant pour une protéine de type NBS-LRR (Williamson 1999) impliqué dans la résistance au nématode *Meloidogyne icognita* (Dickinson et al. 1993; Milligan et al. 1998), au puceron *Macrosiphum euphorbiae*, aux aleurodes *Bemisia tabaci*, vecteur du TYLCV (Nombela et al. 2003); les gènes *Cf-2* et *Cf-5* codant pour des protéines avec domaine LRR et pour des glycoprotéines associées à la membrane, impliqués dans la résistance au *Cladosporium fulvum*, champignon qui cause la moisissure sur feuilles de tomate (Dickinson et al. 1993; Dixon et al. 1996); le gène *Am* impliqué dans la résistance à l'Alfalfa mosaic virus (Parrella et al. 2004); les gènes *Ol-1* et *Ol-3* de résistance à *Oidium lycopersicum* (Bai et al. 2003; Huang et al. 2000; van der Beek et al. 1994); QTLs impliqués dans la tolérance au TYLCV tel que le QTL à effet majeur provenant de *S. chilense*, Ty-1 (Zamir et al. 1994), et le QTL issu de *S. pimpinelifolium* (Chagué et al. 1997); QTL intervenant dans la résistance au chancre bactérien (*Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*) (Sandbrink et al. 1995); et les QTLs impliqués dans la résistance au flétrissement bactérien (Carmeille et al.

**Tableau 13.** Résumé des études portant sur la détection de QTLs de résistance au flétrissement bactérien chez la tomate (Mabhous Somo Toukam, 2010).

Auteurs/ références	DANESH et al, 1994			TOQUET et al, 1995			MANGIN et al, 1999			WANG et al, 2000			CARMEILLE et al, 2004		
Souches bactériennes	UW364-Race1, Biovar 1			GM18217-Race1, Biovar 1			GM18217-Race1, Biovar 1			Pss4-Race1, biovar 3 Phylotype I, Seq 15			JT516-Race3, Biovar 2, Phylotype IIB-Seq 15		
Population de cartographie	L285xCLN286BC1F2-25-14-7			Hawaï7996xWVa700			Hawaï7996xWVa700			Hawaï7996xWVa700			Hawaï7996xWVa700		
	Marqueurs	Position	R <sup>2</sup>	Marqueurs	Position	R <sup>2</sup>	Marqueurs	Position	R <sup>2</sup>	Marqueurs	Position	R <sup>2</sup>	Marqueurs	Position	R <sup>2</sup>
Chromosome 2										GP504	106cM	<10%			
Chromosome 3				CP6	60 cM								CP226	40 cM	
				P12									CP6		
				GP226	70 cM	10% Ri							PIT2		9% Ri
				O5	95 cM								TG515		
													K4d	72 cM	
Chromosome 4				TG268									CD49	0 cM	
				CT145									TG464	30 cM	
				TG268	30 cM								TG268		9-13% Csr
				TG464b									CT145		
				GP165		10% Ri							CD73		
				CD73									GP165		
				F5N20											
				K12											
				N17-1	45 cM										
Chromosome 6	TG297	1cM		<i>AscPer</i>	0 cM		<i>Q2</i>		12%	<i>Q2</i>	0		TG178	0 cM	
	TG231			<i>K4_3</i>									CD67		
	TG178	9cM		<i>Q2</i>			TG73	38 cM					TG232		
	TG243			TG178	8 cM		TG240	42 cM	13%	TG118	20 cM		TG118		
	TG118			CD67	10 cM		TC406			TG153	25 cM	12%	TG153		
	TG153	26cM	77% Ri	TG232	12 cM	20% Ri	TG162	52 cM		CP18	30 cM		CP18		22-30% Ri
	TG25	31cM	30% Si	TG325	14 cM		CT109	68 cM		TG73	38 cM		TG73	30 cM	
	CT184			TG118	20 cM					TG240	48 cM		TG240		
	TG365	43cM		TG153									TG406	40 cM	
	CT136	45cM		CP18	30 cM								TG162	52 cM	
	TG292			TG73									CT109	60 cM	
	TC280			TG240	40 cM										
	CT193			TG162	80 cM										
Chromosome 7	TG272	1 cM													
	TG51b	18 cM	24% Si												
	TG135	20 cM													
	TG183	50 cM													
Chromosome 8	CP112	0 cM		CP112	0 cM	10% Ri				CP112	0 cM				
	CD40	4 cM	10% Ri	CD40	4 cM					CD40	3 cM	< 10%			
										CT135	10 cM				
Chromosome 10	TG230		24,6% Ri	PAL2											
	TG285		38,2% Si	CP105											
Chromosome 11				D6b	45cM										
				GP162	52cM	5% Ri									
				GP505											
				O10	55 cM										
Chromosome 12										TG564	30 cM				
										K4a	65 cM	74%			
										CT156	115 cM				

2006a; Danesh et al. 1994; Mangin et al. 1999; Thoquet et al. 1996a; Thoquet et al. 1996b; Wang et al. 2000).

### RÉSISTANCE CHEZ HAWAII7996

Un ensemble d'études sur les descendants du croisement interspécifique entre la lignée résistante *S. lycopersicum* cv. Hawaii7996 et la lignée sensible *S. pimpinellifolium* cv. WVa700 (WVa700) a permis d'identifier des QTLs multiples en utilisant la carte génétique qui couvre environ 75% du génome (**Tableau 13**). Les tests en chambre climatiques de plants inoculés par GMI8217 (syn. GT1, phylotype IIA, r1bv1, Guadeloupe) ont révélé un locus majeur sur le chromosome 6 localisé sur une région distante de 10-20 cM du QTL observé avec la lignée L285 (Thoquet et al. 1996b). Ce QTL et deux autres à effet plus faible sur les chromosomes 10 et 11 participent à plus de 56% de la variation de la résistance. Deux autres QTLs ont été identifiés sur le chromosome 4 mais Wang *et al.* (2000) pensent qu'il s'agit d'artéfacts statistiques. Les essais au champ des F<sub>2</sub> et des F<sub>3</sub> inoculés avec GMI8217 en Guadeloupe ont permis de mettre en évidence 4 QTLs (Thoquet et al. 1996a). En plus des loci précédemment identifiés sur les chromosomes 6 et 11, Thoquet et al. ont révélé 2 nouveaux QTLs localisé sur les chromosomes 3 et 11. L'analyse du développement du flétrissement bactérien lors d'un test au champ avec la population F<sub>3</sub> inoculé avec la souche GMI8217, révèle que le QTL sur le chromosome 6 est en fait 2 QTLs. Carmeille et al. (2006a) ont utilisé une population RILs F<sub>8</sub> qui provenant également du croisement Hawaii7996 xWVa700, pour identifier les QTLs de résistance à la souche JT516 (phylotype II) à différentes saisons. Un QTL majeur, Bwr-6 et un mineur Bwr-3 étaient détectés pour chaque saison pour tous les critères. Les deux QTLs montraient des effets plus forts dans la saison chaude que dans la saison froide. Cependant, les QTLs Bwr-4 et Bwr-8 étaient détectés uniquement dans la saison chaude, démontrant que les facteurs environnementaux peuvent probablement influencer l'expression de la résistance contre la souche JT516.

#### 4.3.4. Génétique de résistance chez le Piment

##### RÉSISTANCE CHEZ PM687 X YOLO WONDER

La résistance au flétrissement bactérien chez le piment est contrôlé par 2 à 5 facteurs génétiques sur une population d'haploïdes doublés obtenue à partir du croisement intraspecific *C. annuum* PM687 (résistant) x *C. annuum* Yolo Wonder (sensible) (Lafortune et al. 2005). La résistance oligogénique au flétrissement bactérien chez le piment au sein de cette population est contrôlée par des QTLs à effets additifs et épistatique (Mahbou Somo Toukam 2010). Seul des QTLs mineurs à effets faibles provenant du parent sensible Yolo Wonder étaient détectés à l'exception du QTL localisé sur P6b détecté uniquement pour l'essai au Cameroun provenant du parent résistant PM687. Cette résistance était associée à la fois à quelques QTLs souche-spécifiques et des QTLs environnement-dépendant, seule une partie faible de facteurs génétiques chez PM687 est commune dans le contrôle la résistance entre les différentes souches.

##### RÉSISTANCE CHEZ CM334

La résistance à la souche CMR143 (phylotype I) chez une population RILs  $F_{5-6}$  à partir d'un croisement intraspecific entre *C. annuum* Yolo Wonder x *C. annuum* Criollo de Morelos 334 (CM334) polygénique est contrôlée par 2 QTLs majeurs portés par le chromosome P4 et des QTLs mineurs à effets additifs et épistatiques (Mahbou Somo Toukam 2010). Les loci portant des QTLs de résistance à CMR143 chez le piment CM334 sont majoritairement orthologues à ceux contrôlant le flétrissement bactérien chez la tomate.

#### 4.3.5. Résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine

L'utilisation de variétés résistantes est l'une des composantes de la maîtrise de cette maladie particulièrement grave sous les tropiques, en association avec des techniques culturales particulières comme certaines rotations de cultures qui réduisent l'incidence du flétrissement bactérien de l'aubergine (et de la tomate) (successions maïs-okra-radis, maïs-*Vigna* sp.- maïs, Okra-*Vigna* sp.-maïs, Sohi et al. 1981). Une forte fertilisation azotée avant plantation et

pendant la culture, ou le chaulage avant plantation (apport de chaux vive CaO) permettent aussi de réduire l'incidence du flétrissement bactérien sur aubergine (Clairon, 1984). Des sources de résistance au flétrissement bactérien ont été recherchées chez l'aubergine, comme chez la tomate et le piment, depuis longtemps, notamment aux USA, Japon, Philippines, Malaisie, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Brésil (Quezado-Soares et al. 1997; Davidson, 1935; Kelman, 1953 ; Suzuki et al. 1964 ; Das & Chattopadhyay, 1955; Li et al. 1988). Il existe en conséquence une abondante bibliographie décrivant de nombreuses sources de résistance, de niveau variable, chez l'aubergine et les espèces qui lui sont apparentées. Les sources de résistance sont décrites dans des variétés locales ou commerciales (par ex. Mochizuki & Yamakawa, 1979; Rao et al. 1976; Sitaramaiah et al. 1985; Chen et al. 1997 ; Goth et al. 1991; Sadashiva et al. 1993 ; Wang et al. 1997, 1998) et ont été utilisées dans des programmes de sélection (Li et al. 1987, 1988; Geetha & Peter, 1993).

### VARIÉTÉS RÉSISTANTES

Les résistances sont généralement décrites comme étant de bon ou très haut niveau, atteignant parfois 100% de survie. Elles sont plus rarement décrites sous les termes d'immunité (pour Taiwan Naga, Suzuki et al. 1964; BWR54 et Pusa Purple Cluster, Singh, 1991 ; SM6-1, Sheela et al. 1984) ou de tolérance comme celle décrite chez SM6 (Geetha & Peter, 1993), et il arrive que selon les auteurs une même variété soit qualifiée différemment. Les résistances sont décrites principalement chez des variétés asiatiques, parfois aussi chez des variétés originaires de Turquie. Il serait lassant de dresser une liste exhaustive de toutes les variétés résistantes qui ont été signalées dans la bibliographie, ne serait-ce qu'à cause des numéros anonymes qui les identifient souvent, aussi listons nous ci-dessous un échantillon des publications qui illustre la diversité des variétés résistantes, et signalons en particulier les variétés que nous avons utilisées dans la partie expérimentale, ou qui font partie du pedigree des variétés utilisées.

Ainsi, une résistance a été décrite chez **SM6** (Kerala Agric. Univ.1981, quoted by Jessykutty & Peter, 1986; Goth et al. 1983; Narayanan & Nair, 1983; Gopalakrishnan & Gopalakrishnan, 1985; Prakash et al. 1994), Arka Keshav and Arka Neelkanth (Patania et al. 1996; Singh et al. 1998), **Surya**, Swatha (Singh et al. 1998), **EG203** (Hussain, 2005), Annapurna, Arka nidi (Singh et al. 1998), Pusa Purple Cluster (Rao et al. 1976; Sitaramaiah et al. 1981, 1985; Rajput et al. 1982; Gopalakrishnan & Gopalakrishnan, 1985 ; Deka et al. 1992; Bora et al. 1993), Pusa purple Round (Sitaramaiah et al. 1981, 1985), T-3 (Sitaramaiah et al. 1985),

Vijay hybrid (Sitaramaiah et al. 1981, 1985), Banaras Giant Green (Sitaramaiah et al. 1981, 1985), WCGR112-8 (Gopinath & Madalageri, 1986), Gulla (Gowda et al, 1974 ; Khan et al. 1988), WCGR [West Coast Green Round] (Gowde et al. 1990; Prakash et al. 1994) et **Ceylan** (Gowde et al. 1990), **Dingras Multiple Purple** and Sinampiro [Philippines] (Rao et al. 1976; Sakata et al. 1995); **Taiwan Naga** (Prakash et al. 1994), de nombreux numéros SM (Narayanan & Nair, 1983 ;(Sheela et al. 1984; Jessykutty & Peter, 1986; Singh et al. 1998), CNPH 171, CNPH 175, CNPH 407, CNPH 408 (Quezado-Soares et al. 1997), BB7 & BB11 (Sharma & Kumar, 1995), accessions locales de l'Etat du Bihar CH243, CH245, CH247, CH249 and CH309 (Sharma et al. 1995), PBr-1, PBr-61, PBr129-2, PBr-129-5, PBr-129-6, S-3, S-20 (Sitaramaiah et al. 1985), IHR180 & IHR 181 (Sadashiva et al. 1993), BWR 34, Yein and Rathaiah (Bora et al. 1993), *S. melongena* var. *insanum* (Srinivasan et al. 1969 ; Gopimony & George, 1979), JC1, JC2 et Annamalai (Deka et al. 1992), Matala & Kopek Winstead & Kelman, 1960), Nihon Nassu (Akiba et al. 1972), et divers numéros PI de l'USDA originaires d'Inde (269663), Turquie (166996, 176367, 176761), et nouvelle Guinée (349612) (Goth et al. 1986). Un tri sélectif conduit par Sakata et al. (1995) sur des accessions de Malaisie a montré que plus de 60% des accessions étaient résistantes au flétrissement bactérien, et que 27 d'entre elles ne manifestaient aucun symptôme en fin d'essai, avec LS1934 présentant un niveau de résistance particulièrement élevé, et supérieur à celui de Dingras multiple purple.

SM6 est une accession qui mérite qu'on s'y intéresse, (1) du fait qu'elle fait partie des accessions que nous avons testées et qu'elle présente l'un des plus larges spectres d'action et (2) du fait qu'il s'agit à l'origine d'un matériel hétérogène qui a fait l'objet de nombreuses subdivisions. Elle était décrite en 1987 comme hétérogène pour de nombreux caractères morphologiques (forme et couleur du fruit, présence ou absence d'épines) ainsi que pour le niveau de résistance au flétrissement bactérien (Sankar et al. 1987). A résistance constante vis-à-vis du flétrissement bactérien, Asha Sankar (1982, cité par Jessykutty & Peter, 1986) a groupé la variabilité de SM6 en différentes classes basées sur la couleur du fruit (blanc, vert et pourpre), sa forme (longue, ovale), et l'absence ou la présence d'épines. Différentes lignées de bons niveaux de résistance en sont dérivées, comme SM 6-1 SP, SM 6-1, M, SM 6-7 SP (Sheela et al. 1984; Ushamani & Peter, 1987), ainsi que SM 6-1 (pourpre, long, épineuse), SM6-2 (pourpre, longue, non épineuse), SM6-6 (blanche, longue, non épineuse), SM6-7 (pourpre, ovale, non épineuse) (Sheela et al. 1984 ; Geetha & Peter, 1993).

### MODALITÉS DE LA RÉSISTANCE

Le niveau de résistance est mentionné comme variable ou stable, (1) pour des variétés d'aubergine testées dans différentes régions d'un même pays (ex. Singh, 1991), (2) ou testées hors de leur pays d'origine (Ano et al. 1990), (3) ou pour des variétés testées vis à vis de plusieurs souches appartenant ou non à différentes races (Goth et al. 1983; Narikawa et al. 1988) ou biovars (Quezado-Soares et al. 1997), ou (4) pour des espèces apparentées comme *S. ferox*, *S. toxicarium*, *S. sisymbriifolium* (Ali et al. 1990). Ainsi, SM6 montre une résistance variable selon les isolats des races 1 et 3 vis-à-vis desquels elle est testée (Goth et al. 1983 ; Jessykutty & Peter, 1986). La sensibilité des variétés sensibles est également variable selon les souches (Ali et al. 1990).

Le mode de résistance de l'aubergine a été décrit comme étant similaire à celui qui existe chez la tomate, c'est-à-dire une capacité des cultivars résistants à limiter l'invasion de leurs vaisseaux du bois par la bactérie (Grimault & Prior, 1994). La présence de la bactérie dans le matériel aubergine résistant a été signalée par Jessykutty & Peter dès 1986. Chez des plantes au stade floraison, Khan et al. (1988) rapportent une concentration bactérienne dans la rhizosphère de la variété résistante Gulla, moindre d'un facteur 100 à celle trouvée dans la rhizosphère de la variété sensible Pusa purple long, et que des extraits racinaires de la variété résistante avaient un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne in vitro.

### DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE ET MÉCANISME(S) DE RÉSISTANCE

Selon les variétés utilisées, la résistance au *Ralstonia solanacearum* est décrite comme monogénique dominante (e.g. Chadha, 1993; Chaudhary, 2000), en particulier chez WCGR112-8 (Madalageri et al. 1983; Gopinath & Madalageri, 1986 ; Gohwa & Shivashankara, 1990) qui est la variété actuellement utilisée dans les travaux japonais de cartographie de la résistance (Fukuoka et al. 2010). L'hérédité est aussi décrite comme récessive (Chaudhary, 2000; Gopalakrishnan et al. 2005), ou polygénique dominante (e.g. Ano et al. 1991; Chaudhary, 2000), ou polygénique récessive (e.g. Feng LinLin et al. 2003). Gousset et al. (2004b) ont trouvé que des facteurs cytoplasmiques intervenaient probablement. L'expression de la résistance à l'état hétérozygote est donnée comme dominante ou intermédiaire. Une résistance monogénique dominante a été obtenue par mutagenèse avec



rayons gamma d'un hybride *S. melongena* var. *insanum* X Purple Giant (Gopimony et al. 1983).

Ce rapide survol indique que différents contrôles génétiques de la résistance existent probablement au sein des ressources génétiques d'aubergine.

On connaît peu de choses du/des mécanismes de résistance chez l'aubergine. Gopalakrishnan et al. (2005) ont observé des cellules racinaires corticales particulières chez des cultivars résistants (petites et très serrées les unes aux autres), ainsi qu'une forte teneur en composés phénoliques dans les racines, qui pourraient à la fois prévenir l'entrée de la bactérie dans la plante, ainsi que sa multiplication et son envahissement ultérieurs. Sitaramaiah et al. (1984) ont noté que la faible concentration initiale en phénols totaux dans les racines des cultivars résistants augmentait, pour dépasser après 90 jours celle des cultivars sensibles.

### RÉSISTANCE AU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN CHEZ LES ESPÈCES APPARENTÉES

La résistance au flétrissement bactérien a également été identifiée chez de nombreuses espèces de *Solanum* apparentées à comme par exemple *S. torvum*, *S. sisymbriifolium*, *S. viarum*, *S. stramonifolium* (= *S. toxicarium*), *S. ciliatum*, *S. violaceum* and *S. aethiopicum* (Ano et al. 1991; Clain et al. 2004; Collonnier et al. 2003; Collonnier et al. 2001; Gousset et al. 2005; Hebert 1985; Tamura et al. 2002) ainsi que dans d'autres espèces. Selon les souches utilisées, le niveau de résistance des espèces apparentées est mentionné comme variable (*S. ferox*, *S. integrifolium*, *S. torvum*) ou stable (*S. sisymbriifolium*, *S. toxicarium*) (Narikawa et al. 1988; Ali et al. 1990). Gousset et al. (2004a) indiquent la présence d'infection latente chez *S. torvum*, surtout dans les racines et la partie basse de la tige, après inoculation avec une souche de la race 1 biovar 3. La résistance issue de *S. aethiopicum* a été suggérée d'hérédité monogénique dominante par Gousset et al. (2004b), sur la base de leurs résultats de ségrégation.

Le greffage de scions d'aubergine sensibles sur un porte greffe résistant (aubergine résistante ou un *Solanum*) est une bonne stratégie alternative de contrôle de la maladie en absence de variétés résistantes de bonne qualité agronomique (Srinivasan et al, 1969; Mochizuki and Yamakawa, 1979b; Goth et al. 1986; Sakata et al. 1995; Sato et al. 2004; Yoshida et al.

2004a). Inversement, un porte greffe aubergine résistant peut être utilisé pour greffer une variété de tomate sensible (Rajput et al. 1982; Sheela et al. 1984).

### RÉSISTANCE AU FLÉTRISSEMENT BACTÉRIEN ET RÉSISTANCE À D'AUTRES MALADIES VASCULAIRES

L'association entre la résistance au flétrissement bactérien et la résistance à d'autres maladies vasculaires est mentionnée chez l'aubergine (Narikawa et al. 1988; Sakata et al. 1995) et *S. torvum* (Narikawa et al. 1988; Gousset et al. 2004a) pour la fusariose causée par *Fusarium oxysporum* s. sp. *melongenae*, et chez *S. torvum* pour la verticilliose causée par *Verticillium dahliae* f. (Sakata et al. 1989). Ce type d'association entre résistances à des maladies vasculaires causées par des agents bactériens et fongiques a déjà été signalé chez la tomate (Laterrot et al. 1978).

### TRAVAUX DE SÉLECTION À L'IRAT ET À L'INRA

Les travaux de sélection les plus élaborés semblent avoir été conduits par l'IRAT en Martinique et par l'INRA en Guadeloupe. La lignée Madinina, dérivée de croisements impliquant SM164 (**Ceylan**) a été utilisée en combinaison avec une lignée de Trinidad (Aranguez) résistante à l'anthracnose des fruits pour produire l'hybride F1 Kalenda (Daly 1986), inscrit au catalogue en 1972 qui a été cultivé à grande échelle aux Antilles françaises durant les années 1970 et début 1980, avant que sa résistance ne s'érode du fait de pratiques culturales trop intensives qui ont favorisé l'émergence de souches bactériennes plus agressives.

De nouveaux programmes ont alors été initiés par l'INRA dès le début des années 1980, pour créer du matériel plus résistant que Kalenda. Deux voies ont été définies puis utilisées par G. Ano qui avait en charge la création de matériel pour remplacer Kalenda, une voie intraspécifique et une voie interspécifique (Ano et al. 1990; Ano et al. 1991). La voie intraspécifique a consisté en le cumul par sélection récurrente des résistances de plusieurs variétés décrites dans la littérature pour leur résistance (**Taiwan Naga**, **Pusa Purple Cluster**, Bornéo, Mayon, P12 = Nan Tan et **Sinampiro**), et dont le bon comportement en situation d'infestation aux Antilles avait été vérifié. Ces variétés ont été croisées avec Florida Market, adaptée aux conditions tropicales et de bonne qualité agronomique, et leurs hybrides intercroisés pour constituer la première population panmictique. Ont ensuite alterné tests au

champ en conditions d'infestation par le flétrissement bactérien, choix des plantes résistantes puis leur intercroisement. Le programme s'est ensuite redirigé vers une sélection généalogique classique. La lignée AG 91-21 qui fait partie de la Core collection des géniteurs de résistance aubergine, est issue de ce programme. Elle est donc supposée présenter une résistance composite issue de la recombinaison des facteurs de résistance des six variétés résistantes de son pedigree.

La voie interspécifique a consisté à réaliser le croisement interspécifique entre *Solanum aethiopicum* groupe *Aculeatum*, décrit comme résistant au flétrissement bactérien dans la littérature japonaise et vérifié résistant dans les conditions des Antilles (Beyries, 1979 ; Hébert, 1985) et une lignée d'aubergine d'origine turque (renommée localement P18) dont la résistance au flétrissement bactérien avait été remarquée dans les conditions des Antilles. Le schéma de sélection a alterné tests de résistance au champ, choix des plantes résistantes, intercroisement et rétro-croisements par des variétés adaptées aux conditions tropicales, et résistantes (Aranguéz) ou non (Florida Market) à l'antracnose des fruits. La lignée AG91-25 est issue de ce programme, et est donc supposée recombinaison des facteurs de résistance issus de *S. aethiopicum* et de *S. melongena* P18. Compte tenu de l'originalité et de l'intérêt de son pedigree, cette lignée a été choisie comme parent résistant à croiser avec la lignée européenne sensible au flétrissement bactérien et de type commercial occidental, MM738. Au stade de la génération F<sub>2</sub> issue de ce croisement, une sélection Single Seed Descent a été conduite jusqu'en génération F<sub>6</sub> à l'INRA Montfavet et a abouti à la population de lignées recombinantes RILs-F<sub>6</sub> que nous avons utilisée dans notre démarche de cartographie des facteurs de résistance.

### MARQUEURS ET CARTOGRAPHIE DE LA RÉSISTANCE

Des travaux de marquage de la résistance au flétrissement bactérien sont en plein développement, par des équipes chinoises et japonaises, par simple méthode bulk (Cao et al. 2009 ; Sun et al. 2008) ou avec cartographie génétique associée (Nunome et al. 1998 ; Fukuoka et al. 2010). Par exemple, dans le cas d'une résistance monogénique dominante, un marqueur RAPD situé à 4,33 cM du gène a été obtenu par Zhu HuaWu et al. (2005). Compte tenu de la possible liaison de certains facteurs de résistance au flétrissement bactérien avec des facteurs de résistance au *Fusarium*, il est intéressant de noter l'existence de plusieurs

travaux de marquage de la résistance à cette seconde maladie vasculaire (Mutlu et al. 2008; Toppino et al. 2008).

**En conclusion**, l'aubergine présente beaucoup plus de ressources que la tomate en matière de nombre de variétés résistantes (ces variétés étant originaires de diverses zones géographiques et ne présentant pas d'apparentement entre elles), et donc en diversité probable des systèmes génétiques à l'origine de sa résistances. Elle est donc probablement un meilleur modèle que la tomate pour étudier les mécanismes de résistance chez les solanacées et leur interaction avec la diversité bactérienne, bien que du fait de sa moindre importance économique, les efforts qui lui sont consacrés soient infiniment plus modestes.

# Matériel et Méthodes

## Encadré

### Tomato accession selected for their resistance to bacterial wilt.

The choice of relevant tomato accessions requested a prerequisite careful analysis of the scientific literature. First, about eighty breeding lines, reported as having a good resistance level, including the most resistant lines reported by Scott et al. (2005) were listed, and the information about their original source of resistance, when available, was compiled. This working list (not displayed) showed that the identity of the source of resistance was unfortunately and for almost half the accessions, not mentioned in the literature. For the set of accessions for which it was mentioned, it was clear (i) that the original genetic basis of their resistance was relatively narrow because few original genitors were concerned, mostly a few accessions of *L. pimpinellifolium*, *L. cerasiforme*, and (ii) that since the 1950s there had been active exchange of material between breeders in particular between those of US Universities (North Carolina, Hawaii, Puerto Rico), INRA (Guadeloupe), Philippines University, Los Banos, and later, AVRDC (Taiwan), because many accessions include in their pedigree material from one or the other of these breeding programmes. Given the interaction between resistance sources and strains, the use of this relatively narrow genetic basis for resistance in different environments and towards various strains suggests however that a diversity of resistance genetic factors may have been bred for in the different national programmes. In order to select appropriately from the working list the core collection of nine tomato resistant lines, representative of the genetic diversity of the resistance sources, we clustered, within informal groups, the accessions issued from the different breeding programmes, and then we sampled one or two lines from each group on the basis of their high resistance and frequent mention in the literature. *CRA66* was chosen as representative of breeding material created at INRA in Guadeloupe (French West Indies). Its resistance is given as originating from a local West Indies variety (Digat and M. 1968) or possibly from the line *OTB2* (Messiaen et al. 1978), itself given as a derivative from North Carolina resistant material (Suzuki et al. 1964). *NC 72 TR 4-4* was chosen as representative of the breeding material created in North Carolina (Scott et al. 2005). The original source of resistance of North Carolina material is *PI 129080* identified as *S. pimpinellifolium* (Hanson et al. 1998) or as *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (Laterrot and Kaan 1978). An accession of *L. esculentum* var. *pyriforme* (*Beltsville 3814*), from Puerto Rico, would also participate to the pedigree of North Carolina material (Hanson et al. 1998; Laterrot and Kaan 1978). *IRAT L3* is derived from Puerto Rico material, and its resistance originates from *S. pimpinellifolium 199 UPR* (Daly 1976). *IRAT L3* was created by IRAT (Institut de Recherche en Agronomie Tropicale, French institute does not exist as such, anymore) in Martinique (French West Indies). *Hawaii 7996*, the reference resistant line widely used for gene mapping (Carmeille et al. 2006a; Mangin et al. 1999; Thoquet et al. 1996a; Thoquet et al. 1996b; Wang et al. 2000) was chosen as representative of the breeding material created in Hawaii. Hawaii material included first North Carolina bacterial wilt resistant sources, but in 1953, a new source, *S. pimpinellifolium PI 127805A*, was obtained and selected for resistance in Hawaii (Acosta, 1964). Hence, it is possible that the resistance of *Hawaii 7996* originates either from two sources, *PI 129080* and *PI 127805A*. However, *PI 127805A* only is mentioned as the source of resistance of *Hawaii 7996* in the literature (Balatero and Hautea 2001; Hanson et al. 1998; Scott et al. 2005). Laterrot (1978) suggests a totally different source, from Philippines, for the resistance of *Hawaii 7996* (Laterrot and Kaan 1978). *TML46* and *R3034* are highly resistant lines representative of Philippines breeding material, the resistance origin of which is unclear (Wang et al. 1998). *CLN 1463* represents AVRDC breeding material, derived from lines created at INRA Guadeloupe, North Carolina, and Philippines (Wang et al. 1998). Lastly, *L285* from AVRDC, but of unknown pedigree, was chosen because of its high level of resistance (Wang et al. 1998).

## Matériel et Méthodes

### 1. *Matériel biologique*

#### 1.1. Matériel végétal

##### Lignées homozygotes

Pour les études d'interaction entre les solanacées et la diversité de *R. solanacearum*, une collection de 30 accessions appartenant aux espèces tomate, aubergine et piment (Core-TEP) a été testée. La liste des génotypes de la Core-TEP ainsi que leur origine sont détaillés dans le Chapitre 1. Seules les huit accessions de tomate choisies en fonction de leur résistance au flétrissement bactérien seront précisées dans l'encadré.

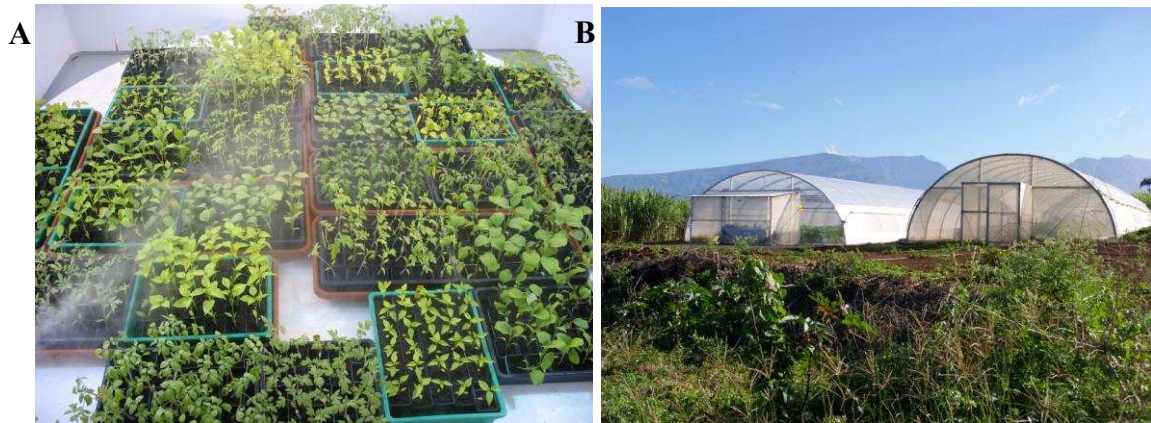
##### Population en ségrégation

La cartographie des facteurs de résistance a été effectuée sur une population RILs F<sub>6</sub> de 178 familles issue du croisement intraspécifique entre *Solanum melongena* MM738 et *Solanum melongena* AG91-25. Cette population nous a été fournie par Marie-Christine DAUNAY de l'INRA d'Avignon.

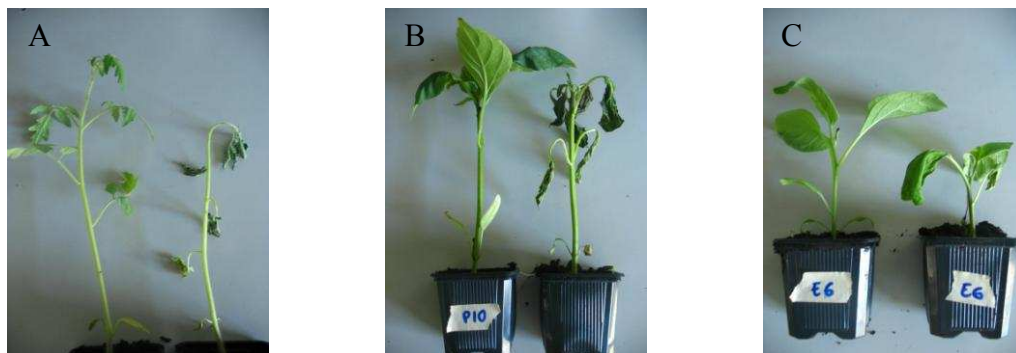
#### 1.2. Souches bactériennes

Une collection de souches de *R. solanacearum* (Core-Rs2) représentative de la diversité des trois premiers phylotypes de ce complexe d'espèces a été utilisée lors des tests d'interaction avec la Core-TEP en chambre climatique. Le choix de ces souches sélectionnées est détaillé dans le Chapitre 1.

La cartographie des facteurs génétiques de résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine a été réalisée après inoculation avec un jeu de souches appartenant au phylotype I (Core-Rs3). Le choix des souches résulte des données acquises lors de l'étude des interactions Core-TEP x Core-Rs2 et est explicité dans le Chapitre 1.

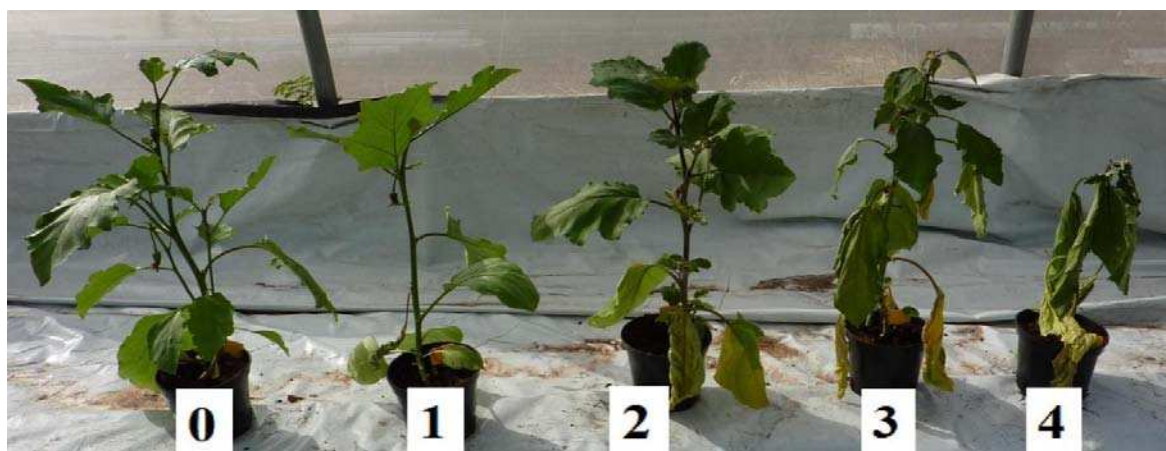


**Figure 14.** Dispositif expérimental. A. chambre climatique, B. serres.



**Figure 15.** Photographies de plantes en chambre climatique. A. tomate, B. aubergine, C. piment.

Dans chaque photographie, plante sans symptôme est à gauche, plante flétrie est à droite.



**Figure 16.** Echelle symptomatologique du flétrissement bactérien causé par *Ralstonia solanacearum* sur l'aubergine (Photo M. Gouy).



## 2. Méthode d'inoculation et dispositifs expérimentaux

La scarification des racines de plantes précèdent toutes les inoculations quelles que soient le test. La préparation de l'inoculum concentré à  $10^8$  cfu/ml est présentée dans les Chapitres 1 et 2. Les conditions expérimentales (stade des plantes lors de l'inoculation, essais en chambre climatique ou en serre, facteurs environnementales) ont variés en fonction de l'étude.

Pour les tests d'interaction Core-TEP x Core-Rs2, les plantes placées en chambre climatique (température  $25-30 \pm 2^\circ\text{C}$  nuit-jour, humidité relative à 80% et photopériode 12h) sont inoculées au stade 3-4 feuilles (Chapitre 1) (**Figure 14A**).

Les essais pour la cartographie des facteurs génétiques de résistance dans la population RILs  $F_6$  ont été menés en serre sur la station Ligne Paradis entre 2008 et 2010 (Chapitre 2) (**Figure 14B**). Les plantes sont inoculées par le système d'irrigation.

## 3. Evaluation phénotypique

Lors des tests des interactions entre Core-TEP x Core-Rs2, le développement des symptômes étaient notés une fois par semaine en évaluant chaque plante sans symptôme et les plantes flétries (au moins une feuille flétrie) ou mortes (**Figure 15**). Les variables étudiées sont le pourcentage de plantes flétries à la fin de l'essai et l'indice de colonisation (Chapitre 1).

Pour la recherche d'une source de résistance, une expérience a été réalisée par souche de *R. solanacearum*, à l'exception de la souche PSS4 où deux expériences ont été menées durant deux saisons différentes. Le dispositif expérimental est décrit dans le Chapitre 2. Le développement des symptômes étaient notés deux fois par semaine en évaluant chaque plante suivant une échelle de notation décrite dans le Chapitre 2 (**Figure 16**). Les critères évalués sont le score de la maladie correspondant à la moyenne des notes par famille RILs, à chaque date, le pourcentage de plantes flétries à chaque date, l'AUDPC standardisée (AUDPC) calculé à partir du score de la maladie ou du pourcentage de flétrissement. Cependant les variables étudiées sont le pourcentage de plantes flétries à la fin de l'essai et l'indice de colonisation pour trois premières souches (CMR134, PSS366 et GMI1000) et le score de la

maladie à 24 jours après inoculation ( $SCO_{24\text{dai}}$ ) et l'AUDPC calculé à partir de l'indice de la maladie ( $SCO_{\text{AUDPC}}$ ).

#### **4. Etude génétique en utilisant le marquage moléculaire**

Des facteurs génétiques contrôlant la résistance quantitative au flétrissement bactérien ont été identifiés en utilisant 178 individus RILs de génération  $F_6$  issus du croisement entre MM738 et AG91-25, inoculés par différentes souches de *R. solanacearum*. Des marqueurs potentiellement associés à la résistance partielle au flétrissement bactérien ont été identifiés. Les étapes sont les suivantes:

##### **4.1. Extraction d'ADN génomique**

Le protocole d'extraction est détaillé dans l'ANNEXE 4. Les échantillons utilisés sont des jeunes feuilles de plante d'aubergine. Ces feuilles sont alors broyées mécaniquement. L'ADN est séparé des protéines, des pigments chlorophylliens et des débris végétaux par extraction au chloroforme et précipitation à froid par l'éthanol. Les culots obtenus sont séchés et repris dans du Tris-EDTA pH 8 pour être conservés. Après une nuit passée à 4°C, pour que l'ADN soit totalement re-dissout. La qualité d'ADN extrait est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance à 260 nm ( $A_{260}$ ). Le degré de contamination de l'ADN par les protéines est évalué en contrôlant l'absorbance à 280 nm.

##### **4.2. Marquage moléculaire**

Plusieurs techniques de marquage ont été utilisées pour le génotypage dans cette étude:

- 64 combinaisons amorces AFLP
- 238 combinaisons d'amorces SRAP,
- 100 combinaisons d'amorces RGA,
- 20 combinaisons d'amorces RGA/SRAP,
- 66 marqueurs RAPD,

- 459 marqueurs SSR de l'aubergine, publiés par (Nunome et al. 2009; Nunome et al. 2003; Stigel et al. 2008) et 376 marqueurs SSR de la tomate (SGN). L'utilisation du Kit Type-it de Qiagen nous a permis le multiplexage des amorces PCR.
- 10 marqueurs COSII avec 2 enzymes de restrictions

Les protocoles sont détaillés en ANNEXE 5 et ANNEXE 6.

### 4.3. Analyse des profils moléculaires

Le choix des marqueurs destinés à la construction de la carte repose sur les points suivants:

(1) un marqueur, par définition, doit être présent chez un seul des deux parents, (2) le marqueur doit être bien visible (présence ou absence) chez les parents et dans une partie des descendants du croisement, (3) la ségrégation d'un marqueur doit être voisine des proportions mendéliennes en RILs (1:1). Ainsi, à un marqueur donné la moitié des génotypes doivent posséder une bande donnée et l'autre son absence. Cependant dans notre étude, les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation ne sont pas exclus.

L'étape suivante consiste à coder la présence de bande par « 1 » et l'absence par « 0 » pour la cartographie des marqueurs AFLP. En second lieu, ce codage (1,0) est ensuite transformé en codage (A, B) de la façon suivante: la lettre A est utilisée lorsqu'un allèle au marqueur provient de MM738, et B lorsqu'une l'allèle provient de AG91-25. Pour la cartographie génétique des marqueurs co-dominants, on utilise les lettres A et B correspondant aux allèles du parent MM738 et du parent AG91-25 respectivement et H pour les individus hétérozygote. Cependant le logiciel MAPMAKER ne prenant pas en charge les individus hétérozygotes, les « H » sont transformés en données manquantes.

### 4.4. Méthodes statistiques

Les différentes analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R (version 2.7.2) et du logiciel SAS. Les différentes procédures employées sont présentées dans les Chapitres 1 et 2.

La construction de la carte génétique établie sur la population RILs du croisement entre MM738 et AG91-25 a été réalisée par le logiciel MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lander et al. 1987) et est détaillé dans le Chapitre 2. La recherche de QTL a été réalisée, d'une part, par

l'analyse marqueur par marqueur via l'approche de maximum de vraisemblance et d'autre part, à l'aide du logiciel PLABQTL (Utz and Melchinger 1996) en utilisant les méthodes d'interval mapping (SIM) (Haley and Knott 1992) et de composite interval mapping (CIM) (Jiang and Zeng 1995; Zeng 1994).

#### 4.4.1. Calcul des variances et de l'héritabilité

Concernant les souches GMI1000, PSS366 et CMR134, pour lesquelles la résistance a été testée à une seule saison, le modèle d'analyse de variance suivant a été utilisé :

$$Y_{ij} = \mu + F_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Avec :

M : moyenne de la population

$F_i$  : effet de la famille RIL i

$B_j$  : effet de la serre j

$\varepsilon_{ij}$  : résiduelle

Concernant PSS4, pour laquelle la résistance a été testée à deux saisons différentes, le modèle d'analyse de variance suivant a été utilisé :

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + B_j + S_k + (F \times S)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Avec :

$\mu$  : moyenne de la population

$F_i$  : effet de la famille RIL i

$B_j$  : effet de la serre j

$S_k$  : effet de la saison k

$(F \times S)_{ik}$  : effet de l'interaction famille RIL x saison

$\varepsilon_{ijk}$  : résiduelle

Les hypothèses suivantes ont également été testées :

- Indépendance et normalités des résidus ;
- Homogénéité des variances des résidus (test de Bartlett).

Le test de Fisher suppose la normalité des distributions. Si celles-ci s'écartent légèrement de la normalité, l'analyse de la variance est assez robuste pour être utilisée. Si elles s'écartent trop, il est préférable d'utiliser une transformation des variables ou un test non paramétrique. Si les résidus ne suivent pas une loi normale, il est possible qu'il existe un facteur de variabilité inconnu qui ne soit pas pris en compte dans le modèle.

Les héritabilités au sens large, au niveau du dispositif dans le cas de l'essai avec PSS4, ont été calculées comme suit selon Hallauer et Miranda (1981) :

$$h^2 = \frac{\sigma_F^2}{\sigma_F^2 + \frac{1}{s}\sigma_{FS}^2 + \frac{1}{rs}\sigma_e^2}$$

Si l'on considère saison par saison, la formule de l'héritabilité change et devient :

$$h^2 = \frac{\sigma_F^2}{\sigma_F^2 + \frac{1}{r}\sigma_e^2}$$

Avec:

$\sigma_F^2$  = variance de l'effet génotype ;

$s$  = nombre de saisons;

$\sigma_{FS}^2$  = variance de l'interaction saison\*génotype;

$r$  = nombre de blocs (serre);

$\sigma_e^2$  = variance résiduelle;

#### 4.4.2. La méthode du maximum de vraisemblance.

Cette méthode est une méthode d'analyse de liaison basée sur l'exploitation des données génotypiques et phénotypiques de la population étudiée, dans notre cas, la population RILs  $F_6$  issue du croisement intraspécifique *S. melongena* MM738 et AG91-25. La recherche d'association, entre des marqueurs génétiques et la résistance au flétrissement bactérien a été utilisée pour identifier le(s) gène(s) de résistance à la maladie. La technique consiste à comparer la fréquence d'un marqueur génétique chez l'ensemble des individus résistant et sensibles de la population RILs. L'analyse statistique est fondée sur le tableau de contingence où figurent, pour les résistants et les sensibles, les fréquences de chaque génotype permettant de calculer la fraction de recombinaison  $r$  entre un marqueur  $m$  et le gène de la résistance au flétrissement bactérien. Un résultat positif, autrement dit lorsque la fraction de recombinaison  $r$  est importante, cela suggère que le marqueur est en déséquilibre de liaison avec un ou plusieurs des facteurs génétiques impliqués dans la résistance. Un déséquilibre de liaison entre deux loci est défini par l'existence d'une combinaison d'allèles à ces loci plus fréquente que celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance. Le LOD score défini par Morton (1955) comme le logarithme du rapport des chances (*Logarithm of the odds ratio*), est basé sur le calcul de la fraction de recombinaison  $r$  entre le marqueur  $m$  et le gène de la résistance au

flétrissement bactérien. Cela signifie que le LOD score varie suivant la valeur du  $r$ . Un LOD score largement positif est synonyme de co-ségrégation, et inversement un LOD score faible signifie une absence de liaison. Cette méthode requiert la connaissance de la ségrégation génétique de la résistance de la population RILs.

Les calculs du taux de recombinaison en fonction des différentes hypothèses sont en ANNEXE 7.

**Chapitre 1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de *Ralstonia solanacearum***

## **Chapitre 1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de *Ralstonia solanacearum***

Cette partie fondatrice de l'ensemble de mon travail de thèse présente les interactions entre les différentes souches de représentatives de la diversité génétique chez *R. solanacearum* phylotypes I, II et III. Nous n'avons pas retenu de souches du phylotype IV Indonésien car sous représentées dans la collection du laboratoire, par conséquent la diversité au sein de ce phylotype était difficile à apprécier. Cette collection de souches a été codée Core-Rs2. Par ailleurs, les principaux géniteurs de résistance au flétrissement bactérien chez les trois solanacées à graines modèles que sont la tomate, l'aubergine et le piment ont été sélectionnées par un panel international d'expert pour représenter au mieux la diversité génétique des sources de résistance utilisées dans les principaux programmes de sélection. Cette collection a été codée Core-TEP. L'approche qui a été choisie a consisté à :

- (1) décrire les interactions entre les accessions résistantes et les différentes souches, ce qui revenait à classer les phénotypes entre résistance, tolérance (infections latentes) et sensibilité. Il fallait rendre compte et explorer la capacité d'une accession donnée à contrôler la maladie et, alternativement, la capacité d'une souche particulière à contourner la résistance qui lui était opposée;
- (2) sélectionner un sous-ensemble réduit de souches (Core-Rs3) mais néanmoins représentatif de la diversité phénotypique de la plante pour la résistance de façon à disposer d'une gamme de souches réduite au minimum en vue des études génétiques;
- (3) déterminer une collection réduite de ressources génétiques de *Solanaceae* (Core-TEP2) qui pourrait à l'avenir être utilisé pour la caractérisation phénotypique des souches de *R. solanacearum*.



Les résultats sont présentés sous la forme d'un article de rang A sous presse [First look : [apsjournals.apsnet.org/toc/phyto/0/ja](http://apsjournals.apsnet.org/toc/phyto/0/ja)] dans la revue internationale *Phytopathology* pour une parution prévue en janvier 2011 sous la référence :

**Lebeau, A.**, Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., Chiroleu, F., Wicker, E., Prior, P. 2011. Bacterial wilt resistance in tomato, eggplant and pepper: genetic resources challenged with the multifaceted *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101 :154-165

## **Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex**

A. Lebeau, M.-C. Daunay, A. Frary, A. Palloix, J.-F. Wang, J. Dintinger, F. Chiroleu, E. Wicker, P. Prior

First, sixth, seventh and eighth authors: CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropicale (PVBMT), 7 Chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre Cedex, La Réunion; second and fourth authors: INRA, Centre d'Avignon, UR 1052, Unité de Génétique & Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine St Maurice, BP 94, 84143 Montfavet cedex, France; third author: Department of Molecular Biology & Genetics, Izmir Institute of Technology, Urla, Izmir, 35430, Turkey; fifth author: AVRDC-The World Vegetable Center, P.O. Box 42, Shanhua, Tainan, Taiwan 741, R.O.C.; and ninth author: INRA/CIRAD, UMR PVBMT, 7 Chemin de l'IRAT, 97410, Saint-Pierre Cedex, La Réunion.

Corresponding author: P. Prior; E-mail address: philippe.prior@cirad.fr

### **ABSTRACT**

Lebeau, A., Daunay, M.-C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J.-F., 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.

Bacterial wilt caused by strains belonging to the *Ralstonia solanacearum* species complex inflicts severe economic losses in many crops worldwide. Host resistance remains the most effective control strategy against this disease. However, wilt resistance is often overcome due to the considerable variation among pathogen strains. To help breeders circumvent this problem, we assembled a worldwide collection of 30 accessions of tomato, eggplant and pepper (Core-TEP), most of which are commonly used as sources of resistance to *R. solanacearum* or for mapping quantitative trait loci. The Core-TEP lines were challenged with a core collection of 12 pathogen strains (Core-

Rs2) representing the phylogenetic diversity of *R. solanacearum*. We observed six interaction phenotypes, from highly susceptible to highly resistant. Intermediate phenotypes resulted from the plants' ability to tolerate latent infections (i.e. bacterial colonization of vascular elements with limited or no wilting). The Core-Rs2 strains partitioned into three pathotypes on pepper accessions, five on tomato and six on eggplant. A "pathprofile" concept was developed to characterize the strain clusters, which displayed six virulence patterns on the whole set of Core-TEP host accessions. Neither pathotypes nor pathoprofiles were phyloptype specific. Pathoprofiles with high aggressiveness were mainly found in strains from phylotypes I, IIB and III. One pathoprofile included a strain that overcame almost all resistance sources.

**Chapitre 1. Table 1.** Characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains assembled as working collection encoded Core-Rs1

Strain <sup>a</sup>	Alternative name <sup>a</sup>	Host	Origin	Phylotype	GenBank <sup>b</sup>	Reference
GMI1000	RUN54, JS753	<i>Solanum lycopersicum</i>	French Guyana	I-18	AF295251	(59,60)
CIP365	RUN47, WP144	<i>Solanum tuberosum</i>	Philippine	I-45	GQ907151	(60)
CMR134	RUN215, CFBP7058	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Cameroon	I-13	EF439740	(53)
R288	RUN90, UW373	<i>Morus alba</i>	China	I-12	GQ907153	(22)
PSS190	RUN85	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	EU407285	This study
MAFF211266	RUN69, JT690	<i>Solanum lycopersicum</i>	Japan	I-15	AF295250	(59,60)
PSS366	RUN155	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	EU407299	This study
PSS216	RUN156	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-13	EU407291	This study
PSS4	RUN157, CIP410	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	EU407264	This study
UW151	RUN158, ACH92	<i>Zingiber officinale</i>	Australia	I-18	AF295254	(59,60)
PSS358	RUN159	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	EU407298	This study
IPO1609	RUN1	<i>Solanum tuberosum</i>	Netherlands	IIB-1	EF371814	(77)
JT516	RUN160	<i>Solanum tuberosum</i>	Reunion	IIB-1	AF295258	(59,60)
CMR34	RUN147, CFBP7029	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroon	IIB-1	EF439750	(53)
CIP10	RUN40	<i>Solanum tuberosum</i>	Peru	IIB-25	AF295260	(59,60)
NCPBP3987	RUN81, R590	<i>Solanum tuberosum</i>	Brazil	IIB-28	AF295261	(59,60)
CFBP6784	RUN16, ANT307	<i>Anthurium andreaeanum</i>	Martinique	IIB-4NPB	EF371813	(22,77)
CFBP6783	RUN17, ANT75	<i>Heliconia caribea</i>	Martinique	IIB-4NPB	EF371817	(77)
CIR02-080	RUN18, ANT80	<i>Anthurium andreaeanum</i>	Martinique	IIB-4NPB	EF371819	(77)
ICMP7963	RUN55, K197	<i>Solanum tuberosum</i>	Kenya	IIA-7	AF295263	(59,60)
CFBP2957	RUN36, MT5	<i>Solanum lycopersicum</i>	Martinique	IIA-36	AF295265	(22,59)
CIP120	RUN42, R563	<i>Solanum tuberosum</i>	Peru	IIA-38	GQ907152	(60)
CIP239	RUN43, UW469	<i>Solanum tuberosum</i>	Brazil	IIA-40	AF295269	(22,59)
CMR39	RUN150, CFBP7032	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroon	IIA-41	EF439726	(53)
A3909	RUN9	<i>Heliconia rostrata</i>	Hawaii	IIA-6	EF371812	(22,77)
B34	RUN22	<i>Musa</i> sp.	Brazil	IIA-24	GQ907154	This study
JT525	RUN60	<i>Pelargonium asperum</i>	Reunion	III-19	AF295272	(59,60)
J25	RUN56	<i>Solanum tuberosum</i>	Kenya	III-20	AF295279	(22,59)
CFBP3059	RUN39, JS904	<i>Solanum melongena</i>	Burkina Faso	III-23	AF295270	(22,59)
CMR15	RUN133, CFBP6941	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroon	III-29	EF439743	(53)
CMR32	RUN145, CFBP6942	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Cameroon	III-29	EF439749	(53)
PSI07	RUN83	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonesia	IV-10	EF371804	(22,77)
MAFF301558	RUN71, JS934	<i>Solanum tuberosum</i>	Japan	IV-8	DQ011558	(22,23)
ACH732	RUN14, UW433	<i>Solanum lycopersicum</i>	Australia	IV-8	GQ907150	(22)

<sup>a</sup> Abbreviations: CIP: International Potato Center, Lima, Peru; R: Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Hertfordshire; PSS: AVRDC Collection, Shanhua, Taiwan; ACH: Hayward, Department of Microbiology, Centre for Bacterial Diversity and Identification, The University of Queensland, St Lucia Australia; UW: University of Wisconsin-Madison, USA; CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; RUN: collection at CIRAD-INRA Reunion.

<sup>b</sup> GenBank accession numbers for partial endoglucanase gene (*egl*) sequence.

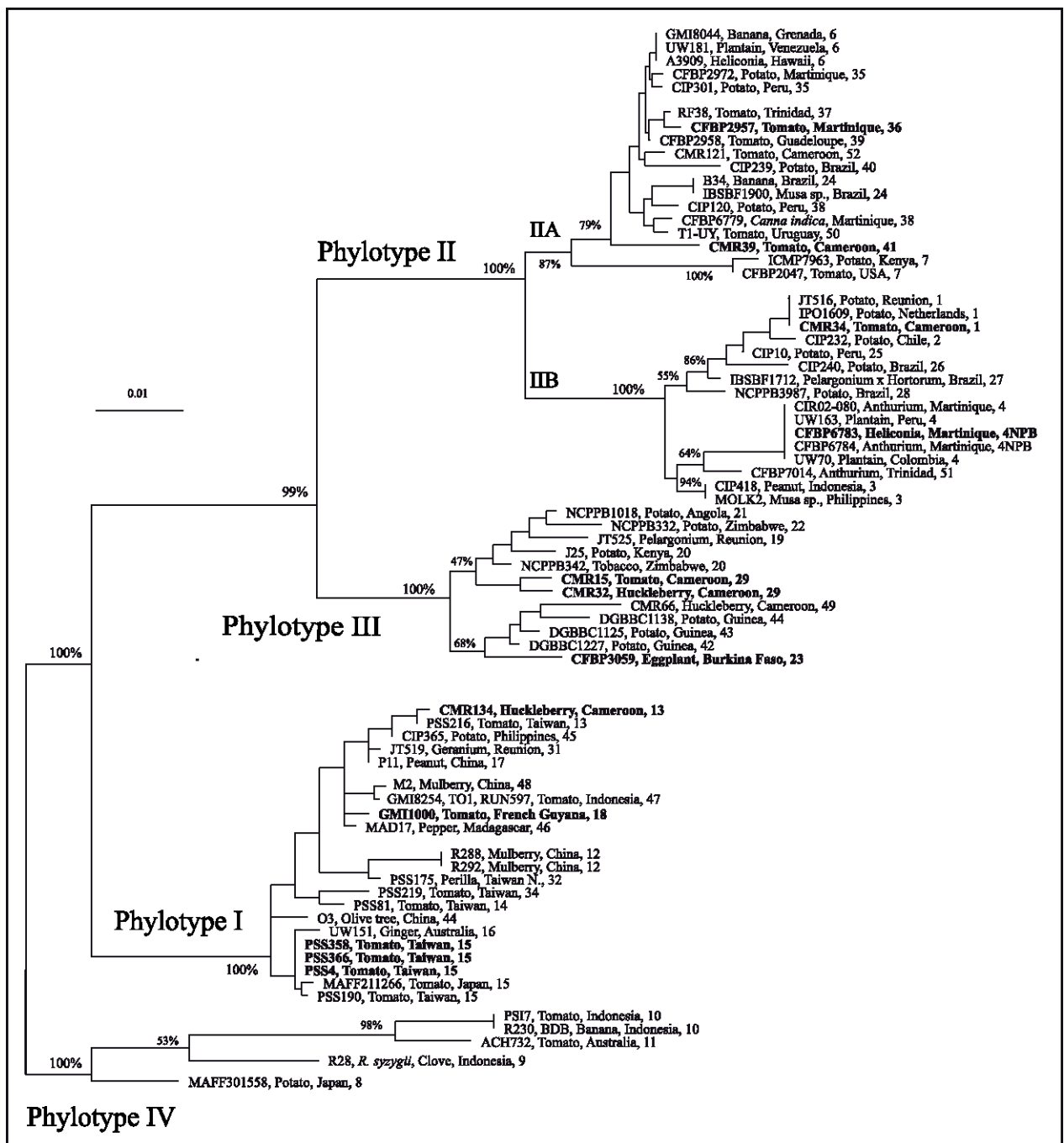
*Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt disease, ranks among the most devastating pathogens in solanaceous crops. The bacterium penetrates through the root system and proliferates in xylem tissue. Irreversible wilting generally develops quickly, resulting in plant death. This soilborne and vascular disease has a broad and expanding host range of >200 monocot and dicot plant species (42). The disease has spread worldwide because of the bacterium's capacity to adapt to tropical, subtropical, and temperate regions (17,21,34,35). The lifestyle of *R. solanacearum* allows it to maintain, rapidly disseminate, or adapt to different ecological niches such as soil, water, and plant (nonhost rhizosphere and host xylem). The outstanding multifaceted characteristics of this xylem-invader mirror its extraordinary genetic and phenotypic diversity and dramatically increase the difficulties for its sustainable control.

Historically, classification of *R. solanacearum* strains has been partitioned into five races based on host range (7,36,56) and six biovars based on trophic traits (33). More recently, phylogenetic analysis based on different molecular methods clearly showed that *R. solanacearum* encompasses a highly heterogeneous group of bacteria probably belonging to several species (9,10,22,58,59) that cannot be taxonomically resolved by the race/biovar system. These molecular tools unraveled four distinctive phylotypes related to the geographical origin of the strains (9,10,22): phylotype I originated mainly from Asia, phylotype II from America, phylotype III from Africa, and phylotype IV from Indonesia. In addition to Indonesian strains of *R. solanacearum*, phylotype IV hosted the closely related species *R. syzygii* (Sumatra disease of clove) and the banana blood disease bacterium (BDB). Thus, the concept of species complex applies to the extreme phenotypic, genetic, and ecological variability among *R. solanacearum* isolates (22,24). For this reason, we considered phylotype classification as the most

appropriate basis for assigning a phylogenetic position to any particular strain or group of strains in this study.

For decades and in several countries, breeders of solanaceous crops have identified and used intra- or interspecific sources of resistance for creating bacterial wilt resistant cultivars of tomato, eggplant, and pepper (TEP) (2,3,14,27,31,45,50,51,62,67,69,74,75). However, significant interactions of cultivar–location highlighted the importance of both site environmental conditions and pathogen population variability for the three species (3,32, 39,50–52,57,74). Cases of resistance breakdown under intensive culture have also been observed (2,3). Hence, breeders face the challenging problem of variable efficiency of resistance expression, which is aggravated by an increasingly worldwide trade of TEP resistant cultivars. Instability of resistance in TEP is due to (i) insufficient knowledge of the mechanisms characterizing the resistant sources such as latent or absent infection, (ii) insufficient knowledge of the genetic characteristics of the strains used in TEP breeding programs, and, last but not least, (iii) strong but poorly known interactions between the genetic factors involved in host resistance and bacteria pathogenicity. Abiotic factors such as temperature, humidity, and nitrogen supply, as well as biotic factors such as plant co-infection by root-knot nematodes, also have an influence, often poorly controlled, over resistance expression, bacterium pathogenicity, and their interaction (6,16, 34,43). The genetic and phenotypic plasticity of *R. solanacearum* strains strongly hinders the use of varietal resistance as an efficient and sustainable control strategy.

The resistance of tomato (reference accession Hawaii 7996) is controlled by several mapped quantitative trait loci (QTLs) with major or minor and broad-spectrum or strain-specific effects (5,8,56,70,71,76). For eggplant, different patterns of genetic control have been described (14,74) whereas, for



**Chapitre 1. Fig. 1.** Phylogenetic positions of *Ralstonia solanacearum* strains placed into Core-Rs1 and Core-Rs2 (bold). Neighbor-Joining cladogram computed by using the Jukes-Cantor correction with 1000 bootstrap resamplings.

pepper, the expression of resistance is quantitative (45). Depending on the resistance genitors and testing conditions used, field resistance in *Solanaceae* spp. is commonly assessed as a percentage of surviving plants, and is variable but rarely complete (i.e., 100% surviving plants). Evaluation of resistance would benefit from examination of not only plant wilting but also bacterial colonization in unwilted plants. Indeed, the use of such detailed phenotypic characterization revealed that resistance can be either an ability to adapt to a latent bacterial colonization of the vessels (a tolerant phenotype) or, conversely, an ability to contain the bacteria in the lower parts of the vegetation (a resistant phenotype) (26).

Partitioning the genetic diversity of the *R. solanacearum* species complex in different phylotypes offered a new opportunity to reevaluate the resistance of solanaceous crops, challenged with phylogenetically diverse strains. The aim of this study was to characterize the interactions between resistant material and the agent of bacterial wilt. A core collection of TEP genotypes (Core-TEP), representative of the worldwide genetic diversity of the resistances available or used in reference mapping studies, was assembled. Similarly, a core collection of strains (Core-Rs), representative of the major phylogenetic diversity recognized within the *R. solanacearum* complex, was defined. We also included virulent variants (77) as well as representatives of the largely unstudied phylotype III African strains (53). Core-TEP was challenged by Core-Rs to examine their interactions. In this study, we considered pathogenicity to be an ability to cause the disease and virulence (synonymous aggressiveness) to be a degree or measure of the pathogenicity; in other words, a relative capacity to cause the disease.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** The main characteristics of *R. solanacearum* strains used in this study are shown in Table 1. At first, a set of 34 strains was assembled as a working collection (encoded Core-Rs1) that encompassed the phylogenetic diversity of strains, some of which are known to be pathogenic in members of the family *Solanaceae*. These strains were chosen, out of thousands maintained in different collections, on the basis of their (i) host identity at the time of isolation and (ii) geographical origin. As a priority, we selected strains whose complete genomes have been sequenced and annotated: GMI1000 (66), IPO1609 (28), CMR15, PSI07, and CFBP2957 (64), as well as reference strains used in breeding programs and QTL mapping studies (PSS4 and JT516). Strains CFBP6784, CFBP6783, and CIR02-080 were representative of virulent variants described in French West Indies (77). Except for CMR39, strains in Core-Rs1 were tested for pathogenicity to susceptible controls in Core-TEP under lowland ( $25$  to  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  night and day temperature, respectively) and highland-like ( $15$  to  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  night and day temperature, respectively) experimental conditions. Plants were grown in climatic growth chambers (Rotoplan) with relevant levels of quarantine restrictive conditions, depending on the strains tested. Strains that had the highest aggressiveness on susceptible controls of TEP at both temperatures, as well as strains that had variable aggressiveness on TEP but belonged to other phylotypes, were selected for the next resistance tests on Core-TEP. This set of strains was encoded Core-Rs2 (Table 2). The phylogenetic position of strains in Core-Rs1 was assigned after computing a phylogenetic tree (Fig. 1) based on variations in partial endoglucanase gene (*egl*) sequences retrieved from GenBank that included 34 *egl* sequences from *R. solanacearum* Core-Rs1 strains (Table

**Chapitre 1. Table 2.** Pathogenicity of Core-Rs1 strains of *Ralstonia solanacearum* to tomato, eggplant and pepper susceptible controls

Strain	Phylotype-Sequevar	Core-Rs2	Tomato (L390)		Eggplant (Florida Market)		Pepper (Yolo Wonder)	
			HT <sup>a</sup>	CT	HT	CT	HT	CT
GMI1000	I-18	X	+++ <sup>b</sup>	++	+++	+++	+++	+++
CIP365	I-45		+	+	+	+	+	-
CMR134	I-13	X	+++	-	+++	+++	+++	+++
R288	I-12		-	-	-	-	-	-
PSS190	I-15		+	-	+	-	++	-
MAFF211266	I-15		-	-	-	-	+	-
PSS366	I-15	X	+++	+++	+++	+++	+	-
PSS216	I-13		++	++	++	+++	++	-
PSS4	I-15	X	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UW151	I-18		++	-	++	++	+	-
PSS358	I-15	X	+++	+++	+++	+++	+++	-
IPO1609	IIB-1		-	-	+	+	-	-
JT516	IIB-1		+++	+++	+++	+++	+	++
CMR34	IIB-1	X	+++	+++	+++	+++	++	++
CIP10	IIB-25		++	-	+	+	+	-
NCPBP3987	IIB-28		+	-	+	++	+	+
CFBP6784	IIB-4NPB		+++	+++	++	++	++	++
CFBP6783	IIB-4NPB	X	+++	+++	+++	++	+++	+++
CIR02-080	IIB-40		+++	+++	+	++	+++	+++
ICMP7963	IIA-7		+	-	+	-	+	-
CFBP2957	IIA-36	X	+++	++	++	++	+++	+
CIP120	IIA-38		+	-	+	-	+	-
CIP239	IIA-40		+	-	+	-	+	-
CMR39	IIA-41	X	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A3909	IIA-6		-	-	+	+	+	-
B34	IIA-24		-	-	+	-	-	-
JT525	III-19		+	+	+	+	-	+
J25	III-20		+	-	+	+	-	-
CFBP3059	III-23	X	+++	+++	++	+++	+++	++
CMR15	III-29	X	+++	+++	+++	+++	+	-
CMR32	III-29	X	+	-	+	+++	+++	+++
PSI07	IV-10		++	++	+	+	+	-
MAFF301558	IV-8		-	-	-	-	-	-
ACH732	IV-11		+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> HT: trial at temperature 25-30°C ± 2°C (hot temperature) repeated twice; CT: trial at temperature 15°C-24°C ± 2°C (cooler temperature).

<sup>b</sup> Bacterial wilt scale for susceptible host of each species over 10 plants for each trial : (-) no symptom, (+) 1 to 4 wilted plants, (++) 5 to 8 wilted plants and (+++) 9 to 10 wilted plants.

1) and 38 additional *egl* sequences from *R. solanacearum* strains previously known to cover the phylogenetic diversity in this species complex. All strains in this study were deep-frozen (−80°C) at CIRAD, Saint-Pierre, Reunion Island.

**Plant material.** We established the Core-TEP as an attempt to constitute a reference collection of TEP accessions representative of genetic diversity of resistance for each of these crops (Table 3). These accessions were selected from (i) literature information; (ii) passport data in Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) genetic resource collections (information about each accession such as its name, introduction number, entry date in the collection, geographical origin, collector, and pedigree); and (iii) the expertise of H. Laterrot (INRA, France), P. Hanson (Asian Vegetable Research Development Center [AVRDC], Taiwan), and J. Scott (University of Florida) for tomato material; M.-C. Daunay (INRA, France), P. Hanson, and J.-F. Wang (AVRDC, Taiwan) for eggplant; and A. Palloix (INRA, France) and P. Gniffke (AVRDC, Taiwan) for pepper.

For tomato, a careful analysis of the scientific literature showed that the original sources of resistance were provided for only approximately half of the breeding lines mentioned for their high resistance level. Few sources of resistance, mostly accessions of *Solanum pimpinellifolium* and of *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, are at the origin of most material resistant to bacterial wilt. Further, given the active exchange of material between breeders from the 1950s onwards, the breeding lines created at U.S. Universities (North Carolina, Hawaii, and Puerto Rico); INRA (Guadeloupe); the University of the Philippines (College of Agriculture), Los Banos; and, later, AVRDC (Taiwan), are genetically related, and their resistance partly originates from the same sources of resistance (6,11,15,18,55) (Fig. 2). However, because of the complex interaction between resistance

sources and strains, the use of this relatively narrow genetic basis for resistance in different environments and toward various strains suggests that a diversity of genetic resistance factors may have been bred for in the different national programs. In all, 8 of 10 tomato accessions were chosen according to their resistance to *R. solanacearum* as reported in the literature (Fig. 2). L390 was chosen as susceptible control. Finally, Okitsu Sozai no. 1 was chosen for three reasons: (i) its high level of resistance toward another bacterial and vascular disease induced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, synonym of *Corynebacterium michiganense* (44); (ii) its expected resistance to bacterial wilt, because this resistance is often associated with the resistance to bacterial canker (38,46–48); and (iii) because the origin of its resistance to bacterial canker originates from *L. hirsutum* var. *glabratum* PI 134418 (44) (i.e., from a wild source not represented in the pedigree of the other lines of Core-tomato).

For eggplant and pepper, breeding efforts have remained much more localized and pedigree information on resistant material is scarce. For accessions of both species, each distinct geographical origin can be putatively associated with a different resistance origin. The accessions were chosen within national (INRA) or international (AVRDC) germplasm collections and also within breeding material of both institutes, on the basis of their resistance in local conditions, their pedigree, or their geographic origin.

Among the nine chosen eggplant lines (Table 3), five originate from Asia (India, Sri Lanka, Indonesia, and Japan), where bacterial wilt is common. One of them, MM152 from Sri Lanka, is the source of resistance of the 1970s West Indies commercial hybrid F1 Kalenda (12). Two other lines are INRA breeding material created in Guadeloupe by G. Ano in the 1980s and accumulate resistance from different sources. The line MM931 was obtained by recurrent selection and includes in



**Chapitre 1. Table 3.** Genetic resources in tomato, eggplant and pepper that constitute the Core-TEP collection

Code	Accession	Alternative name	Species	Seed source <sup>a</sup>
<u>Tomato</u>				
T1	CRA66		<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	INRA
T2	Okitsu Sozai n°1		<i>S. lycopersicum</i>	INRA
T3	NC 72 TR 4-4		<i>S. lycopersicum</i>	INRA
T4	IRAT L3		<i>S. lycopersicum</i>	INRA
T5	Hawaii 7996		<i>S. lycopersicum</i>	INRA
T6	TML46		<i>S. lycopersicum</i>	AVRDC
T7	CLN1463		<i>S. lycopersicum</i>	AVRDC
T8	R3034		<i>S. lycopersicum</i>	AVRDC
T9	L285		<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	AVRDC
T10	L390		<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	AVRDC
<u>Eggplant</u>				
E1	MM853	Dingras multiple purple	<i>S. melongena</i>	INRA
E2	MM643	SM6	<i>S. melongena</i>	INRA
E3	MM152	Ceylan, SM164	<i>S. melongena</i>	INRA
E4	EG203	Surya	<i>S. melongena</i>	AVRDC
E5	MM931	AG91-01, RFM07-04	<i>S. melongena</i>	INRA
E6	MM960	AG91-25, SD20	<i>S. melongena</i>	INRA
E7	MM195		<i>S. linneanum</i>	INRA
E8	MM738		<i>S. melongena</i>	INRA
E9	S56B	Terong Bulat Hijau	<i>S. melongena</i>	AVRDC
E10	MM136	Florida Market	<i>S. melongena</i>	INRA
<u>Pepper</u>				
P1	PM1443	Narval	<i>C. annuum</i>	INRA
P2	PM687	PI322719	<i>C. annuum</i>	INRA
P3	PM1022	Cristal Blanco, Pen 79	<i>C. baccatum</i>	INRA
P4	PM702	CM334	<i>C. annuum</i>	INRA
P5	0209-4	BC3F5[ <i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i> ]	<i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i>	AVRDC
P6	PBC631A	CA8	<i>C. annuum</i>	AVRDC
P7	PBC66	MC4	<i>C. annuum</i>	AVRDC
P8	PM659	Perennial	<i>C. annuum</i>	INRA
P9	PBC384		<i>C. annuum</i>	AVRDC
P10	Yolo Wonder		<i>C. annuum</i>	INRA

<sup>a</sup> INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, France ; AVRDC : Asian Vegetable Research Development Center, Taiwan.

its pedigree five Asian resistant *S. melongena* lines: MM120 (China), MM165 and MM415 (Philippines), MM412 (Japan), and MM413 (from Borneo) (2,3) The pedigree of the line MM960 includes one resistant *S. melongena* line, MM127 from Turkey, and the resistant *S. aethiopicum* Aculeatum group, MM134 (2,3). Finally, the two parental lines of the eggplant reference map (19), *S. linnaeanum* MM195 and *S. melongena* MM738 (a Dutch breeding line), were included in the eggplant core collection to facilitate potential mapping of resistance factors in case one of the parents carried resistance to bacterial wilt. MM136 (Florida Market) was chosen as susceptible control.

The pepper core collection was composed of nine resistant accessions belonging to three different *Capsicum* spp.: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, and *C. chinense*. Eight of these accessions are landraces from distinct geographic origins; namely, Asia (PM659, PM687, PM1443, PBC631A, PBC66, and PBC384) and central (PM702) and South America (PM1022), and belong to different cultivar types and distinct gene pools, hence minimizing the probability of shared ancient pedigree (65). One AVRDC accession, 0209-4, originates from an interspecific cross aimed at introgressing the resistance of *C. chinense* into *C. annuum*. Three of these resistant pepper accessions (PM659, PM687, and PM702) as well as the susceptible control (Yolo Wonder) are parental lines of mapping populations (49).

Thus, the Core-TEP was composed of 24 accessions recognized as carrying genetic resistance to bacterial wilt; one tomato line resistant to bacterial canker; three lines, one per crop, used as susceptible controls; and the two parents of the eggplant reference genetic map (Table 3). Seed for Core-TEP were maintained, produced, and provided by INRA and AVRDC. For convenience, the TEP accessions were encoded as T1–T10 for tomato, E1–E10 for eggplant, and P1–P10 for pepper (Table 3).

**Virulence assays.** Bacterial wilt resistance was assessed in climatic growth chambers (Rotoplan) that accommodated 900 plants, with an average relative humidity of 80%, a 12-h photoperiod, and 25 to 30 ± 2°C night and day temperatures, respectively. Strains previously assigned to a phylogenetic group present in Reunion Island were tested under routine security norm level (NS2). Strains assigned to a phylogenetic group absent from Reunion Island were considered exotic and tested under high quarantine security norm level (NS3). *R. solanacearum* strains were routinely grown at 30°C on Kelman's triphenyltetrazolium chloride (TZC) solid medium complemented with 0.5 g of yeast extract (41). Inoculum consisted of bacterial cells harvested from 48-h-grown culture plates by flooding with 10 ml of Tris buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis). The concentration of each bacterial suspension was determined by measuring the optical density (600 nm) and adjusted to 108 CFU ml<sup>-1</sup>. For each test in the growth chamber, 30 plantlets of each Core-TEP accession were grown in individual pots and were infected at the stage of three to four fully expanded leaves by one Core-Rs2 strain. Plants from each accession were isolated in a container and only one container per accession was allowed in the growth chamber. The containers were placed on a turntable that permitted homogeneous distribution of light and humidity for the plants in the growth chamber.

Disease development was visually assessed weekly, by scoring each plant as asymptomatic (no symptoms), wilted (at least one leaf wilted), or dead (all leaves wilted). Four weeks after inoculation, the asymptomatic plants were sampled and analyzed for latent infection by *R. solanacearum*. Stem sections of approximately 2 cm in length were sampled at the base of the stem, and then transferred to 5 ml of Tris buffer. Stem sections were stored for 1 to 2 h at room temperature to allow bacteria to stream out of the xylem vessels. An aliquot (50 µl) of

each of these extracts was streaked onto modified Granada and Sequeira selective medium plates (25,59) and incubated at 28°C for 3 to 4 days. Asymptomatic plants were scored positive for latent infection when characteristic colonies of *R. solanacearum* were unequivocally observed on the plates. Finally, each plant–strain combination could result in (i) a dead or wilted plant, (ii) an asymptomatic plant but hosting the bacteria in the stem (latently infected), or (iii) an asymptomatic plant not latently infected (healthy). For each Core-TEP–Core-Rs2 combination, variables describing the development of the disease were (i) percentage of final wilted plants and (ii) colonization index (CI) according the formula  $CI = Nwp + (Ns \times Rs)$ , where  $Nwp$  is the percentage of wilted plants;  $Ns$  is the percentage of asymptomatic plants, and  $Rs$  is the percentage of asymptomatic plants with latent infection (26,60).

**Statistics.** Data from Core-TEP–Core-Rs2 assessment were analyzed by fuzzy analysis clustering, (*fanny* function) using R statistical freeware, version 2.7.2, and *cluster* package (40,63). This nonhierarchical partitioning method groups the observations within a chosen number of clusters, which may overlap. Thus, by successive choice of a different number of clusters requested by the user, the method generates different typologies of clusters, illustrative of the phenotypic interactions. The method of cluster validation statistic (*cluster.stats* function) of the *fpc* package compares two clusterings obtained on the same dataset but differing for the number of clusters (37) in order to determine the optimal number of clusters. For this, *cluster.stats* function calculates the corrected Rand index (varying from 0 to 1). The closer the index is to 1, the better the clustering.

For clustering the strains on the basis of their resemblance and dissimilarity for aggressiveness, the whole data set of 12 individuals (strains) and 30 variables (plant

accessions) was used, with one score for each plant–strain combination calculated by fuzzy analysis. The scores were analyzed by an agglomerative hierarchical nesting classification (*agnes* function) which generates a dendrogram illustrating the strains' clustering. The *agnes* function of *cluster* package was used considering Euclidian distance and average linkage method (40). By observing the internode distance of the dendrogram or by using the corrected Rand index, we defined the optimal number of clusters of strains. These clusters of strains, obtained from the dataset of all accessions of Core-TEP, were called —pathoprofiles". The concept of pathoprofile is a working definition of a group of strains that presents similarities in their pattern of virulence to a given collection of solanaceous accessions; in this case, Core-TEP. On the other hand, in this study, we defined another concept, the —pathotype", as a group of strains showing a similar pattern of virulence on one species only: tomato, eggplant, or pepper. These patterns of virulence, pathotypes, were also determined by an agglomerative hierarchical nesting classification using the Euclidian distance and the average linkage method, based on the phenotypic scores obtained for each strain–plant interaction for one species.

## RESULTS

**Selection of strains constituting Core-Rs2.** In our experimental conditions, 17 of 33 Core-Rs1 strains of *R. solanacearum* tested (Table 1) were weakly aggressive or avirulent to TEP susceptible control lines at both temperatures. These strains were phylotype I strains CIP365, R288, PSS190, and MAFF211266; phylotype IIA strain ICMP7963; potato (IPO1609, CIP10, NCPPB3987, CIP120, and CIP239), heliconia (A3909), and banana (B34) strains in phylotype IIB; strains JT525 and J25 in phylotype III; and all phylotype IV strains



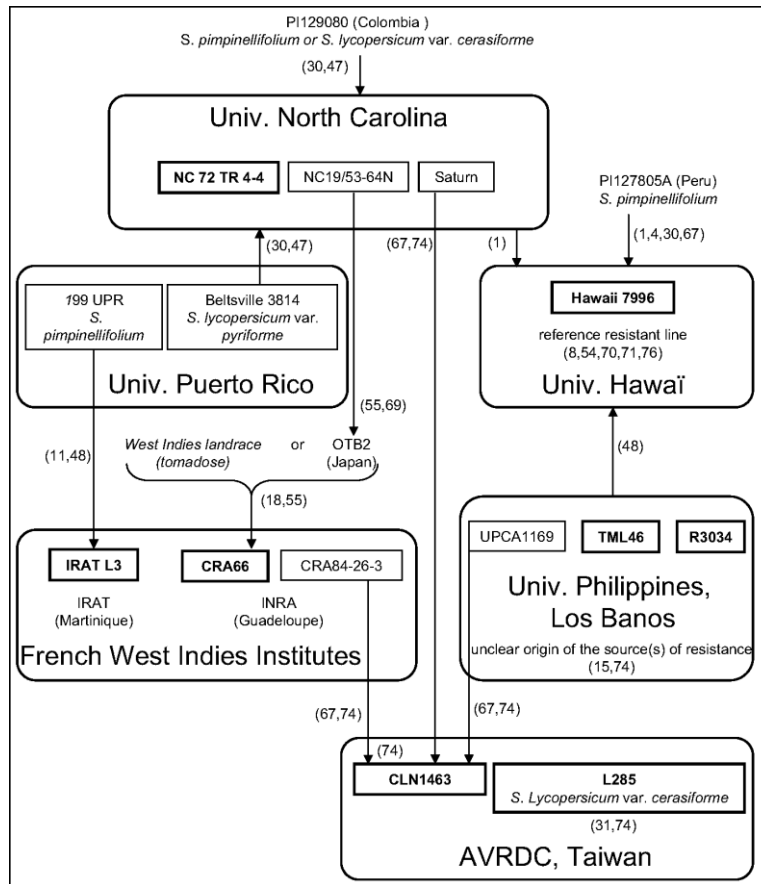
(PSI07, MAFF301558, and ACH732). However, PSI07 (phylotype IV) was able to cause bacterial wilt only on susceptible tomato at both temperatures. None of the phylotype IV strains were included in the Core-Rs2 because of a lack of knowledge about them and the large genetic diversity of this phylotype, which includes two different species of the *R. solanacearum* species complex, *R. syzygii*, pathogen of clove trees (*Syzygium aromaticum*) (61), and BDB (20,68).

The remaining 17 strains were highly aggressive to most susceptible controls of TEP. Five strains with high aggressiveness toward susceptible tomato (L390), eggplant (Florida Market), and pepper (Yolo Wonder), regardless of temperature, were selected because they belong to distinct phylogenetic groups: (i) phylotype I strains GMI1000 (I/18) and PSS4 (I/15); (ii) brown rot phylotype IIB sequevar 1 strain CMR34 (IIB/1); new pathological variant phylotype IIB sequevar 4 CFBP6783 (IIB/4NPB), which is not pathogenic to banana; and (iii) phylotype III sequevar 23 strain CFBP3059 (III/23) (Table 2). For phylotype I, three additional strains were selected: CMR134 (I/13) and PSS358 (I/15), which are avirulent at cool temperature toward susceptible tomato and pepper, respectively, and strain PSS366 (I/15), which is weakly aggressive to pepper at cool and high temperature. For phylotype II, two others strains were added: CFBP2957 (IIA/36), which was very aggressive on the three solanaceous species even though it was less aggressive toward pepper at cool temperatures, and CMR39 (IIA/41), which was a unique representative of the newly described sequevar (53) even though it was not tested in the preliminary test with the susceptible solanaceous controls inoculated by Core-Rs1 strains. For phylotype III, strains CMR15 (III/29) and CMR32 (III/29) were chosen for being weakly aggressive toward pepper and highly aggressive to tomato and eggplant, respectively, while sharing the same

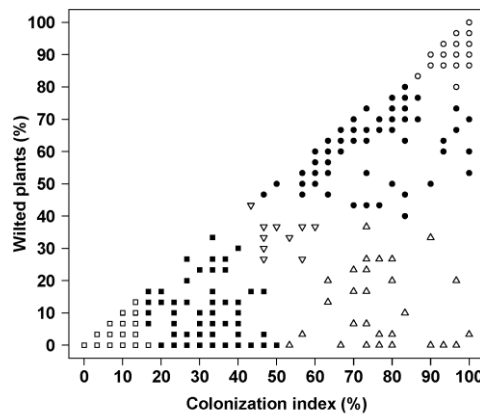
phylogenetic position in sequevar 29. These 12 *R. solanacearum* strains constituted the Core-Rs2 (Table 2).

**Typology of phenotypic interactions of Core-TEP–Core-Rs2.** Incidence of bacterial wilt (W) and CI for all 360 combinations between the 30 genetic resources and 12 strains of *R. solanacearum* were analyzed (Table 4). Susceptible controls L390 (T10), Florida Market (E10), and also MM738 (E8) were susceptible to all strains placed in Core-Rs2, except for T10 (W = 23.33%, CI = 70%) and E8 (W = 43.33%, CI = 43.33%), which displayed only a moderate susceptibility to the African phylotype III strain CMR32. The pepper control Yolo Wonder (P10) was not as good a susceptible control as T10, E10, or E8, because it was susceptible to only 5 of 12 strains of the Core-Rs2.

The clustering analysis of Core-TEP–Core-Rs2 interactions yielded five plant phenotypic groups: (i) highly resistant, (ii) moderately resistant, (iii) intermediate, (iv) moderately susceptible, and (v) highly susceptible (Fig. 3; Table 4). The phenotype defined as intermediate encompassed accession–strain combinations with biologically divergent scoring. Indeed, this cluster included two distinct subgroups. One was characterized by no or weak symptoms (low W score) although CI was high. For example, this subgroup included T9 × CFBP3059, with W = 3% and CI = 100%, and P4 × CMR34, with W = 23.33% and CI = 73.33%. The second was characterized by W and CI scores that differed by <30% from each other, such as E6 × GMI1000, with W = CI = 43.33%, or T6 × CFBP2957, with W = 30% and CI = 46.67%. These resistance phenotypes were statistically resolved by agglomerative hierarchical analysis, which clearly partitioned the combinations resulting in latent infection from those that could be considered as having partial resistance. In this way, six plant phenotypes were distinguished from the Core-TEP–Core-Rs2 interactions (Fig. 3; Table 4).



**Chapitre 1. Fig. 2.** Origin of and relationships between Core-Tomato accessions resistant to bacterial wilt. The Core-Tomato accessions used here are framed in bold. They are nested within the national programmes they originate from (University North Carolina, Univ. Puerto Rico, Univ. Hawai'i, French West Indies institutes, Univ. Philippines and AVRDC Taiwan) and which are symbolized as boxes. When known, the genitors of resistance of the Core-Tomato accessions are indicated. The figures within brackets indicate the literature references.



**Chapitre 1. Fig. 3.** Interactions observed within Core-TEP x Core-Rs2 combinations, as defined by fuzzy analysis clustering (*fanny* function of package *cluster* under R). Bioassays were performed in growth chamber (NS2-, NS3- Rotoplan), 80% RH, 25-30± 2°C and 12h photoperiod. Phenotypes were defined as highly resistant (opened squares), moderately resistant (closed squares), intermediate (triangles), susceptible (closed circles), and highly susceptible (open circles). The intermediate phenotype was partitioned into (i) partial resistant (reverse triangles), (ii) latent infections (regular triangles).

Under our severe experimental conditions, none of the Core-TEP accessions was fully resistant to all Core-Rs2 strains but a wide spectrum of high-level resistance was observed in T5, T8, E1, E2, E4, P5, P6, and P9. As expected, T2, the tomato line resistant to bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, displayed resistance toward some strains of *R. solanacearum*; however, the range of this line was narrow and did not control strains virulent on the other tomato genotypes, despite the fact that its source of resistance, *L. hirsutum* var. *glabratum*, was different. Eggplant E1 displayed the broadest resistance spectrum but was susceptible to the aggressive variant CFBP6783 (W = 63.3%, CI = 63.3%). Interestingly, although CFBP6783 totally overcame bacterial wilt resistance of all tested tomato and pepper material and most eggplant accessions, the genetic resistance carried by eggplant accessions E4 (W = 26.67%, CI = 33.33%), E5 (W = 23.33%, CI = 33.33%), and, above all, E2 (W = 0%, CI = 0%) was efficient in controlling this emerging strain. Most genetic resources were resistant to strains CFBP2957 and CMR32, because these strains were virulent only to T10 and E8, and E8, E10, and P2, respectively.

**Pathoprofiles.** Interaction scores reported for Core-TEP–Core-Rs2 combinations were computed by using agglomerative hierarchical clustering. Six clusters of strains, defined on the basis of their pattern of virulence on Core-TEP, which we named “pathoprofiles,” (profile) were statistically identified: (i) pathoprofile a, containing strains GMI1000 and CMR134; (ii) pathoprofile b, with only CFBP3059; (iii) pathoprofile c, with CFBP2957, CMR32, and CMR39; (iv) pathoprofile d, with PSS366 and PSS358; (v) pathoprofile e, with PSS4, CMR34, and CMR15; and (vi) pathoprofile f, with CFBP6783 (Table 4).

Pathoprofiles a and d clustered strains from phylogroup I. The other strains clustered in

different pathoprofiles regardless of their phylogroup; for example, pathoprofiles c and e grouped strains of phylogroups II and III, and phylogroups I, II, and III, respectively.

The least aggressive group of strains was unified within pathoprofile c; indeed, strains CFBP2957, CMR32, and CMR39 wilted <5 of the 30 accessions of Core-TEP (Table 4). Pathoprofile f included only strain CFBP6783, an emerging pathogenic variant of Martinique, French West Indies (77), the high aggressiveness of which is demonstrated by the wilting of 26 of 30 Core-TEP accessions. Strains in pathoprofile e (PSS4, CMR34, and CMR15) wilted all genetic resources tested in tomato. Pathoprofiles e and f are distinguished by their interaction scores for pepper, because pathoprofile f (CFBP6783) was highly aggressive on all pepper accessions compared with pathoprofile e. This is especially true considering the disease scores for accessions P5, P6, P7, and P9 (W = 66 to 100 versus 0 to 3.3% and CI = 63.3 to 100 versus 0 to 56.7%). Strains in pathoprofile a (GMI1000 and CMR134) were virulent to neither tomato T5–T9 nor eggplant E1–E4. Strains in pathoprofile d (PSS366 and PSS358) were virulent to most tomato lines, variable in aggressiveness to eggplant lines, and avirulent to most pepper accessions (no wilt and no latent infection).

**Pathotypes.** Additional clusterings that we named pathotypes (type) were computed according to interaction scores sorted by plant species instead of being analyzed for the whole Core-TEP, as previously.

For tomato, five pathotypes, encoded type T-1 to type T-5, were identified. Strains in type T-1 (CFBP2957 and CMR32) and type T-2 (GMI1000, CMR39, and CMR134) ranked the 10 tomato accessions the same way (T5 and T8 as the most resistant, then T6, and T10 and T4 as susceptible), but type T-2 was globally more aggressive than type T-1. Strains of pathotypes type T-3 (PSS358 and CFBP3059) and type T-4 (PSS366 and PSS4) were virulent on the whole tomato collection (no tomato genetic

resource was highly resistant to these), and distinguished each other by their aggressiveness to T8 (tolerant or susceptible to type T-3 and resistant to type T-4). The pathotype T-5, clustering strains CMR34, CFBP6783, and CMR15, was the most aggressive because most tomato lines were highly susceptible to this group (Table 4).

For eggplant, six pathotypes (type E-1 to type E-6) were identified, which confirmed the previous global pathoprofile clustering based on the three species, except for CMR34, which did not cluster with another strain (type E-5), and CFBP3059, which was grouped with GMI1000 and CMR134 in the pathotype type E-2 (Table 4).

For pepper, three pathotypes (type P-1 to type P-3) were identified. Strains in pathotype type P-2 either consistently established latent infections (GMI1000 and CMR34) or developed bacterial wilt (CMR134, CFBP3059, and PSS4) on pepper material P1, P2, P3, and P10. Strains with the least aggressiveness on pepper—namely, PSS366, PSS358, CFBP2957, CMR32, CMR39, and CMR15—were clustered in type P-1. The virulent emerging strain CFBP6783 constituted a separate cluster (type P-3) due to its high aggressiveness on all pepper accessions tested (Table 4).

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study investigating bacterial wilt resistance in a set of worldwide genetic resources used as sources of resistance in three solanaceous species (TEP). Resistance properties of the accessions were assessed by challenging them with strains representative of the known phylogenetic diversity of *R. solanacearum*. Thus, we tested the virulence of different strains and the response of major resistance sources. Given the origin of strains, some of these combinations may have never interacted

elsewhere and will not interact until strains or resistant material disseminated.

By assessing phenotypes on the basis of percentage of wilted plants and CI, we attempted to distinguish the two mechanisms of plant defence against bacterial wilt: plant resistance based on limitation of bacterial colonization in vascular elements (true resistance) and plant resistance based on capacity to survive despite the presence of bacteria in the vessels (latent infection). The property of true resistance, previously reported by Grimault et al. (26) for tomato, accounted for a range of interactions from partially, moderately, and highly resistant to incompatible interaction ( $W = 0\%$ ,  $CI = 0\%$ ). Such variation in disease severity was consistent with the complex, polygenic inheritance of resistance to bacterial wilt described in tomato (1,13,70), pepper (45), and, sometimes, in eggplant (14). The implications of latent infection in resistance are unclear and should be further investigated, especially in pepper. However, it is now apparent that accessions may develop no or few symptoms while being partially to highly colonized by *R. solanacearum* in the stem.

Our results showed that none of the Core-TEP accessions, representative of the TEP genetic diversity for resistance, was resistant to all Core-Rs2 strains. The absence of universal resistance is consistent with findings from Hanson et al. (30) and Wang et al. (75). Each accession displayed a specific pattern of interaction with Core-Rs2, and this strongly suggests that the mechanisms for resistance to bacterial wilt in Core-TEP differ between accessions and, thus, this specificity of resistance supports a posteriori the relevance of the choice of the accessions for constitution of the Core-TEP.

Bacterial wilt resistance (Table 4) was generally high (phenotype score encoded 1) in eggplant (36 of 120 interactions) and pepper (37 cases) but not in tomato (only 13 cases). These strong resistances showed a large



spectrum of action in pepper and eggplant, with five and four accessions, respectively, controlling more than five strains whereas, in tomato, only one accession, Hawaii 7996 (T5), proved completely resistant to more than two strains. Moreover, for eggplant, 13 accession–strain combinations resulted in avirulence with six accessions (E1, E2, E4, E5, E6, and E9) behaving as totally resistant ( $W = 0\%$ ,  $CI = 0\%$ ) toward six *R. solanacearum* strains. Incompatible interactions ( $W = 0\%$ ,  $CI = 0\%$ ) were also shown in pepper (P4–P9) after infection with six *R. solanacearum* strains, including PSS358 (phylotype I).

Incomplete and quantitative resistance (phenotype score encoded 2 and 3.1) was observed in all species, with 30 cases in tomato, 34 in eggplant, and 31 in pepper. This partial resistance displayed a broad spectrum of action because it was detected as a response to infection by all strains, except strains that overcame resistance (CFBP6783 in pepper and CFBP6783, CMR34, and CMR15 in tomato). Partial and quantitative resistance were predominant in tomato because >58% of nonsusceptible interactions in tomato were noted as moderately (score = 2) and partially (score = 3.1) resistant.

Latent infection (phenotype score encoded 3.2) was frequently observed in pepper (26 cases) as a way to resist bacterial wilt, unlike in eggplant (4 cases) and tomato (8 cases). However, in spite of high colonization by *R. solanacearum* in the stem, several pepper accessions showed no or few wilting symptoms, particularly with the strains from the type P-2 group: GMI1000 (I-1/18), CMR34 (IIB-2/1), and CMR15 (III-7/3). Thus, the ability to adapt to latent infection is not phylotype or crop specific, although it was preferentially observed in pepper, suggesting a different defence mechanism in this species. This is consistent with the results of Grimault and Prior (27), showing that the mechanisms for control of bacterial wilt in pepper may be different from those generally observed in

eggplant and tomato (i.e., the restriction of bacterial colonization to the lower part of the stem and, hence, limited wilt). In contrast, tomato and eggplant wilted as soon as bacterial populations established in the plant; in other words, latent infection was not consistently observed as a defence mechanism in these hosts.

In this study, *R. solanacearum* strains exhibited specific patterns of interaction with Core-TEP accessions. Two working concepts associated with two levels of resolution of the interactions between strains and plant phenotypes were defined. One concept, the pathoprofile, is based on the interactions for the three *Solanaceae* spp. taken together, and the other, the pathotype, is based on the interactions for each plant species taken separately. The 12 strains of Core-Rs2 clustered into six different pathoprofiles on Core-TEP and into five pathotypes on tomato, six pathotypes on eggplant, and three pathotypes on pepper.

The pathotype of a strain provides the information needed by plant breeders and geneticists for breeding resistance in a particular crop. Although all belong to the family *Solanaceae* and are genetically related, tomato, eggplant, and pepper interacted differently with the strains of Core-Rs2, as reflected by the different number of pathotypes for each species. This was also reported by AVRDC studies on aggressiveness of *R. solanacearum* strains to tomato and pepper species, which described five pathotypes in tomato (72) and four pathotypes in pepper (73). The number of pathotypes that can be defined on each crop species is, of course, dependent on the *R. solanacearum* strains used, the degree to which they represent the bacterium's genetic diversity, the solanaceous accessions used, and the variables used for describing the disease.

In our study, pathotypes ranked from least (type 1) to most aggressive to tomato (type T-5) and pepper (type P-3). The virulence tests

on tomato and pepper clustered the accessions into two groups: resistant accessions (T5–T9 and P5–P9) and susceptible accessions (T1–T4 and T10 and P1–P4 and P10) (data not shown). The situation differed in eggplant because virulence traits of strains in pathotype E could not be clearly ranked and, conversely, the eggplant accessions did not cluster in response to a global phenotype of strains. Knowledge of pathotype identity of the pathogen population present in a particular cultivation area will be helpful for (i) deploying cultivars possessing the relevant resistance background and (ii) improving breeding strategies for creating new material recombining the appropriate resistance factors.

Strain pathoprofile is a working definition to conceptualize the way a similar virulence pattern carried by different strains of *R. solanacearum* may mirror their coevolution with solanaceous crops that share intergenomic synteny (19,78,79). The pathoprofile concept provides general information on the virulence traits shared by strains differing in their phylogenetic and phylogeographic background. This information may be of great value to plant breeders working on global improvement of bacterial wilt resistance of TEP as well as to plant geneticists who are unravelling the underlying resistance mechanisms. Currently, Core-TEP is being field tested in different geographical locations as a validation of the predictability of the local *R. solanacearum* population pathoprofile.

The concepts of pathoprofiles and pathotypes described in this study, together with recent results on bacterial gene content (core- and variable-genome) as revealed by pangenomic comparative hybridization (29), and biological mining of available genomes of the *R. solanacearum* species complex (28,64,66) should further our understanding of bacterial speciation. In addition, incompatible interaction and latent infection may be good models to be used in comparative genomics for identifying bacterial gene repertoires

associated with these phenotypes. Our results and the new concepts proposed here should be invaluable tools for suggesting new research directions for mapping the plant genetic factors involved in resistance to bacterial wilt, especially in eggplant and pepper. For mapping resistance factors, the phenotypes of the parents of the mapping population must be as phenotypically different as possible.

Interestingly, strains in Core-Rs2 distributed, independently of phylotypes, into pathoprofiles and into pathotypes on TEP, except for pathoprofiles a and d and pathotypes type T-4 and type E-3. Hence, virulence patterns are generally not phylotype specific, although phylotype-specific resistance QTLs were identified by Carneille et al. (8) on the basis of two strains belonging to two phylotypes. Phylotype classification is indicative of the evolutionary past of the organism (9,10,22) because it was established from sequence variations observed in different housekeeping genes. Thus, it is not surprising that phylotypes do not relate to pathogenicity and virulence. In fact, this has already been reported for a population of *R. solanacearum* collected from tomato production fields in Taiwan (39). Consequently, our pathoprofiles emerge from different phylogenetic lineages of the *R. solanacearum* species complex. Meanwhile, strains assigned to phylotypes I, III, and IIB also assigned to pathoprofiles d, e, and f and to pathotypes type T-5, type E-6, and type P-3, respectively, with high virulence patterns.

Extreme aggressiveness was demonstrated for strain CFBP6783, a representative of a virulent variant emerging in Martinique (77), because this strain overcame resistance of 26 of 30 genetic resources tested. No resistance carried by tomato or pepper accessions was effective for controlling it; however, resistance was found in four eggplant accessions. This strain lineage is also highly aggressive to *Anthurium*, *Heliconiaceae*, and *Cucurbitaceae* and is reported to cause heavy damage to

solanaceous crops (77). We identified one eggplant accession that was highly resistant to this strain, MM643 (E2), originating from India. The reason why resistance was found in an Indian accession remains unexplained.

Virulence assays in this study deciphered plant–bacteria interactions that resulted from infection with high inoculum pressure and plant growth in an artificially controlled environment. In these experimental conditions, we determined that absence of symptoms can result from either true resistance or tolerance to *R. solanacearum*, depending on the accession–strain combination. This set of unique data should be considered as a starting point from which clear-cut scientific models for studying compatible and incompatible interactions in this pathosystem may be easily extended. In the era of biological mining, genomics, and post genomics, such models will allow straightforward investigation of what makes *R. solanacearum* so difficult to control on a long-term basis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Asian Vegetable Research Development Center (AVRDC)–The World Vegetable Center for sharing and multiplying plant materials used in this study; J. M. Baptiste, J. J. Cheron, and S. Lebon for providing technical assistance; S. Jégo for providing statistical assistance; and De Ruiters Seeds, Enza Zaden, Gautier Semences, Nunhems, Rijk Zwaan, and Vilmorin for financial support for this work. The European Regional Development Funds (ERDF) of the European Union, Conseil Régional de la Réunion also provided financial support as part of Gentom programme.

#### LITERATURE CITED

1. Acosta, J., Gilbert, J., and Quinon, V. 1964. Heritability of bacterial wilt resistance in tomato. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 84:455-461.
2. Ano, G., Hébert, Y., Prior, P., and Messiaen, C. M. 1991. A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L. x *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11:555-560.
3. Ano, G., Prior, P., Manyri, J., and Vincent, C. 1990. Stratégies d'amélioration de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) pour la résistance au flétrissement bactérien causé par *Pseudomonas solanacearum* E.F.S. *Journ. Maraîchères CIRAD-ORSTOM-INRA*:570-579.
4. Balatero, C. H., and Hautea, D. M. 2001. Identification of AFLP and RGA markers associated with bacterial wilt resistance QTL derived from tomato *Lycopersicon pimpinellifolium*. Pages 225-243 in: *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*. R. G. van den Berg, G. W. M. Barendse, G. M. van der Weerden, and C. Mariani, eds. Nijmegen University Press.
5. Balatero, C. H., Hautea, D. M., Narciso, J. O., and Hanson, P. M. 2005. QTL mapping for bacterial wilt resistance in Hawaii 7996 using AFLP, RGA, and SSR markers. Pages 301-307 in: *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
6. Buddenhagen, I., and Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2:203-230.
7. Buddenhagen, I., Sequeira, L., and Kelman, A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. (Abstr.) *Phytopathology* 52:726.
8. Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113:110-121.
9. Cook, D., Barlow, E., and Sequeira, L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2:113-121.
10. Cook, D., and Sequeira, L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum**. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.

## Chapitre 1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de *Ralstonia solanacearum*

11. Daly, P. 1976. —*IA-T L3*” une nouvelle variété de tomate combinant plusieurs résistance aux maladies. *Agron. Trop.* 31:398-402.
12. Daly, P. 1986. L'implantation de l'aubergine aux Antilles ou la nécessaire adaptation du matériel végétal à des problèmes sanitaires. *Bull. Tech. Inf.* 409/411:453-457.
13. Danesh, D., Aarons, S., McGill, G. E., and Young, N. D. 1994. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:464-471.
14. Daunay, M. C. 2008. Eggplant. Pages 163-220 in: *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae.* J. Prohens and F. Nuez, eds. Springer, New York.
15. Deanon, J. R., Jr. 1988. Biochemical bases of screening tomato for bacterial wilt resistance. Pages 83-99 in: *Current Problems on Fruits and Vegetables.* Philippines Council for Agriculture Forestry and Natural Resources Research and Development, Los Banos, Laguna, Philippines.
16. Deberdt, P., Quénéhervé, P., Darrasse, A., and Prior, P. 1999. Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. *Plant Pathol.* 48:408-414.
17. Denny, T. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644 in: *Plant-Associated Bacteria.* S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
18. Digat, B., and M., Derieux. 1968. A study of the varietal resistance to bacterial wilt. Pages 95-101 in: *Proc. Caribbean Food Crops Soc. 6th Annu. Meet.* St. Augustine, Trinidad.
19. Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M. C., Lester, R. N., and Tanksley, S. 2002. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the *Solanaceae*. *Genetics* 161:1697-1711.
20. Eden-Green, S. J. 1994. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria in South East Asia: New direction for moko disease. Pages 25-34 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Organism, Pseudomonas solanacearum.* A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
21. Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages 9-28 in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex.* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
22. Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”. Pages 449-461 in: *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex.* C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
23. Fegan, M., and Prior, P. 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathol.* 35:93-101.
24. Gillings, M. R., and Fahy, P. 1994. Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum.* A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
25. Granada, G., and Sequeira, L. 1983. A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67:1084-1088.
26. Grimault, V., Anais, G., and Prior, P. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol.* 43:663-668.
27. Grimault, V., and Prior, P. 1994. Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: a comparative study. *Eur. J. Plant Pathol.* 100:259-267.
28. Guidot, A., Elbaz, M., Carrère, S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Prior, P., and Boucher, C. 2009. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99:1105-1112.
29. 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. *J. Bacteriol.* 189:377-387.
30. Hanson, P. M., Licardo, O., Hanudin, Wang, J. F., and Chen, J. T. 1998. Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis.* 82:74-78.
31. Hanson, P. M., Wang, J. F., Licardo, O., Hanudin, Mah, S. Y., Hartman, G. L., Lin, Y. C.,

- and Chen, J. T. 1996. Variable reactions of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. *HortScience* 31:143-146.
32. Hanudin, and Hanafiah Gaos, M. A. 1993. Screening of eggplant accessions for resistance to bacterial wilt. Pages 191-192 in: *Bacterial Wilt*. ACIAR Proc. No. 45. G. L. Hartman and A. C. Hayward, eds. ACIAR, Canberra, Australia.
33. Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.
34. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:67-87.
35. Hayward, A. C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 9- 24 in *Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. A. C. Hayward and G. L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
36. He, L. Y., Sequeira, L., and Kelman, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
37. Hennig, C. 2007. fpc: Fixed point clusters, clusterwise regression and discriminant plots. R package, version 1.2-3. <http://www.homepages.ucl.ac.uk/~ucakche>.
38. Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., and Eichenlaub, R. 2000. The endo- $\beta$ -1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:703-714.
39. Jaunet, T. X., and Wang, J. F. 1999. Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-327.
40. Kaufman, L., and Rousseeuw, P. J., eds. 1990. *Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis*. Wiley, New York.
41. Kelman, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695.
42. Kelman, A. 1998. One hundred and one years of research on bacterial wilt. Pages 1-5 in: *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer.
43. Krausz, J. P., and Thurston, H. D. 1975. Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato. *Phytopathology* 65:1272-1274.
44. Kuriyama, T., and Kuniyasu, K. 1974. Studies on the breeding of disease resistant tomato by interspecific hybridization. III. On the breeding of a new tomato line resistant to bacterial canker caused by *Corynebacterium michiganense*. *Bull. Veg. Ornamental Crops Res. Stn. Ser. A* 1:93-107.
45. Lafortune, D., Bérémis, M., Daubèze, A.-M., Boissot, N., and Palloix, A. 2005. Partial resistance of pepper to bacterial wilt is oligogenic and stable under tropical conditions. *Plant Dis.* 89:501-506.
46. Laterrot, H. 1999. Resistance to bacteria in tomato. Pages 103-110 in: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance*. G. T. Scarascia Mugnozza, E. Porceddu, and M. A. Pagnotta. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
47. Laterrot, H., Brand, R., and Daunay, M. C. 1978. La résistance à *Corynebacterium michiganense* chez la tomate. *Ann. Amélior. Plant.* 28:579-591.
48. Laterrot, H., and Kaan, F. 1978. Resistance to *Corynebacterium michiganense* of lines bred for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Rep. Tomato Genet. Coop.* 28.
49. Lefebvre, V., Pflieger, S., Thabuis, A., Caranta, C., Blattes, A., Chauvet, J. C., Daubeze, A. M., and Palloix, A. 2002. Towards the saturation of the pepper linkage map by alignment of three intraspecific maps including known-function genes. *Genome* 45:839-854.
50. Li, H. P., Goth, R. W., and Barksdale, T. H. 1988. Evaluation of resistance to bacterial wilt in eggplant. *Plant Dis.* 72:437-439.
51. Lopes, C. A., and Boiteux, L. S. 2004. Biovar-specific and broadspectrum sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in *Capsicum*. *Crop Breed. Appl. Biotechnol. (Brazil)* 4:350-355.
52. Lopes, C. A., Carvalho, S. I. C., and Boiteux, L. S. 2006. Prevalence of biovar 3 on bell peppers in Brazil and identification of biovar-specific response to *Ralstonia solanacearum* in *Capsicum*

## Chapitre 1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de *Ralstonia solanacearum*

- germplasm. Paper read at 4th Int. Bacterial Wilt Symp. York, UK.
53. Mahbou Somo Toukam, G., Cellier, G., Wicker, E., Guilbaud, C., Kahane, R., Allen, C., and Prior, P. 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Dis.* 93:1123-1130.
54. Mangin, B., Thoquet, P., Olivier, J., and Grimsley, N. H. 1999. Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151:1165-1172.
55. Messiaen, C. M., Laterrot, H., and Kaan, F. 1978. Cumulate resistances to *Pseudomonas solanacearum* and to *Meloidogyne icognita* with determinate growth in tomato. Pages 48-51 in: *Vegetables for the Hot Humid Rropics*. Mayaguez Institute of Tropical Agriculture, Puerto Rico.
56. Pegg, K. G., and Moffett, M. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 11:696-698.
57. Peter, K. V., Gopalakrishnan, T. R., Rajan, S., and Sadhan Kumar, P. G. 1993. Breeding for resistance to bacterial wilt in tomato, eggplant and pepper. Pages 183-190 in: *Bacterial Wilt*. ACIAR Proc. No. 45. G. L. Hartman and A. C. Hayward, eds. ACIAR, Canberra, Australia.
58. Poussier, S., Prior, P., Luisetti, J., Hayward, C., and Fegan, M. 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:479-486.
59. Poussier, S., Vandewalle, P., and Luisetti, J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2184-2194.
60. Prior, P., Bart, S., Leclercq, S., Darrasse, A., and Anais, G. 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathol.* 45:720-726.
61. Prior, P., and Fegan, M. 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. Pages 127-136 in: *Proc. First Int. Symp. Tomato Dis.* M. T. Momol, P. Ji, and J. B. Jones, eds. Acta Horticulturae, Orlando, FL.
62. Rahman, M. A., Abullah, H., and Vanhaecke, M. 1999. Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *J. Phytopathol.* 147:129-140.
63. R Development Core Team. 2008. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
64. 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., Medigue, C., and Prior, P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:379.
65. Sage-Palloix, A. M., Jourdan, F., Phaly, T., Nemouchi, G., Lefebvre, V., and Palloix, A. 2007. Structuring genetic diversity in pepper genetic resources: distribution of horticultural and resistance traits in the INRA pepper germplasm. Pages 33-42 in: *Progress in Research on Capsicum and Eggplant*. K. Niemirowicz-Szczytt, ed. Warsaw University of Life Sciences Press, Warsaw.
66. Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J. C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguiet, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C. A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502.
67. Scott, J. W., Wang, J. F., and Hanson, P. M. 2005. Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. Pages 161-172 in: *Proc. First Int. Symp. Tomato Dis.* M. T. Momol, P. Ji, and J. B. Jones, eds. International Society Horticultural Science, Brugge, Belgium.
68. Seal, S. E., Jackson, L. A., Young, J. P. W., and Daniels, M. J. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide

- primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. J. Gen. Microbiol. 139:1587-1594.
69. Suzuki, I., Sugahara, Y., Kotani, A., Todaka, S., and Shimada, H. 1964. Studies on breeding eggplants and tomatoes for resistance to bacterial wilt. I. Investigations on method of evaluating the resistance and on the source of resistance in eggplants and tomatoes. Bull. Hort. Res. Stn. Ser. A 3:77-106.
70. Thoquet, P., Olivier, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Laterrot, H., and Grimsley, N. 1996. Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:826-836.
71. Thoquet, P., Oliver, J., Sperisen, C., Rogowsky, P., Prior, P., Anaïs, G., Mangin, B., Bazin, B., Nazer, R., and Grimsley, N. 1996. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. Mol. Plant-Microbe Interact. 9:837-842.
72. Wang, J. F. 2001. Variation of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from tomato plants in Indonesia, Philippines, and Taiwan. In: AVRDC Report 2000. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan.
73. Wang, J. F. 2004. Characterization of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from pepper in Taiwan. In: AVRDC Report 2003. AVRDC-The World Vegetable Center, Shanhua, Taiwan.
74. Wang, J. F., Chen, J. T., and Li, H. M. 1998. Resistance sources to bacterial wilt in eggplant (*Solanum melongena*). Pages 284-289 in: Bacterial Wilt Disease—Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.
75. Wang, J. F., Hanson, P., and Barnes, J. A. 1998. Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato. Pages 269-275 in: Bacterial Wilt Disease—Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. G. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.
76. Wang, J. F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N. H. 2000. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. Mol. Plant-Microbe Interact. 13:6-13.
77. 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. Appl. Environ. Microbiol. 73:6790-6801.
78. Wu, F., Eannetta, N. T., Xu, Y., Durrett, R., Mazourek, M., Jahn, M. M., and Tanksley, S. D. 2009. A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 118:1279-1293.
79. Wu, F. N., Eannetta, N. T., Xu, Y. M., and Tanksley, S. D. 2009. A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. Theor. Appl. Genet. 118:927-935.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

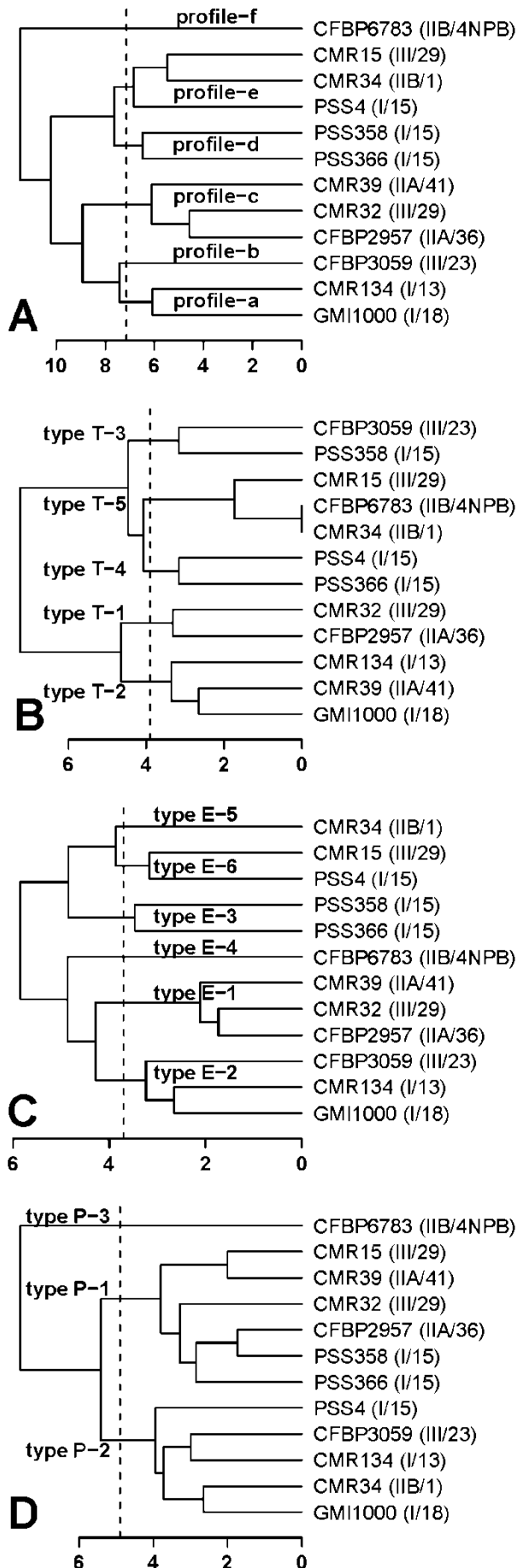
**Supplemental Table 1.** Characteristics of additional *Ralstonia solanacearum* strains used in this study.

Strain <sup>a</sup>	Alternative name <sup>a</sup>	Host	Origin	Phylotype - Sequevar	GenBank <sup>b</sup>
GMI8044	RUN585	<i>Musa</i>	Grenada	IIA-6	GU295013
UW181	RUN454, CFBP6438, JT649	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i>	Venezuela	IIA-6	GU295053
CFBP2972	RUN30, MPT1, JS734	<i>Solanum tuberosum</i>	Martinique	IIA-35	AF295264
CIP301	RUN45, R311	<i>Solanum tuberosum</i>	Peru	IIA-35	GU295003
RF38	RUN549	<i>Solanum lycopersicum</i>	Trinidad	IIA-37	EU726832
CFBP2958	RUN28, GT4, JS728	<i>Solanum lycopersicum</i>	Guadeloupe	IIA-39	AF295266
CMR121	RUN203, CFBP7054	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroon	IIA-52	EF439725
IBSBF1900	RUN301	<i>Musa</i> sp.	Brazil	IIA-24	EF371839
CFBP6779	RUN288, CIR02-174(1)	<i>Canna indica</i>	Martinique	IIA-38	EF371835
T1-UY	RUN448	<i>Solanum lycopersicum</i>	Uruguay	IIA-50	GU295049
CFBP2047	RUN65, K60, UW25, JR659	<i>Solanum lycopersicum</i>	United-States	IIA-7	AF295262
CIP232	-	<i>Solanum tuberosum</i>	Chile	IIB-2	EF647734
CIP240	RUN482, R330	<i>Solanum tuberosum</i>	Brazil	IIB-26	EF647739
IBSBF1712	RUN299	<i>Pelargonium asperum</i> x <i>hortorum</i>	Brazil	IIB-27	EF371833
UW163	RUN586, S256, GMI8235	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i>	Peru	IIB-4	GU295052
UW70	RUN99, CIP70, S210	<i>Musa acuminata</i> x <i>Musa balbisiana</i>	Colombia	IIB-4	DQ011550
CFBP7014	RUN297, CIR06-024	<i>Anthurium andreanum</i>	Trinidad	IIB-51	EF371831
CIP418	RUN265, Moh6	<i>Arachis hypogaea</i>	Indonesia	IIB-3	GU295005
Molk2	RUN74	<i>Musa</i> sp.	Philippines	IIB-3	EF371841
NCPBP1018	RUN479, JS950	<i>Solanum tuberosum</i>	Angola	III-21	AF295271
NCPBP332	RUN1298, JS949	<i>Solanum tuberosum</i>	Zimbabwe	III-22	AF295276
NCPBP342	RUN76, JS952	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zimbabwe	III-20	AF295278
CMR66	RUN166, CFBP7038	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Cameroon	III-49	EF439729
DGBBC1138	RUN362	<i>Solanum tuberosum</i>	Guinea	III-44	GU295009
DGBBC1125	RUN369	<i>Solanum tuberosum</i>	Guinea	III-43	GU295008
DGBBC1227	RUN364	<i>Solanum tuberosum</i>	Guinea	III-42	GU295011
JT519	RUN471	<i>Pelargonium asperum</i>	Reunion	I-31	GU295032
P11	RUN337	<i>Arachis hypogaea</i>	China	I-17	FJ561068
M2	RUN343	<i>Morus alba</i>	China	I-48	FJ561067
GMI8254	RUN597, TO1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Indonesia	I-47	GU295014
MAD17	RUN320	<i>Capsicum</i> sp.	Madagascar	I-46	GU295040
R292	RUN91, JT661, UW361, CIP277	<i>Morus alba</i>	China	I-12	AF295255
PSS175	-	<i>Perilla</i>	Taiwan	I-32	EU407281
PSS219	RUN257	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-34	FJ561167
PSS81	RUN258	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-14	FJ561066
O3	RUN339	<i>Olea europaea</i>	China	I-44	FJ561069
R230	RUN63, JT657 (BDB)	<i>Musa</i> sp.	Indonesia	IV-10	AF295280
R28	RUN89 ( <i>R. syzygii</i> )	<i>Syzygium aromaticum</i>	Indonesia	IV-9	DQ011552

<sup>a</sup> Abbreviations: CIP: International Potato Center, Lima, Peru; R: Rothamsted Experimental Station, Harpenden, Hertfordshire; PSS: AVRDC Collection, Shanhua, Taiwan; ACH: Hayward, Department of Microbiology, Centre for Bacterial Diversity and Identification, The University of Queensland, St Lucia Australia; UW: University of Wisconsin-Madison, USA; CFBP: Collection Française de Bactéries Phytopathogènes, Angers, France; RUN: collection at CIRAD-INRA Reunion.

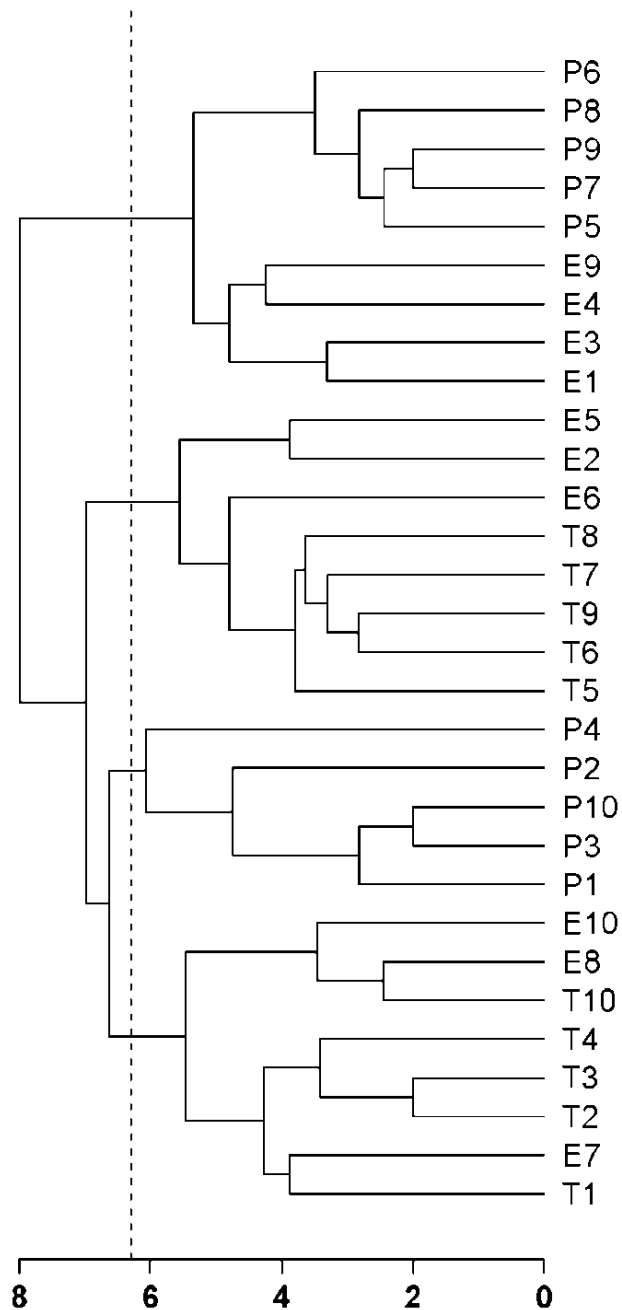
<sup>b</sup> GenBank accession numbers for partial endoglucanase gene (*egl*) sequence.





**Supplemental Figure 1.** Core-TEP x Core-Rs2 interactions unified as different pathoprofiles and pathotypes. Pathoprofiles and pathotypes were identified by agglomerative hierarchical nesting classification (*agnes* function) of package *cluster* under R with Euclidian distance and average method. **A.** Global pathoprofile on Core-TEP profile-a to profile-f; **B.** Tomato pathotype type T-1 to type T-5; **C.** Eggplant pathotype type E-1 to type E-6; **D.** Pepper pathotype type P-1 to type P-3.

**Supplemental Figure 2.** Four clusters of tomato, eggplant and pepper accessions identified from Core-TEP x Core-Rs2 interactions



Accessions were clustered by agglomerative hierarchical nesting classification (*agnes* function) of package *cluster* under R with Euclidian distance and average method.

## 2. Principales conclusions

- Le pourcentage de plante flétries et l'indice de colonisation ont permis d'identifier six niveaux d'interactions : de très résistant à très sensible,
- L'absence de résistance aux propriétés « universelles » est cohérent avec les résultats de travaux précédents (Hanson et al. 1996; Wang et al. 1998) ;
- Le mécanisme d'interaction chez le piment est probablement différent de celui de la tomate et à l'aubergine en raison du grand nombre d'infections latentes ;
- Des interactions incompatibles ( $W=0\%$  -  $CI=0\%$ ) sont présentes chez l'aubergine (13) et le piment (13) mais pas chez la tomate qui suggère l'idée de l'existence de résistance spécifique chez le piment essentiellement lors de l'interaction avec PSS358 et chez l'aubergine ;
- Les souches de *R. solanacearum* présentent des patterns spécifiques d'interaction qui sont appelés pathoprofils lorsqu'ils sont basés sur l'ensemble des accessions de la Core-TEP et pathotypes lorsqu'ils sont établis en référence à l'interaction sur une seule de ces trois espèces hôtes ;
- Les pathoprofils et pathotypes qui sont décrits intègrent des informations sur les caractères de virulence et d'agressivité de souches dont les caractéristiques phylogénétiques et phylogéographiques peuvent être distantes.

## 3. Compléments à la publication

### DÉFINITION DE CORE-TEP2

A partir des données renseignant sur l'ensemble des interactions entre la Core-TEP et la Core-Rs2, le concept de pathoprofil a été proposé comme outil de travail pour tenter de résumer la virulence et l'agressivité partagées par un groupe particulier de souches. Aussi, nous avons cherché à réduire cette collection par un souci de portabilité expérimental : Core-TEP2 est une collection plus réduite de ressources génétiques permettant d'assigner à une souche un pathoprofil. Pour cela, nous avons analysé les données Core-TEP x Core-Rs2 pour en extraire l'effectif minimum d'accessions les plus pertinentes qui expliquent la majeure partie de la variabilité phénotypique observée. Autrement dit, pour assigner la position du pathoprofil d'une souche sans avoir à expérimenter sur un corpus de 30 accessions tel que proposé avec la

Core-TEP. La fonction *catdes* de *FactoMineR* m'a permis d'identifier que les sept lignées T4, T8, E3, E4, E6, E10 et P10 contribuaient bien le plus à la structuration de cette variabilité. Il était intéressant de noter que T8 et E4 faisait partie des accessions les plus résistantes chez la tomate et l'aubergine respectivement, mais qu'aucune accession résistante de piment n'a été retenu dans cette approche statistique. Le partitionnement des souches à partir des données de ses six accessions ne permettait pas de retrouver celui observé pour les pathoprofiles comme défini à partir de la collection entière Core-TEP. C'est pourquoi des accessions supplémentaires ont été ajoutées à ces sept souches. T10 a été ajouté dans le but de disposer d'un témoin positif à la sensibilité chez la tomate. P5 a été ajouté comme témoin résistant chez le piment. T3 a été ajouté comme la dernière accession permettant de structurer le pathoprofil-e. Finalement, la Core-TEP2 héberge les accessions NC 72 TR4-4 (T3), IRAT L3 (T4), R304 (T8), L390 (T10), Ceylan (E3), Surya (E4), AG91-25 (E6), Florida Market (E10), 0209-4 (P5) et Yolo Wonder (P10). Cette définition de Core-TEP2 a cependant l'inconvénient de ne pas accueillir :

- l'accession de tomate la plus résistance, Hawaii7996 (T5) qui est un parent de la population à partir de laquelle de nombreuses études de cartographie ont été réalisées.
- l'accession d'aubergine MM643 (E2) qui présente un niveau très élevé de résistance, autrement dit elle est résistante à une large gamme de souche dont la souche très agressive phylotype IIB sequevar 4NPB, CFBP6783.
- l'accession d'aubergine MM738 (E8) qui est un parent de la population de cartographie de facteurs génétiques impliqués dans la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine (cf chapitre III).

En revanche la lignée 0209-4 (P5) est bien incluse dans Core-TEP2 bien qu'étant l'accession de piment possédant une résistance élevée à la plus grande gamme de souches. Par ailleurs cette lignée présente un faible taux de germination.

### CHOIX DE LA CORE-RS3

A partir des résultats issus des tests d'interactions Core-TEP x Core-Rs2, j'ai sélectionné un jeu de souches codé Core-Rs3 pour tenter de repérer les facteurs génétiques de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine. Les critères de sélection étaient les suivants :

- Les souches utilisées devaient être assignées au phylotype I : l'étude se limite au phylotype I car ce groupe phylogénétique est majoritairement présent dans les zones de

production en Asie (Horita and Tsuchiya 2001; Ivey et al. 2007; Jaunet and Wang 1999; Xu et al. 2009), mais aussi en Afrique (Mahbou Somo Toukam et al. 2009), aux Amériques (Ji et al. 2007; Norman et al. 2009; Sanchez Perez et al. 2008) et aux Caraïbes (Wicker et al. 2009).

- Ces souches de phylotype I devaient présenter un phénotype virulent sur le parent sensible MM738 (E8).
- Bien que la majorité de ces souches étaient parfaitement contrôlées par le parent résistant AG91-25 (E6), certaines pouvaient contourner cette résistance ce qui offrait un modèle de choix pour couvrir les différentes variations des interactions.

Les souches sélectionnées pour intégrer la Core-Rs3 sont CMR134 (phylotype I-13), PSS366 (I-15), GMI1000 (I-18), et PSS4 (I-15).

**Chapitre 2. Déterminisme génétique  
de la résistance au flétrissement  
bactérien chez l'aubergine AG91-25**

## Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

La connaissance du déterminisme génétique de la résistance, des gènes ou QTL impliqués, des marqueurs qui leur sont liés sont des préalables nécessaires pour le sélectionneur. Alors que chez la tomate, et dans une moindre mesure chez le piment, un certain nombre de recherches ont été publiées, chez l'aubergine, la résistance au flétrissement bactérien est moins décrite, que ce soit pour les facteurs génétiques impliqués, ou pour son interaction selon les souches de *R. solanacearum*. Pour analyser la résistance de cette espèce, nous avons utilisé une population de lignées recombinantes RILs F<sub>6</sub>, créée par l'INRA et issue du croisement intraspécifique *S. melongena* 'MM738' (sensible) x 'AG91-25' (résistant). Cette population, quasi fixée, offre l'avantage d'être reproductible à l'identique de façon infinie, et en conséquence de pouvoir être testée *ad libitum*, en particulier vis-à-vis d'autant de souches représentant les quatre phylotypes de la bactérie, que nécessaire. L'intérêt principal d'AG91-25 est la diversité phénotypique d'expression de sa résistance selon les souches de Core-Rs2, y compris au sein du phylotype I, sur lequel nous avons concentré nos recherches, du fait de son incidence, en termes économiques et géographiques, sur la culture de l'aubergine. Les quatre souches du phylotype I retenues (Core-Rs3) ont montré des niveaux de virulence différents en phytotron (chapitre 2). Cette gamme de souches confrontée à la résistance des RILs issues de AG91-25, est à même de révéler les gènes/QTLs en jeu, et leur caractère souche-spécifique ou généraliste (efficace quelle que soit la souche).

Au niveau méthodologique, nous avons utilisé une approche classique de génétique mendélienne basée sur les ségrégations en F<sub>2</sub> et BC<sub>1</sub>s, couplée à de la cartographie de gènes/QTLs basée à la fois sur des variables qualitatives et quantitatives. Les résultats sont assemblés dans une version avancée d'un projet d'article à soumettre à la revue TAG (Theoretical and Applied Genetics)

**Authors:** A. Lebeau, M. Gouy, M. C. Daunay, E. Wicker, P. Prior, A. Frary, J. Dintinger.

## Genetic mapping of a major dominant gene of resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant

**Abstract** Resistance of eggplant against *Ralstonia solanacearum* phylotype I strains was assessed in a F<sub>6</sub> population of recombinant inbred lines (RILs) derived from an intra-specific cross between *S. melongena* MM738 (susceptible) and AG91-25 (resistant). Resistance traits were disease score, percentage of wilted plants, and stem-based bacterial colonization index, as assessed in greenhouse experiments conducted in Réunion Island, France. Strains CMR134, PSS366 and GMI1000 were found to be controlled by resistance from AG91-25 with heritability estimates ranging from 0.75 to 0.96, depending on the strain and resistance trait. The partial resistance found against the highly virulent strain PSS4 was overcome under high inoculation pressure, with heritability estimates from 0.28 to 0.53, depending on the traits and the season. A genetic map was built with 119 AFLP, SSR and SRAP markers positioned on

18 linkage groups (LG), for a total length of 884 cM, and used for quantitative trait loci (QTL) analysis. A major dominant gene, named *ERs1*, controlled the resistance to strains CMR134, PSS366, and GMI1000. It explained 66 to 87% of the phenotypic variation, depending on the strain and resistance trait. This gene was not detected against strain PSS4; however, a significant QTL that explained up to 37.6% of phenotypic variation and was detected on another LG, was involved in the delay of the disease progress. The possible use of this major resistance gene in marker-assisted selection and the prospects offered for academic studies of a possible gene for gene system controlling resistance to bacterial wilt in solanaceous plants are discussed.

**Keywords** bacterial wilt, *Solanum melongena*, *ERs1*

A. Lebeau, M. Gouy, E. Wicker, P. Prior, J. Dintinger (✉)  
CIRAD, UMR Peuplements végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical (PVBMT), 7 chemin de l'IRAT, F-97410, Saint Pierre, La Réunion, France  
e-mail : jacques.dintinger@cirad.fr  
Phone : +262 (0) 26249 92 21 ;  
Fax : +262 (0)262 49 92 93

M.C. Daunay  
Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre d'Avignon, UR1052, Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Domaine St Maurice, BP94, F-84143 Montfavet, France

A. Frary  
Department of Molecular Biology and Genetics, Izmir Institute of Technology, Urla, Izmir, 35430, Turkey

### Introduction

The causal agent of bacterial wilt disease (BW), *Ralstonia solanacearum*, ranks among the most devastating pathogens in important agricultural solanaceous crops such as potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), pepper (*Capsicum annuum*) and tobacco (*Nicotiana* spp.) (Food and Agricultural Organization, FAO, <http://faostat.fao.org/faostat>). This bacterium has a huge host range encompassing more than 200 monocot and dicot plant species and has spread worldwide because of its capacity to



adapt to tropical, sub-tropical and temperate regions (Denny 2006; Elphinstone 2005; Hayward 1991, 1994; Kelman 1998). This soil-borne bacterium penetrates through the root system and proliferates in xylem tissue. Irreversible foliar wilting generally develops quickly, resulting in plant death. Historically, *R. solanacearum* has been classified into five races and six biovars according to host range and trophic traits, respectively (Buddenhagen et al. 1962; Hayward 1964; He et al. 1983; Pegg and Moffett 1971). More recently, phylogenetic analysis based on different molecular methods described four distinctive phylotypes that are related to the geographical origin of the strains: phylotype I (Asia), phylotype II (America), phylotype III (Africa) and phylotype IV (Indonesia) (Cook et al. 1989; Cook and Sequeira 1994; Fegan and Prior 2005). Host plant resistance to BW is a key method for controlling the disease, together with agronomic practices such as crop rotation and fallowing (Messiaen 1975; Sequeira 1962). Resistance is strongly affected by environmental factors, and more importantly, by the strain of the pathogen, which can vary among and within the different phylotypes of the bacterial complex (Lebeau et al. 2011).

So far, most studies of inheritance of BW resistance have been performed in tomato, which displays close genetic synteny with eggplant (Doganlar et al. 2002). Resistance in tomato was described as monogenic or polygenic with recessive to dominant effects, depending on the genetic material used and environmental conditions (Gonzalez and Summers 1995; Grimault et al. 1995; Hanson et al. 1996; Mohamed et al. 1997; Scott et al. 1988). Mapping studies have shown the involvement of generalist as well as strain-specific quantitative trait loci (QTLs) in *S. lycopersicum* Hawaii 7996 (Carmeille et al. 2006; Mangin et al. 1999; Thoquet et al. 1996; Wang et al. 2000). In addition, bulk segregant analysis has shown the presence of two incompletely dominant genes associated with

resistance in tomato cultivar T51A (Miao et al. 2009). In pepper, the inheritance of BW resistance in a double haploid population derived from the cross *C. annuum* var. Yolo Wonder x *C. annuum* var. PM687 was found to be polygenic (Lafortune et al. 2005). More recently, mapping studies using the same double haploid population and a recombinant inbred lines population derived from the cross Yolo Wonder x CM334, have shown the involvement of three to six QTLs with additive effects and digenic interactions (Mahbou Somo Toukam 2010).

BW resistant eggplant material has been identified in several countries, in particular India, Taiwan, and Japan (Chen et al. 1997; Hanudin and Hanafiah Gaos 1993; Li et al. 1988; Mochizuki and Yamakawa 1979; Ponnuswami et al. 1996; Rao et al. 1976; Sakata et al. 1996; Sitaramaiah et al. 1985; Wang et al. 1998). Commercial resistant cultivars have been released, but are mostly local such as the F<sub>1</sub> Kalenda in the French West Indies (Daly 1973). The genetic control of eggplant resistance to BW is described as variable along the varieties studied, but few studies involving molecular markers have been carried out to date. Nunome et al. (1998) were the first to identify two QTL involved in BW resistance of an intraspecific F<sub>2</sub> population derived from a cross between the Indian resistant accession WCGR112-8 and a breeding line EPL1. More recently, two AFLP markers linked to a single recessive gene originating from the susceptible parent 5810 (Sun et al. 2008), an AFLP marker linked to a major resistance gene from the Indonesian accession S69 (Li et al. 2006), and a RAPD marker linked to a single dominant gene from the Chinese accession E31 (Cao et al. 2009) were obtained by using bulk segregant analysis, and converted into sequence characterized amplified region (SCAR) markers. So far, few segregating populations have been used for tagging and mapping resistance genes or QTL to BW in eggplant (Fukuoka et al. 2010; Nunome et al. 1998);

**Chapitre 2. Table 1.** Characteristics of *Ralstonia solanacearum* strains used in this study. Resistance phenotypes of the parents (*S. melongena* MM738 and MM960) of RIL F<sub>6</sub> population were characterized in previous work (Lebeau et al. 2011)

Strain <sup>a</sup>	Alternative name <sup>a</sup>	Isolation host	Geographical origin	Phylotype – sequevar	Resistance phenotype <sup>b</sup>	
					MM738	AG91-25
PSS366	RUN155	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	MS	HR
CMR134	RUN215, CFBP7058	<i>Vaccinium membranaceum</i>	Cameroon	I-13	MS	MR
GMI1000	RUN54, JS753	<i>Solanum lycopersicum</i>	French Guyana	I-18	HS	PR
PSS4	RUN157, CIP410	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15	HS	HS

<sup>a</sup> Abbreviations: PSS: AVRDC Collection, Shanhua, Taiwan; CMR: Cameroon strain; RUN: collection at CIRAD-INRA Reunion, CFBP: Collection Française des Bactéries Phytopathogènes, Angers, France

<sup>b</sup> Plant phenotype : HR=highly resistant, MR=moderately resistant, PR= partially resistant, MS=moderately susceptible, HS=highly susceptible

moreover, genes or QTL associated with resistance to BW were reported against non-characterized *R. solanacearum* strains, whereas strain- and phylotype-specific QTLs were already reported on tomato. Among solanaceous-infecting *R. solanacearum* populations, phylotype I strains are the most prevalent clade found in most Asian eggplant production areas (Horita and Tsuchiya 2001; Ivey et al. 2007; Jaunet and Wang 1999; Xu et al. 2009) as well as in Africa (Mahbou Somo Toukam et al. 2009), America (Ji et al. 2007; Norman et al. 2009; Sanchez Perez et al. 2008), and the Caribbean (Wicker et al. 2009). In a previous study, we showed that phylotype I strains display different virulence patterns, called pathoprofiles, on a core collection of tomato, pepper and eggplant representative of the genetic diversity of these species for resistance (Lebeau et al. 2011).

Molecular polymorphism is low within eggplant germplasm (Nunome et al. 2001) and is consequently a major problem for building a genetic map of intraspecific segregating populations. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is a good technique for genotyping in such cases because it generates a large number of genome-wide polymorphic markers. Simple sequence repeat (SSR) markers from eggplant genic and genomic libraries are also described as polymorphic within eggplant germplasm (Nunome et al. 2009; Nunome et al. 2003a; Nunome et al. 2003b). These markers present the advantage of being often transferable between related species. Therefore, they can provide anchoring points for comparing genetic maps of eggplant and tomato.

The objectives of the present study were (i) to determine the genetic control of resistance to phylotype I *R. solanacearum* strains in an segregating population of recombinant inbred lines (RILs) derived from an intraspecific cross between resistant (AG91-25) and susceptible (MM738) eggplant lines, (ii) to map the genes or QTL controlling this resistance and (iii) to evaluate their strain-specificity for

phylogenetically related strains displaying different virulence patterns on AG91-25.

### Materials and Methods

#### Plant material

The resistance source AG91-25 (MM960) is a *S. melongena* commercial-type line adapted to the tropics, almost spineless, with dark purple fruits of intermediate shape was created at INRA (Guadeloupe). It recombines the BW resistance factors from MM127, a Turkish *S. melongena* line, and MM134, *S. aethiopicum* Aculeatum Group accession (Ano et al. 1991; Ano et al. 1990). The susceptible MM738, one of the parents of the F<sub>2</sub> mapping population that was used to establish the reference map of eggplant (Doganlar et al. 2002; Frary et al. 2003; Wu et al. 2009) is a European commercial type line, almost spineless and hairless, with globose dark purple fruits. MM738 (P1), used as female parent, was crossed to AG91-25 (P2) to generate F<sub>1</sub>, and then F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>P1 and BC<sub>1</sub>P2 generations. A population of 178 F<sub>6</sub> recombinant inbred lines (RILs) was obtained from a single F<sub>1</sub> plant by single seed descent. Additional controls used in a former study (Lebeau et al. 2011) were added: MM853 (Dingras Multiple Purple) and MM152 (Ceylan) which are resistant, and MM136 (Florida Market) and MM195 (*S. linneanum*) which are susceptible.

#### Bacterial strains

The four *Ralstonia solanacearum* strains used in this study, CMR134, PSS366, GMI1000, and PSS4, belong to phylotype I (Table 1). They were chosen according to their degree of aggressiveness on the RILs parents as evaluated in a previous study (Lebeau et al. 2011). All are highly aggressive on the susceptible parent MM738 whereas they display different levels of aggressiveness against the resistant parent AG91-25.

#### Experimental design

The RILs, parents, advanced generations and controls were planted at the experimental station of the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) in Saint-Pierre, la Réunion (lowland tropical environment, 140 m elevation, 21°S, 55.3°E). Trials with controls, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub>s generations as well as the RIL population were conducted in two greenhouses, one per replication, with a complete randomized design. Single trials were carried out at different seasons for strain CMR134 (July-August 2008, cool, wet season, 16±2/26±7°C and 90±4/71±15% relative humidity (RH), night/day respectively), strain PSS366 (September-November 2008, cool, dry season, 19±2/31±7°C and 84±6/56±16% RH), and strain GMI1000 (March-May 2009, hot, wet season, 22±3/32±7°C and 90±7/68±18% RH). Two successive trials were carried out with strain PSS4 during the cool, dry season (September-October 2009, 19±3/32±7°C and 81±6/52±16% RH) and during the hot, wet season (April-May 2010, 21±2/30±6°C and 89±4/63±17% RH). In each replication (greenhouse), five plants were grown for each RIL family, 20 plants for each control and the F<sub>1</sub>, 100 plants for the F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> generations, and 125 plants for the two parents.

#### Inoculation and disease assessment

*R. solanacearum* strains were routinely grown at 30°C on Kelman's triphenyltetrazolium chloride (TZC) solid medium complemented with 0.5 g yeast extract (Kelman 1954). Inoculum consisted of a suspension of bacterial cells harvested from 48h-old cultures by flooding plates with 10 ml of Tris buffer (Sigma, St. Louis, USA). The concentration of each bacterial suspension was determined by measuring the optical density (600 nm) and adjusted to 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>. The inoculum was prepared for each replication as follow: 2 liters of inoculum (10<sup>8</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>) were diluted to 1% so that each individual plant was infected with an average of 100-150 ml at

10<sup>6</sup> cfu.ml<sup>-1</sup>. The plants were inoculated at the 4-5 fully-expanded leaf stage with the bacterial suspension delivered through the drip irrigation system. The soil substrate was drenched with inoculum just after the plants' roots were wounded with a knife.

Disease development was assessed twice a week for six to seven weeks according to a disease scale, 0: asymptomatic plant, 1: one wilting leaf, 2: less than 50% wilted leaves, 3: more than 50% wilted leaves but asymptomatic youngest leaves, and 4: completely wilted leaves (dead plant). At each scoring date and for each control, generation and RIL, the disease score was calculated as the mean rating of all replicate plants. The proportion of wilted plants (W) was calculated for each line, parent, control and generation after scoring each plant as resistant (no symptom) or susceptible (at least one leaf wilted). The area under the disease progression curve (AUDPC) (Jeger and Viljanen-Robinson 2001) was further determined as

$$\sum_{i=1}^{n-1} \frac{X_i + X_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \times \frac{1}{t_n - t_1},$$

where  $X_i$  is the proportion of wilted plants (score) or the mean wilting symptoms rating (W) at the  $i^{\text{th}}$  date ( $i=1$  corresponds to the inoculation day),  $t_i$  was the time at the  $i^{\text{th}}$  observation, and  $n$  the total number of observations. At the end of the assay, a stem section approximately 0.5cm long was sampled at the base of each plant and transferred to 5 ml of Tris buffer. Stem sections were stored for 1-2 h at room temperature to allow bacteria to stream out of the xylem vessels. An aliquot of 50 µl from each sample was streaked onto Granada and Sequeira selective medium plates (Granada and Sequeira 1983; Poussier et al. 1999) and incubated at 28°C for 3-4 days. Stem sections from which characteristic *R. solanacearum* colonies were isolated, were scored as positive for the presence of bacteria. From these results, a colonization index (CI) was calculated:  $N_{WP} + (N_S \times R_S)$ , where  $N_{WP}$  is the percentage of wilted plants;  $N_S$ , the percentage of

symptomless plants; and  $R_S$ , the percentage of symptomless plants colonized by the bacteria (Grimault and Prior 1994; Prior et al. 1996).

### Greenhouse data analysis

Analyses of variance were conducted for each trial, each trait and each strain, and also across trials (seasons) for strain PSS4, using the Proc GLM procedure of SAS (SAS Institute 1999). An additional analysis was conducted for strain PSS4 using Proc MIX procedure with the family factor considered to be random, and replication and season to be fixed effects. For PSS4, the best linear unbiased predictors (BLUPs) (Henderson 1975) were calculated for each trait by adding the general mean of the trial to the solution of the random family effect. Broad sense heritability was calculated for each trial and across trials for PSS4 from the variance components, according to Hallauer and Miranda's formula (1981). The exact 90% confidence interval of  $h^2$  was calculated from Knapp et al. (1985).

### DNA extraction

A bulk of young leaves was collected at seedling stage from ten plants per RIL. Genomic DNA was extracted using a modified CTAB procedure (Doyle and Doyle, 1990). For each sample, 2 g of fresh leaves was ground to a fine powder in 5 ml of extraction buffer [0.35M D-Sorbitol, 5mM EDTA, 2M NaCl, 0.1M Tris, HCl (pH 8.25), 70mM sodium bisulfite (added just before use)]. Then, 5 ml of nuclear lysis buffer [1M Tris-HCl (pH 8), 0.5M EDTA (pH 8), 2M NaCl, 2% CTAB], and 2 ml of 5% sarcosyl were added. The suspension was mixed well, incubated at 65°C for 20 min followed by extraction using 15 ml of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After gentle agitation until obtaining a homogeneous mixture, the aqueous phase was separated by centrifugation (25 min, 3600 rpm, 20°C) and polysaccharides were precipitated by adding 0.35 volume of cold absolute ethanol. The

aqueous phase containing DNA was precipitated with 2/3 volume of absolute ethanol and the pellet formed was dried and washed with 2 mL of 76% ethanol and 0.2M ammonium acetate, and then resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). DNA quality was assessed by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis in comparison with a standard series of lambda DNAs. DNA concentration was evaluated by the Thermo Scientific NanoDrop® 8000 spectrophotometer (NanoDrop products, Wilmington, USA).

### Marker analysis

DNA-AFLP analysis was performed as described by Vos et al. (1995). Genomic DNA was digested with two restriction enzymes, *EcoRI* and *MseI*, and then ligated to adapters (AFLP® Core Reagent kit, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The pre-amplification reaction was performed with a pair of primers based on the adapter sequences, each having one selective nucleotide (*Eco*-A and *Mse*-C). The selective amplification of preamplified fragments was performed with eight *EcoRI* primers (Applied Biosystem) and eight *MseI* primers (GeneCust, Dudelange, Luxembourg), each with three selective nucleotides. The sequences of the 3' selective nucleotides were: *EcoRI* plus AAC, AAG, ACA, ACC, ACG, ACT, AGC, or AGG; and *MseI* plus CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG, or CTT. The 5' end of *EcoRI* primers was labelled with fluorescent dye. The PCR fragments were separated by capillary electrophoresis using an Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. The AFLP data were analysed using GelCompar II® software, version 4.6 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium). Only polymorphic AFLP bands ranging from 50 to 500 bp were scored (1 if present, 0 if absent) and analyzed. The 64 primer combinations yielded a total of 163 markers.

A large panel of 835 microsatellite (SSR) primers designed from eggplant (Nunome et al. 2009; Nunome et al. 2003a;



Stagel et al. 2008) as well as tomato sequences (SGN) was screened for polymorphism in the mapping parents. A total of 34 SSRs showing polymorphism between the two parents were used to genotype the RIL population. PCR and amplified product visualization were performed as described in Dintinger et al. (2005).

In addition, sequence-related amplified polymorphism (SRAP) screening was carried out on the parents (Budak et al. 2004), for a total of 238 primer combinations. The PCR amplification conditions were as described by Li and Quiros (2001). In addition 66 10-mer or 12-mer RAPD primers were screened on the parents. PCR amplification was carried out using a thermal cycler (9700, Applied Biosystems) with the following cycling parameters: 1 cycle at 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 40°C for 45 s, 72°C for 2 min, and final extension at 72°C for 10 min. Amplification products were separated by electrophoresis on 4.5% agarose gels, stained with ethidium bromide, and photographed under UV light.

#### Linkage map analysis

The segregation of each locus was checked for deviation from the Mendelian ratio expected for a RIL population (1:1) by standard  $\chi^2$  tests. Linkage analysis was performed using the MAPMAKER/EXP ver. 3.0b program (Lander et al. 1987). All pairs of linked markers were first identified using the `group` command  $LOD \geq 3$ ,  $r = 0.3$ . The `order` command was used to establish the framework order of markers within linkage groups (LGs) and the `ripple` command was used to verify the order. The groups that failed to find a starting order with the `order` command were analyzed using the `compare` command. Markers were retained within the framework map only if the LOD value for `ripple` command was  $\geq 3$ . All remaining markers were assigned to intervals within the framework using the `try` command. After determination of the most-likely marker order,

recombination frequencies between loci were converted into map distances in cM applying the Haldane function (Haldane 1919).

Linkages between phenotypes and genotypes: maximum likelihood method

For investigating possible linkages between polymorphic markers and the resistance phenotype, a marker by marker analysis, based on the maximum likelihood statistical method, was carried out using the qualitative data W and CI. We investigated three segregation hypotheses: (i) a single major gene for resistance (expected segregation ratio for susceptible/resistant 1:1), (ii) two (1:3) or (iii) three independent major genes (1:7) for which at least one of the genes confers the resistance phenotype.

For each of these hypotheses, the number of RILs fitting each association type between the parental allele and the disease phenotype (resistant/susceptible) was calculated. In the case of a dominant marker (M) originating from parent AG91-25 (R), (M/R) was the class of resistant lines with the dominant allele, M/S the class of susceptible lines with the dominant allele, m/R the class of resistant lines with the recessive allele and m/S the class of susceptible lines with the recessive allele. Class numbers were estimated in the same way for a dominant marker coming from parent MM738 (S) and for a codominant marker.

The likelihood law is written

as  $K \prod_{i=1}^4 x_i^{a_i}$ , with K being a constant,  $i$  the

number of marker/phenotype association types i.e. 4, ( $x_i$ ) the theoretical marker/phenotype association types, and ( $a_i$ ) the observed ones.

The maximum of this law (the maximum of likelihood) is given when its derivative equals zero. The derivative leads to an equation of the third degree of the general type:  $Ar^3 + Br^2 + Cr + D = 0$  with ( $r$ ) being the recombination frequency between the marker

**Chapitre 2. Table 2.** Estimates of means of parents, controls and MM738 x AG91-25 progenies, variance components and heritabilities for the maximum wilting percentage (W), the colonization index (CI) used to study resistance against four phylotype I strains (CMR134, PSS366, GMI1000 and PSS4) of *R. solanacearum*, and for the AUDPC of the score (SCO<sub>AUDPC</sub>) and the score at 24 day after inoculation for the season 1 (SCO<sub>24dai</sub>) used to study resistance against strain PSS4 strain

		Mean <sup>a</sup>											Variances <sup>b</sup>					
		MM738	AG91-25	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub> P1	BC <sub>1</sub> P2	MM853	MM152	MM195	MM136	F <sub>6</sub>	$\hat{\sigma}_F^2$	$\hat{\sigma}_{F \times S}^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	$\hat{h}^2$ <sup>c</sup>	Ci <sub>P=90%</sub> <sup>d</sup>	
CMR134	W (%)	86.1 (9.2)	0.2 (0.2)	0.0 (0.0)	0.5 (0.5)	2.6 (0.5)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	26.3 (26.3)	82.5 (7.5)	4.2 (0.9)	244.1***	-	31.2	0.94	-	
	CI (%)	90.6 (7.6)	1.2 (0.8)	2.5 (2.5)	2.5 (0.5)	3.6 (0.5)	1.0 (1.0)	0.0 (0.0)	2.5 (2.5)	29.0 (29.0)	95.0 (0.0)	6.0 (1.4)	292.4***	-	65.7	0.90	-	
PSS366	W (%)	90.4 (4.4)	0.0 (0.0)	0.0(0.0)	2.0 (1.0)	1.0 (1.0)	3.6 (3.6)	13.8 (2.0)	41.1 (1.1)	42.1 (5.3)	75.7 (2.1)	5.4 (1.1)	368.2***	-	31.4	0.96	-	
	CI (%)	93.1 (3.5)	5.5 (3.0)	0.0 (0.0)	6.0 (2.0)	3.5 (1.5)	6.7 (3.6)	44.6 (2.5)	67.0 (12.0)	74.7 (5.3)	94.7 (5.3)	10.3 (1.3)	472.4***	-	99.9	0.90	-	
GMI1000	W (%)	84.6 (6.2)	0.0 (0.0)	5.0 (0.0)	0.5 (0.5)	0.6 (0.6)	1.0 (1.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	45.7 (30.7)	68.9 (11.1)	4.3 (0.8)	202.4***	-	41.0	0.91	-	
	CI (%)	84.6 (5.2)	0.2 (0.2)	7.5 (2.5)	4.0 (1.0)	2.2 (1.1)	3.1 (2.1)	2.8 (2.3)	7.5 (7.5)	45.7 (30.7)	76.7 (8.3)	8.4 (1.0)	194.8***	-	127.8	0.75	-	
PSS4	S1 <sup>e</sup>	W (%)	94.6 (2.1)	49.6 (6.8)	50.0 (15.0)	61.3 (2.5)	75.4 (0.4)	57.0 (0.0)	17.5 (2.5)	2.5 (2.5)	22.5 (7.5)	70.0 (5.0)	80.7 (1.1)	92.6***	-	291.0	0.39	-
		CI (%)	98.3 (1.3)	64.3 (5.8)	65.0 (30.0)	72.8 (1.3)	84.9 (2.1)	77.5 (6.5)	25.0 (10.0)	10.0 (5.0)	35.0 (10.0)	85.0 (5.0)	87.9 (0.9)	NS	-	224.7	-	-
	SCO <sub>24dai</sub>	3.3 (0.2)	1.3 (0.3)	1.7 (0.3)	1.9 (0.1)	2.5 (0.0)	1.7 (0.1)	0.7 (0.1)	0.1 (0.1)	0.5 (0.1)	2.1 (0.3)	2.9 (0.1)	0.22***	-	0.54	0.45	-	
	SCO <sub>AUDPC</sub>	2.6 (0.1)	0.7 (0.2)	1.1 (0.2)	1.4 (0.1)	1.8 (0.0)	1.2 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.0)	2.0 (0.0)	0.14***	-	0.25	0.53	-	
S2	W (%)	96.0 (2.4)	81.2 (11.6)	94.7 (0.0)	88.2 (7.8)	97.4 (0.6)	91.4 (3.6)	7.5 (2.5)	17.5 (12.5)	42.5 (12.5)	89.6 (5.4)	90.1 (0.9)	NS	-	214.4	-	-	
	CI (%)	97.2 (2.0)	84.4 (9.2)	94.7 (0.0)	90.3 (5.7)	97.4 (0.6)	97.0 (2.0)	20.0 (10.0)	37.5 (12.5)	55.0 (10.0)	92.2 (2.8)	92.4 (0.8)	NS	-	185.5	-	-	
	SCO <sub>AUDPC</sub> <sup>f</sup>	3.0 (0.2)	2.1 (0.5)	2.8 (0.2)	2.5 (0.4)	2.9 (0.2)	2.4 (0.2)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.0)	2.0 (1.0)	2.6 (0.0)	0.04*	-	0.23	0.28	-	
Comb.	W (%)	95.3 (1.6)	65.4 (6.8)	72.4 (14.3)	74.7 (8.5)	86.4 (6.4)	74.2 (10.1)	12.5 (3.2)	10.0 (6.8)	32.5 (8.3)	79.8 (6.4)	85.4 (0.7)	NS	NS	323.9	-	-	
	CI (%)	97.7 (1.0)	74.3 (8.0)	79.9 (15.0)	81.5 (5.6)	91.2 (3.7)	86.7 (6.0)	22.5 (6.0)	23.8 (9.7)	45.0 (8.2)	88.6 (2.0)	90.1 (0.6)	NS	NS	244.4	-	-	
	SCO <sub>AUDPC</sub>	2.8 (0.2)	1.4 (0.5)	2.0 (0.5)	1.9 (0.4)	2.3 (0.3)	1.8 (0.4)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.0)	2.0 (0.0)	2.3 (0.0)	0.07*	NS	0.41	0.50	0.37-0.59	

<sup>a</sup> Standard error is given in parenthesis

<sup>b</sup>  $\hat{\sigma}_F^2$ ,  $\hat{\sigma}_{F \times S}^2$ ,  $\hat{\sigma}_e^2$ : are the respective estimates of the variances between families, of families x season interaction, of residual, respectively; all  $\hat{\sigma}_F^2$  were significant at p<0.001

<sup>c</sup>  $\hat{h}^2$ : broad-sense heritability

<sup>d</sup> Ci<sub>P=90%</sub>: 90% confidence interval of  $\hat{h}^2$

<sup>e</sup> S1: season 1, S2: season 2, Comb: combined seasons

<sup>f</sup> Analysis of variance using mix procedure for the variable SCO<sub>AUDPC</sub> at season 2

under study and the phenotype it is supposed to tag.

For  $r$  values comprised between 0 and 0.5, and the hypothesis of a single major gene,  $A = B = 0$ ,  $C = a_1 + a_2 + a_3 + a_4$  and  $D = -(a_2 + a_3)$ . Henceforth the solution of the equation of the third degree is:

$$r = 2 \times \sqrt{\frac{P}{3}} \times \cos \left[ \frac{\frac{\pi}{2} - \arctan \left( \frac{-S}{\sqrt{1-S^2}} \right) + 4\pi}{3} \right] - \frac{B}{3A},$$

$$\text{with } S = -\frac{Q}{2\sqrt{-\frac{P^3}{27}}}, \quad P = \frac{C}{A} - \frac{B^2}{3A^2},$$

$$Q = \frac{2B^3}{27A} + \frac{D}{A} - \frac{BC}{3A}, \quad A = a_1 + a_2 + a_3 + a_4,$$

for the hypothesis of two independent major genes:  $B = -(3a_2 + 2a_3 + a_4)$ ,

$$C = -(a_1 - 2a_2 + a_3 + 2a_4), \quad D = 2a_3,$$

for the hypothesis of three independent major genes:  $B = -(-2a_1 + 5a_2 + 2a_3 + a_4)$ ,

$$C = -(3a_1 - 4a_2 + 11a_3 + 12a_4), \quad D = 12a_3.$$

For each marker, a LOD score was calculated from the observed recombination frequency (R) for the RILs population, i.e.

$$R = \frac{2r}{1+2r}. \text{ The LOD score is defined as the}$$

logarithm (base 10) of the ratio of the likelihood to observe a linkage between gene and marker calculated from R on the likelihood of independence hypothesis. The markers with the highest LOD score are considered as linked to the resistance gene(s).

#### QTL analysis

QTL analysis was carried out on all data with PLABQTL software (Utz and Melchinger 1996), which performs single interval mapping (SIM) using multiple regression of phenotypic data on marker genotypic data as described by Haley and Knott (1992), and composite interval mapping (CIM) using a set of markers as cofactors for the background control (Jiang and Zeng 1995;

Zeng 1994). The multiple regression approach used by PLABQTL has the advantage of robustness when the distribution of the residuals is not Gaussian. According to both permutation tests (Doerge and Churchill 1996) and Bonferonni  $\chi^2$  approximation (Zeng 1994), an empirical average LOD score threshold across different traits was chosen (LOD 4.0) for declaration of a putative QTL as significant. QTL position was estimated at the point where the LOD score assumed its maximum in the region under consideration. A one-LOD graph was constructed for each QTL as described by Lander and Botstein (1989). The proportion of phenotypic variance explained by a given QTL was determined by the square of the partial correlation coefficient ( $R^2$ ). Estimate of the additive effect of each QTL was obtained including all putative QTL detected for the respective trait. The proportion of phenotypic variance explained by all QTL was determined by the adjusted coefficient of determination ( $R^2_{adj}$ ) obtained by fitting the model of multiple regression on the additive effects of all putative QTL.

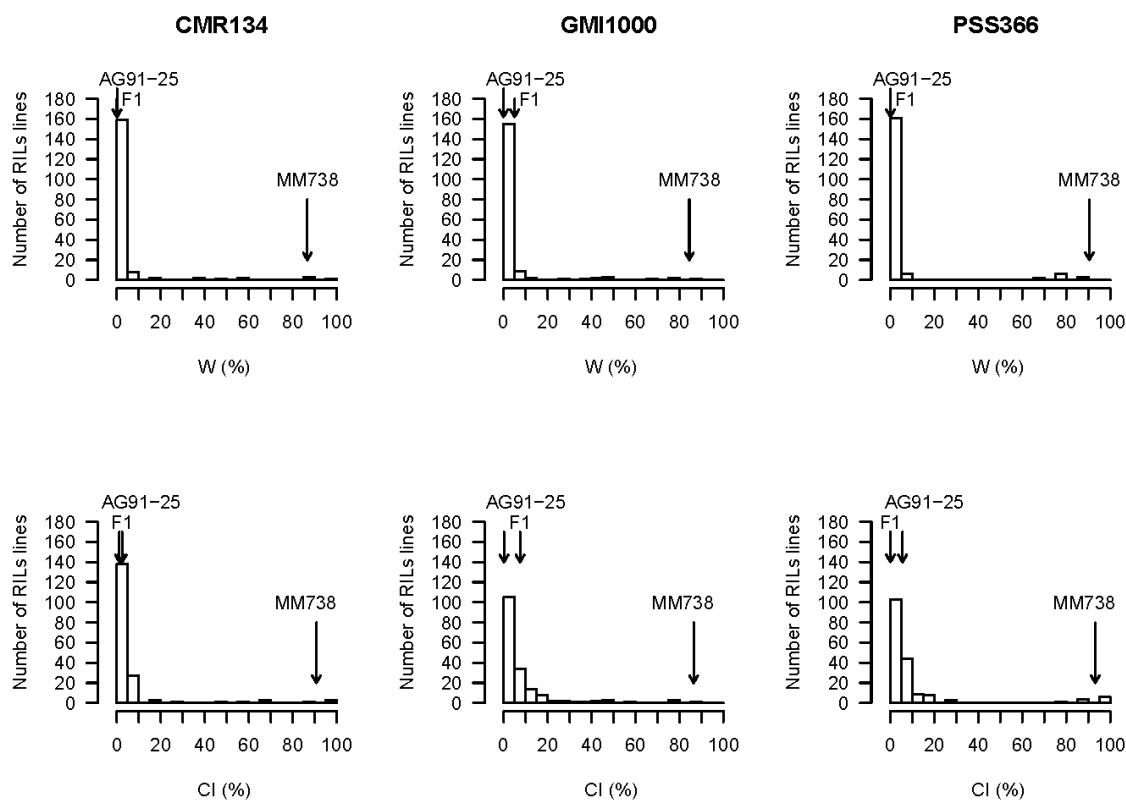
#### Results

##### Disease traits analysis

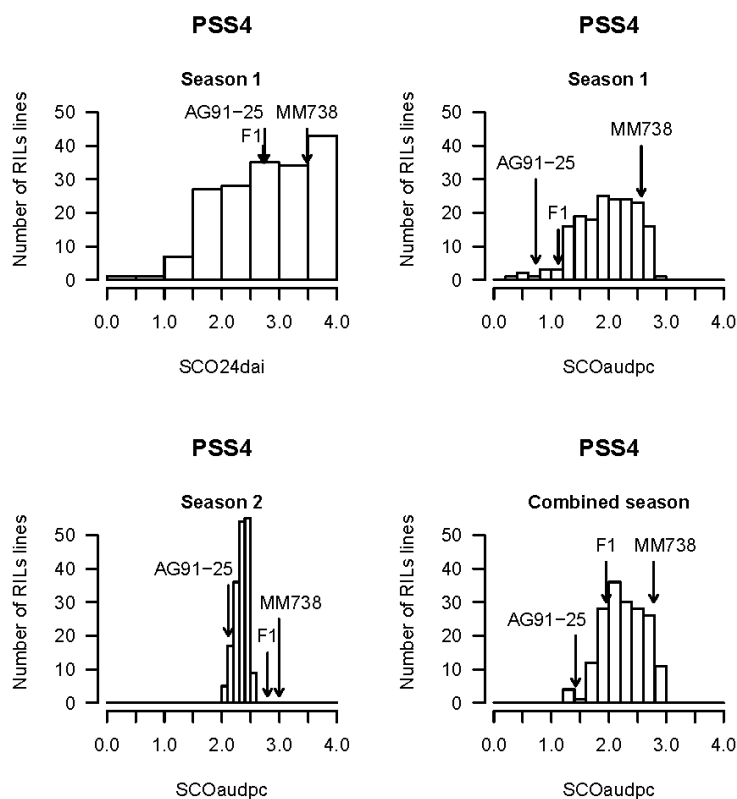
The susceptible parent MM738 had a mean percentage of wilted plants (W) ranging from 85 to 96% and a mean colonization index (CI) ranging from 85 to 98%, depending on the strain inoculated (Table 2). High values of mean W and CI were also observed for the susceptible control MM136 with a mean W ranging from 70 to 90% and a mean CI ranging from 77 to 95%, depending on the strain inoculated.

The parent AG91-25 was scored as highly resistant against strains CMR134, PSS366, and GMI1000, with almost no plants showing symptoms and very few plants colonized by the bacteria. All the generations ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $BC_1$ s) derived from the MM738 x AG91-25 cross were also found to be almost totally resistant with no or very few plants





**Chapitre 2. Fig. 1.** Frequency distribution of RIL  $F_6$  population for the maximum wilting percentage (W) and colonization index (CI), when tested against phytophthora I strains CMR134, GMI1000 and PSS366. The arrows indicate the means of the parents (MM738 and AG91-25) and of their  $F_1$



**Chapitre 2. Fig. 2.** Frequency distributions of RIL  $F_6$  population for  $SCO_{24dai}$  measured in trial 1 and  $SCO_{AUDPC}$  as calculated for trials 1, 2 and 1&2 (combined), when tested against the phytophthora I highly virulent strain PSS4

showing symptoms or asymptomatic colonization when inoculated by these strains. The RILs population was highly resistant (Fig. 1) with a mean W value close to 5% and a mean CI value varying from 6 to 10%, depending on the strain. On the other hand, AG91-25 resistance was demonstrated to be overcome by the aggressive strain PSS4 after 5 weeks with a mean W value of 50 and 81% and a mean CI value of 64 and 84% observed in seasons 1 (cool) and 2 (hot), respectively. Although the same inoculum concentration was used for both seasons, the inoculation pressure obtained with this strain was slightly higher in the second test (hot season) than in the first one (cool season). The generations derived from the MM738 x AG91-25 cross, were all susceptible, especially in season 2, with mean W values higher than 88%, and mean CI values higher than 90%. The RILs population was also found to be susceptible to PSS4 with a mean W value of 81 and 90%, and a mean CI value of 88 and 92% in season 1 and 2, respectively (Fig. 2, Table 2).

The analysis of variance of the data obtained from the experiments with strains that were controlled by AG91-25 resistance (CMR134, PSS366, and GMI1000) revealed that the genotypic variance component ( $\sigma_F^2$ ) was highly significant for W and CI in each trial ( $P < 0.001$ ) (Table 2). Heritability estimates for these strains were high, indicating that an important part of the phenotypic variance found in the RILs population was genetically controlled. The analysis of variance of data from the experiments with strain PSS4, using the GLM procedure, revealed that the genotypic variance component was not significant for W and CI, except for W in season 1. The genotypic variance component was significant at  $P < 0.01$  for variables scored at 24 dai ( $SCO_{24\text{dai}}$ ) in season 1, and the AUDPC calculated from the score ( $SCO_{\text{audpc}}$ ) in season 1 as well as across the two seasons. This trait was found to be significantly correlated with W and CI for season 1 and

across seasons. In season 2, the genotypic variance was non-significant for all traits analyzed with GLM procedure. A significant genotypic variance was found only for the  $SCO_{\text{AUDPC}}$  when analyzed with MIX procedure. In the analysis across the two seasons using the GLM and MIX procedures, a highly significant ( $P < 0.001$ ) effect of the season was found for  $SCO_{\text{AUDPC}}$ , although the genotype x environment interaction ( $\sigma_{F \times S}^2$ ) was not significant. Low values of heritability for  $SCO_{\text{AUDPC}}$ , ranging from 0.28 to 0.53 depending on the season, considered were in agreement with the hypothesis that the most important part of phenotypic variance was due to environment effects.

Inheritance of resistance of AG91-25 to strains CMR134, PSS366, GMI1000.

A qualitative Mendelian analysis was performed by using the traits that were most dissimilar for the parents AG91-25 and MM738. Thus, W and CI were selected for this analysis. The two phenotypic classes were resistant (symptom rate 0 for W, bacteria not-detected for CI) and susceptible (symptom rate 1 to 4 for W, bacteria detected for CI). In the  $F_2$  and  $BC_1P1$ , most plants were immune (no wilting and no bacteria detected) suggesting that resistance was dominant and subject to oligogenic inheritance (Table 3). A RIL was considered as susceptible if one plant with one wilted leaf was observed among the 10 plants tested. Therefore, we also estimated the observed ratio of susceptible/resistant RIL families and, determined the goodness of fit for the hypotheses of resistance controlled by 1, 2, or 3 major dominant genes. For the trait CI, the observed segregation fit the ratio expected for two dominant genes (1:3) when RIL families were tested against CMR134. In contrast, when the RILs were tested against PSS366 and GMI1000, the model for a single dominant gene controlling resistance was supported. For the trait W, the observed segregation fit the

**Chapitre 2. Table 3.** Phenotype (Resistant, Susceptible) segregation for the maximum wilted plant and colonization index for the RILs F<sub>6</sub>, F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>P1 generations, tested with three *Ralstonia solanacearum* strains

Hyp <sup>a</sup>	Strain	Lines	Ratio (S:R) <sup>b</sup>	S <sup>c</sup>	Wilting max			Colonisation			
					R	$\chi^2$ <sup>d</sup>	p <sup>e</sup>	S	R	$\chi^2$	p
1	CMR134	F <sub>6</sub>	1:1	19	158	109.16	***	39	138	55.37	***
		F <sub>2</sub>	1:3	2	198	61.44	***	5	195	54.00	***
		BC <sub>1</sub> P1	1:1	5	191	176.51	***	7	189	169.00	***
	PSS366	F <sub>6</sub>	1:1	17	160	115.53	***	74	103	4.75	*
		F <sub>2</sub>	1:3	4	195	56.10	***	13	180	38.19	***
		BC <sub>1</sub> P1	1:1	2	196	190.08	***	7	191	170.99	***
	GMI1000	F <sub>6</sub>	1:1	22	154	99.00	***	72	104	5.82	*
		F <sub>2</sub>	1:3	1	197	63.36	***	8	190	46.39	***
		BC <sub>1</sub> P1	1:1	1	181	178.02	***	4	178	166.35	***
2	CMR134	F <sub>6</sub>	1:3	19	158	19.21	***	39	138	<b>0.83</b>	
		F <sub>2</sub>	1:15	2	198	9.41	**	5	195	4.80	*
		BC <sub>1</sub> P1	1:3	5	191	52.68	***	7	189	48.00	***
	PSS366	F <sub>6</sub>	1:3	17	160	22.37	***	74	103	26.67	***
		F <sub>2</sub>	1:15	4	195	6.11	*	13	180	<b>0.02</b>	
		BC <sub>1</sub> P1	1:3	2	196	60.77	***	7	191	48.65	***
	GMI1000	F <sub>6</sub>	1:3	22	154	14.67	***	72	104	23.75	***
		F <sub>2</sub>	1:15	1	197	11.15	***	8	190	<b>1.65</b>	
		BC <sub>1</sub> P1	1:3	1	181	58.03	***	4	178	50.47	***
3	CMR134	F <sub>6</sub>	1:7	19	158	<b>0.50</b>		39	138	14.71	***
		F <sub>2</sub>	1:63	2	198	<b>0.41</b>		5	195	<b>1.14</b>	
		BC <sub>1</sub> P1	1:7	5	191	17.74	***	7	189	14.29	***
	PSS366	F <sub>6</sub>	1:7	17	160	<b>1.36</b>		74	103	139.00	***
		F <sub>2</sub>	1:63	4	195	<b>0.26</b>		13	180	25.82	***
		BC <sub>1</sub> P1	1:7	2	196	23.90	***	7	191	14.55	***
	GMI1000	F <sub>6</sub>	1:7	22	154	<b>0</b>		72	104	129.87	***
		F <sub>2</sub>	1:63	1	197	<b>1.44</b>		8	190	7.90	**
		BC <sub>1</sub> P1	1:7	1	181	23.77	***	4	178	17.66	***

<sup>a</sup> Hyp: Segregation hypothesis for the RIL F<sub>6</sub> population, F<sub>2</sub> and back-cross BC<sub>1</sub>P1 (BC<sub>1</sub> with MM738, susceptible, as recurrent parent) generations, 1, hypothesis of a single major dominant gene; 2, hypothesis of two independent major dominant genes; and 3, hypothesis of three independent major dominant genes controlling resistance to *R. solanacearum*

<sup>b</sup> ratio (S:R): theoretical ratio of segregation for each hypothesis

<sup>c</sup> For wilting max: S, number of wilted plant and R, number of no wilted plant; for colonization: S, number of colonized plant and R, number of no colonized plant

<sup>d</sup>  $\chi^2$ : test

<sup>e</sup> p value significant “\*” at P<5%; “\*\*” at P<1%; “\*\*\*” at P< 0.1%.

ratio expected for three dominant genes (1:7) regardless of BW strain.

### Segregation analysis and genetic linkage map

A total of 1323 primer combinations of different molecular markers were screened on the parental lines, with a very low level of polymorphism found for all types of markers, except AFLP which yielded zero to eight informative bands per primer combination. In this way, 179 polymorphic markers were obtained from 64 *EcoRI/MseI* AFLP primer combinations, and 163 of these markers could be genotyped on the RIL population of 178 individuals. From the 459 eggplant SSRs screened, 32 (7.0%) were polymorphic and could be genotyped, while only two of 376 (0.5%) screened tomato SSRs were polymorphic. Of the 358 SRAP, RGA, and SRAP/RGA combinations screened, only two polymorphic markers (0.5%) could be genotyped. From the 66 RAPD primers screened, only one marker (1.5%) showed clear polymorphism and could be genotyped. In this way, we identified a total of 200 polymorphic molecular markers. In addition to these molecular markers, one morphologic marker (presence/absence of hairs on plant stalks) was used to construct a genetic map that consisted of 119 markers positioned on 18 linkage groups (LGs). All loci were significantly linked (LOD threshold  $\geq 3$ ) to one of these 18 LGs with a maximum distance of 25.5 cM, corresponding to a stringent recombination frequency ( $r$ ) of 0.2, before applying the Haldane mapping function. Markers not included on the map were extremely distorted, not linked to any linkage group or tightly clustered with other markers. The map spanned a total of 884 cM with an average distance of 8.8 cM between markers. Twenty out of the 119 marker loci (16.8%) showed significant ( $P < 0.001$ ) distortion from the expected Mendelian 1:1 segregation ratio for parental alleles. The proportion of susceptible parent (MM738) genome among the 178  $F_6$  individuals ranged from 15.7 to 70.5

%, with a mean of  $45.1 \pm 9.5$  % which did not differ significantly from the proportion expected under Mendelian segregation, 50%.

### Maximum likelihood analysis

Detection of markers linked to BW resistance genes was performed by maximum likelihood analysis on W and CI traits using genotypic data from 201 marker loci and phenotypic qualitative data (Resistant/Susceptible) obtained from single experiments with strains CMR134, PSS366, and GMI1000. We tested the hypotheses for one, two, or three independent dominant genes responsible for resistance, and estimated the numbers of individuals falling in each class: M/R, m/R, M/S, and m/S. AFLP marker COX067a was significantly associated (LOD threshold  $\geq 2$ ) with resistance as evaluated by W and CI, for strains CMR134, PSS366, and GMI1000 (Table 4). A second AFLP marker, CSO220a, was also significantly associated (LOD  $\geq 2$ ) with resistance for W for the three strains. Moreover, this marker was significantly associated with resistance to PSS366 as measured by CI.

### QTL analysis

QTL analyses were performed on W and CI traits using genotypic data from 119 marker loci and the phenotypic quantitative data obtained from the single experiments with CMR134, PSS366, and GMI1000. QTL analysis was also performed with quantitative data from experiments against strain PSS4, using BLUP values obtained for the disease score traits as selected in individual trials and across seasons (Table. 4). For the strains CMR134, PSS366, and GMI1000, both SIM and CIM methods resulted in the detection of a major gene on LG2 in the interval between AFLP markers CRO432b and COX067a. In addition, two minor QTL explained 12 to 26 % of the variation, depending on the trait and the strain, were detected only by the SIM method. The LOD-peak of the major gene was detected at the same position for the three strains, close

**Chapitre 2. Table 4.** Genetic factors detected for resistance to phylotype I strains CMR134, PSS366, GMI1000 and PSS4 of *R. solanacearum* based on composite interval mapping (CIM), simple interval mapping (SIM) and maximum likelihood method (MLM) analyses in the RILs F<sub>6</sub> population derived from the cross between MM738 and AG91-25

Strain	Trait	LG <sup>a</sup>	QTL		CIM			SIM			MLM		
			Pos. (cM) <sup>b</sup>	Interval markers	LOD <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>d</sup>	a <sup>e</sup>	LOD	R <sup>2</sup>	a	Marker <sup>f</sup>	LOD	
CMR134	W	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CSO220a	3.7
		2	18	CRO432b-COX067a	42.1	66.6	-0.26**	41.6	66.1	-0.24**	COX067a	4.1	
		2	30	SSRX-CDX172a	-	-	-	5.1	12.3	-0.03*	-	-	
	3	52	CEF177b-CSP169b	-	-	-	8.2	19.2	NS	-	-		
	Total R <sup>2</sup> <sup>g</sup>												
						66.1			67.6				
PSS366	W	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CSO220a	5.9
		2	18	CRO432b-COX067a	79.7	87.4	-0.36**	79.7	87.4	-0.35**	COX067a	6.3	
		3	52	CEF177b-CSP169b	-	-	-	11.6	26.2	-0.04**	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						87.4			88.4				
GMI1000	W	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CSO220a	2.4
		2	18	CRO432b-COX067a	55.0	76.3	-0.26**	54.9	76.3	-0.24**	COX067a	3.3	
		3	52	CEF177b-CSP169b	-	-	-	10.0	23.2	-0.03*	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						76.3			77.2				
PSS4	S 1	13	0	SSRZ-COI393a	10.1	25.4	-0.15**	10.3	25.9	-0.13**	-	-	
		13	12	SSRW-CR098b	-	-	-	6.67	16.0	NS	-	-	
		2	48	CAX057b-COI283b	-	-	-	5.69	13.8	NS	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						22.3			22.7				
PSS4	SCO <sub>AUDPC</sub>	13	0	SSRZ-COI393a	16.2	37.5	-0.29**	15.2	35.6	-0.25**	-	-	
		13	12	SSRW-CR098b	-	-	-	10.2	23.3	NS	-	-	
		2	48	CAX057b-COI283b	-	-	-	8.2	19.3	NS	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						31.5			32.2				
PSS4	S 2	13	0	SSRZ-COI393a	5.1	13.8	-0.06**	14.2	33.7	-0.04**	-	-	
		13	12	SSRW-CR098b	-	-	-	10.2	23.5	NS	-	-	
		2	48	CAX057b-COI283b	-	-	-	8.6	20.2	NS	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						28.1			29.7				
PSS4	Comb <sup>i</sup>	13	0	SSRZ-COI393a	16.5	38.0	-0.10**	15.6	36.4	-0.08**	-	-	
		13	12	SSRW-CR098b	-	-	-	10.6	24.2	NS	-	-	
		2	48	CAX057b-COI283b	-	-	-	8.4	19.8	NS	-	-	
	Total R <sup>2</sup>												
						30.2			31.7				

<sup>a</sup> LG: linkage group

<sup>b</sup> Pos.: Position of the QTL of the linkage group

<sup>c</sup> LOD: Maximum value of the log-likelihood (values are superior to the LOD-thresholds : 4 for SIM and CIM and 2 for MLM)

<sup>d</sup> R<sup>2</sup>: Partial coefficient of determination, i.e., percentage of phenotypic variation explained by the QTL calculated by PLABQTL on averaged data, adjusted for cofactors in case of CIM

<sup>e</sup> a: Additive estimates. The sign of a indicates the origin of the allele contributing to the resistance: negative values come from the resistant parent (AG91-25)

<sup>f</sup> Markers linked to the resistance with the highest LOD value by MLM

<sup>g</sup> Total R<sup>2</sup>: Total adjusted coefficient of determination, i.e. the percentage of phenotypic variance explained by all QTL, calculated by PLBQTL on averaged data, fitting the model of multiple regression on the additive effects of all putative QTL affecting the respective trait

<sup>h</sup> QTL analysis on BLUPs values for the variable SCO<sub>AUDPC</sub> at season 2

<sup>i</sup> Comb: Combined season

\*, \*\*, Significant at the 0.05 and 0.01 probability level, respectively, NS, non-significant

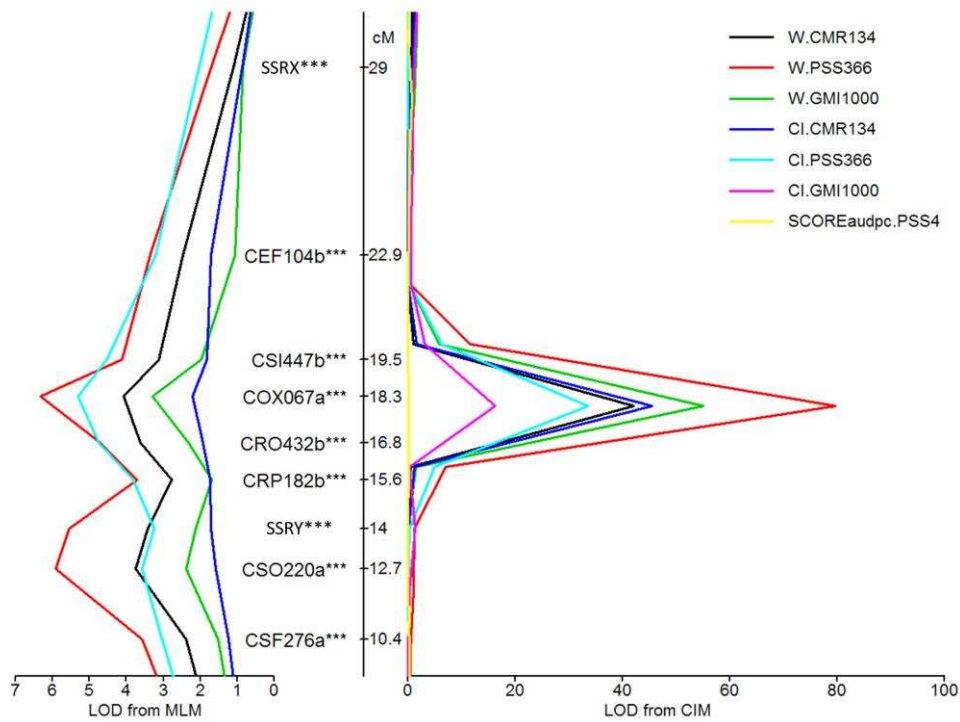
to marker COX067a, which was determined to be the most significantly associated marker in the LOD-max marker by marker (Fig. 3). This gene, designated *ERs1*, is associated with both resistance traits, W and CI; and, depending on the strain, it explains 56 to 87% of phenotypic variance. A negative additive effect for the AG91-25 parental allele indicated that this allele contributed resistance (Table 4). For the strain PSS4, no QTL was detected at this locus, suggesting that the major gene *ERs1* is completely overcome by this aggressive strain. Nevertheless, one to three minor resistance QTLs were found to be associated with partial resistance observed at an intermediate stage of disease progress with PSS4. These QTLs, which were located on LG2 and LG13 explained 19 to 36% of the phenotypic variation for the variable disease score  $SCO_{AUDPC}$ .

### Discussion

Accurate phenotypic evaluation is a prerequisite for QTL mapping. Under natural conditions, *Ralstonia solanacearum* is not uniformly spread across a field or a greenhouse. Therefore, artificial inoculation is essential for obtaining a reliable plant response. Moreover, this is the only way to test resistance against identified strains and to investigate the specific versus generalist response of the detected genes/QTLs. Inoculation of root-wounded individual plants 10 days after transplanting using the drip irrigation system was shown to be effective and reliable. Nevertheless, the heterogeneity of plant growth observed in different RILs when inoculated may increase the microenvironment component of variance and, therefore, reduce the precision of resistance tests.

*S. melongena* AG91-25 was previously identified as one of the resistant accessions exhibiting the most variable response to different strains representing phylotype I (Lebeau et al. 2011). Phylotype I is geographically widespread and the most

important in terms of economic impact and bacterial genetic diversity (Hayward 1991, Hayward 1994). Gene/QTL mapping was therefore carried out using a panel of bacterial strains representing different levels of virulence within this phylotype to inoculate a RILs-F<sub>6</sub> population derived from the intraspecific cross MM738 x AG91-25. In this way, it was possible to evaluate the effectiveness and stability of the resistance factors involved, and to assess whether an aggressive strain may break these factors. A major advantage of using an immortalized population of nearly homozygous RILs is that the population could be used for repeated tests against different strains representing the three main phylotypes, in different environments. Consequently, it is possible to continue the study of this resistance versus the genetic diversity of the bacteria, and therefore to estimate its sustainability throughout large cropping areas. In spite of their contrasting response to BW infection, the two parents displayed a very low level of polymorphism for DNA markers. A total of 179 polymorphic bands were detected from 64 primer combinations for AFLP, but only 32 polymorphic markers were obtained from the survey of 459 eggplants SSR, and very few polymorphisms were revealed by RAPD, SRAP, RGA, and SRAP/RGA techniques. These results confirm the low frequency of DNA polymorphism in the eggplant genome observed in other parentage (Nunome et al. 2001). AFLP markers were genotyped to construct a genetic linkage map of *S. melongena*. The observed number of LGs does not correspond to the expected number of 12 LGs for a comprehensive linkage map of eggplant (2n=24). In our study, the high rate of distorted markers may have resulted in an overestimation of the recombination frequency between these markers, and thus, may have contributed to the formation of several small LGs, as described by Lyttle (1991). These small LGs may also be due to incomplete coverage of the genome. Most of the distorted



**Chapitre 2. Fig. 3.** LOD ( $\text{Log}_{10}$  of the odds ratio) score scans. Map distance (cM) is shown alongside the schematic representation of linkage group 2. On the left is the LOD measured from the maximum likelihood method for the RILs  $F_6$  tested with the three strains (CMR134, GMI1000 and PSS366), and on the right side is, the LOD measured from CIM analysis for the four strains tested on the RILs



markers were mapped on LG2, suggesting the presence of a specific region of the genome where structural differences or loci may affect recombination. This region could correspond with a part of the *S. aethiopicum* Aculeatum group genome introgressed into AG91-25. Despite a relatively low number of markers, the genetic length of the present map is comparable to the estimate provided by Nunome et al. (2001) for an intraspecific F<sub>2</sub> population.

We demonstrated that AG91-25 resistance to *R. solanacearum* phylotype I strains is conferred by a major dominant gene, named *ERs1*. QTL analysis with both SIM and CIM methods concluded to the presence of a locus with at least one major dominant gene positioned on LG2, in a region with markers highly skewed in favour of the resistant parent AG91-25. This locus was accurately positioned in a confidence interval of 4 cM and flanked by two closely-linked markers at a distance of less than 1 cM. The locus, *ERs1*, localised at the 18 cM position of LG2 and associated with the marker COX067a, explains a very important part of the phenotypic variance for W and CI against three strains. Therefore, it is assumed to be very efficient for controlling resistance to BW, strongly reducing both colonization and wilting of the plants when inoculated by strains CMR134, PSS366 and GMI1000. Two putative minor QTL were only detected by SIM and did not modify the action of this major gene (data not shown) and, consequently, may be disregarded in breeding. The marker by marker approach on qualitative data using the maximum likelihood method confirmed the presence of one gene localised at the 18 cM position of LG2, associated with the marker COX067a. This analysis also detected a second marker, CSO220a, significantly associated with resistance. This discrepancy between the results obtained by the two mathematical methods might be due to the statistical methods used. The detection of only one major gene by the QTL analysis applied to the RILs, is partially consistent with

the complex results obtained from Mendelian analyses on F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>s that suggest either a monogenic or an oligogenic inheritance of resistance, depending on both the trait and the strain. These discrepancies may be due to the way we defined the qualitative variables by defining susceptibility based on the presence of at least one plant per RIL having at least one wilted leaf. Moreover, we cannot disprove the hypothesis that another major gene or QTL exists. It is possible that such a locus was not detected because of incomplete map coverage.

We also demonstrated that this major resistance gene was strain-specific, and was overcome by strain PSS4. The only reliable QTL for this strain detected on LG13, associated with the capacity to delay the disease infection. Thus, AG91-25 resistance failed to stop infection by PSS4 in our experiments because this aggressive strain broke down the resistance contributed by the major gene detected on LG2.

The manifestation of eggplant's resistance to BW was reported to be similar to the one described in tomato, i.e. limitation of bacteria spread within the xylem vessels, such that the more resistant a plant is, the less colonized its stem tissues will be (Grimault et al. 1994; Grimault and Prior 1994). Vasse et al (2005) observed that resistance was initiated at a very early stage, activating mechanisms that prevent the multiplication and spread of the bacteria in association with accumulation of phenolic compounds in the roots. The fact that only 23 to 49% of the colonized RILs developed wilting symptoms, suggests the existence of a second resistance mechanism acting at a later stage and dependent on the first mechanism. This hypothesis is consistent with the observed pleiotropic effects of the major gene on traits CI and W. We also identified transgressive lines, that were more resistant than the resistant parent AG91-25 (Fig. 2); these lines may be promising resistance sources against PSS4-like strains.

The identification of this strain-specific major BW-resistance gene constitutes



a major finding, and an important step towards untangling the complex genetics of *R. solanacearum* plant interactions. Because our study highlights the strain-specificity of the major BW resistance gene from eggplant AG91-25, we assume that our set of strains should be distinguished by the presence/absence of bacterial genetic factor(s) involved in virulence/avirulence interaction with the host-plant. Recently, we observed that PopP1, PopP2, and RSp0572 type3-factors were present in CMR134, PSS366, and GMI1000 strains, but absent in the PSS4 virulent strain (E. Wicker, unpublished results). PopP1, PopP2 are known to be associated with avirulence in petunia and arabidopsis, respectively (Deslandes et al. 2003; Lavie et al. 2002). The putative involvement of one of these factors in a specific gene for gene interaction for AG91-25 resistance should be investigated further, for example by testing bacterial strains that are mutant for these genes. Moreover, PopP2 was shown to specifically interact with RRS1-R, product of a major gene for resistance to BW in *Arabidopsis thaliana* which forms a protein complex with RD19 (Bernoux et al. 2008; Deslandes et al. 2003). Consequently, another perspective would be to look for orthologous sequences of *RRS1-R* in eggplant and tomato, to determine if this major gene might correspond to a resistance gene or QTL identified in solanaceous crops. In the short-term, the hypothesis of a gene for gene interaction must be confirmed by testing AG91-25 resistance against genome-characterized strains belonging to phylotype I and other phylotypes. The recent classification scheme of *Ralstonia solanacearum* diversity into several phylotypes (Fegan and Prior 2005), as well as the characterization of a core collection of tomato, eggplant, and pepper accessions representative of the principal sources of resistance (Lebeau et al., 2011), provide the necessary foundation for further investigation of the stability of resistance when confronted by the genetic diversity of

*Ralstonia solanacearum* and for exploration of the molecular bases of resistance and its breakdown by certain virulent strains.

In conclusion, the BW resistance in eggplant accession AG91-25 is conferred by a combination of (i) at least one major dominant gene, named *ERsI*, which was demonstrated to be efficient and stable against three strains of phylotype I, and (ii) a disease progress-delaying QTL acting when *ERsI* is inactivated. Our study is the first one that mapped resistance genes in eggplant against well-characterized *R. solanacearum* strains. *ERsI* is probably involved in a gene for gene interaction with the bacteria, as it was not functional against the virulent strain PSS4 which completely overcame resistance. The action of *ERsI* seems to be minimally influenced by environmental factors (temperature and humidity) and mostly dependent on the inoculum strain. These properties appeal for promising prospects for breeders. In a breeding program for commercial F<sub>1</sub> hybrids of eggplant, the allele from the resistance source AG91-25 can be introgressed into breeding material using the molecular markers mapped less than 1 cM from the resistance gene. The conversion of these AFLP markers into breeder-friendly sequence characterized amplified region (SCAR) markers will provide a very convenient tool allowing routine marker assisted selection for resistance against BW in diverse genetic backgrounds. A codominant SCAR marker, if made available, will permit differentiation of homozygous susceptible and heterozygous resistant plants in BC<sub>1</sub> populations, and also differentiation of homozygous and heterozygous resistant plants in segregating BC<sub>1</sub> or F<sub>2</sub> populations. This would allow culling of individuals that do not carry the favourable allele, at a very early stage of selection by screening their genomes. Such selection would therefore avoid time-consuming and costly large-scale artificial inoculations, and also compensate the fact that BW is quarantined at most locations and

cannot be inoculated in classical resistance tests. Since one of the linked markers was found to be almost co localized with the gene, this suggests that virtually no recombination will occur between the marker and the gene. Therefore, just one phenotypic test for resistance will be necessary at the end of the backcrossing process, to ascertain that the resistance allele has indeed been inherited with the marker allele tagging the *ERs1* locus.

Besides, these linked markers will provide a starting point for exploring the diversity of resistance in eggplant germplasm as well as for exploring the synteny of *Ralstonia solanacearum* resistance genes in solanaceous crops. It would also be interesting to map BW resistance genes from other sources of eggplant germplasm and investigate whether they are allelic to *ERs1*. Because of the lack of anchor markers on our intraspecific map, we cannot yet identify potential syntenic QTL for BW resistance in the tomato or pepper genomes. However, we can use the sequences of the flanking markers CRO432b and COX067a, or derived-SCAR markers as probes for assigning the position of our BW resistance gene to a particular region of the eggplant reference map and to the corresponding colinear genomic regions in tomato and pepper. Marker SSRX which mapped 10.3 cM from the gene indicates that the eggplant genomic region with *ERs1* is included in a portion of eggplant chromosome 9 between RFLP markers CT177 and TG421, which corresponds to a colinear syntenic region on the long arm of chromosome 9 in tomato (Doganlar et al. 2002).

**Acknowledgments** The authors are grateful to A. Palloix, M. Pitrat, M. Causse, and V. Lefebvre (Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UR 1052) for their help in analyzing the segregation results as well as for early review of this paper. We also thank E. Chapier-Fontaine, J. J. Chéron, J. M. Baptiste and S. Lebon (Centre de coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),

Réunion) for providing technical assistance. This work was funded by De Ruiters Seeds, Enza Zaden, Gautier Semences, Nunhems, Rijk Zwaan, and Vilmorin & Cie; the European Regional Development Funds (FEDER) of the European Union, Conseil Régional de la Réunion also provided financial support as part of the programme « Lutte génétique contre les maladies émergentes chez les solanées maraîchères » (GENETOM).

## References

- Ano G, Hébert Y, Prior P, Messiaen CM (1991) A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L. x *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11:555-560
- Ano G, Prior P, Manyri J, Vincent C (1990) Stratégies d'amélioration de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) pour la résistance au flétrissement bactérien causé par *Pseudomonas solanacearum* E.F.S. Journées maraîchères CIRAD-ORSTOM-INRA:570-579
- Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Briere C, de Wit PJGM, Marco Y, Deslandes L (2008) RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20:2252-2264
- Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, Gaussoin RE, Riosdan TP, Dweikat I (2004) Molecular characterization of buffalograss using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics* 108:328-334
- Buddenhagen I, Sequeira L, Kelman A (1962) Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52:726
- Cao BH, Lei JJ, Wang Y, Chen GJ (2009) Inheritance and identification of SCAR linked to bacterial wilt-resistance in eggplant. *African Journal of Biotechnology* 8:5201-5207
- Carneille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 113:110-121
- Chen NC, Li HM, Wang JF (1997) Bacterial wilt resistance sources in eggplant, *Solanum melongena*. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 14:4-5

## Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* 2:113-121
- Cook D, Sequeira L (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp 77-93
- Daly P (1973) Obtention d'une nouvelle variété d'aubergine au *Pseudomonas solanacearum*. *Agronomie Tropicale Série 1 : Riz et Riziculture et Cultures Vivrières Tropicales* 28:28-33
- Denny T (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam SS (ed) *Plant-Associated Bacteria*, Springer Netherlands edn. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 573-644
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) 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* 100:8024-8029
- Dintinger J, Verger D, Caiveau S, Risterucci AM, Gilles J, Chiroleu F, Courtois B, Reynaud B, Hamon P (2005) Genetic mapping of maize stripe disease resistance from the Mascarene source. *Theoretical and Applied Genetics* 111:347-359
- Doerge RW, Churchill GA (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142:285-294
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley S (2002) A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics* 161:1697-1711
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation : a global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. APS Press, St Paul, USA, pp 9-28
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, St. Paul, USA, pp 449-461
- Frary A, Doganlar S, Frampton A, Fulton T, Uhlig J, Yates H, Tanksley SD (2003) QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. *Theor Appl Genet* 107:359-370
- Fukuoka H, Miyatake K, Nunome T, Negoro S, Yamaguchi H, Ohshima A (2010) Development of an integrated linkage map using genomic SSR and gene based SNPs markers in eggplant. In: Prohens J, Rodríguez A (eds) *Advances in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Editorial de la universitat Politècnica de València, València, Spain, pp 359-375
- Gonzalez WG, Summers WL (1995) A comparison of *Pseudomonas solanacearum*- resistant tomato cultivars as hybrid parents. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120:891-895
- Granada G, Sequeira L (1983) A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Disease* 67:1084-1088
- Grimault V, Anaïs G, Prior P (1994) Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol* 43:663-668
- Grimault V, Prior P (1994) Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: a comparative study. *European Journal of Plant Pathology* 100:259-267
- Grimault V, Prior P, Anaïs G (1995) A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii 7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Phytopathology* 143:349-352
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values, and the calculation of distance between distance loci of linked factors. *Journal of Genetics* 8:299-309
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324

## Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

- Hallauer AR, Miranda GV (1981) Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames, USA
- Hanson PM, Wang JF, Licardo O, Hanudin, Mah SY, Hartman GL, Lin YC, Chen JT (1996) Variable reactions of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. *Hortscience* 31:143-146
- Hanudin, Hanafiah Gaos MA (1993) Screening of eggplant accessions for resistance to bacterial wilt. In: Hartman GL, Hayward AC (eds) Bacterial wilt ACIAR proceedings No 45. ACIAR, Canberra, pp 191-192
- Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 27:265-277
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29:67-87
- Hayward AC (1994) The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, pp 9-24
- He LY, Sequeira L, Kelman A (1983) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease* 67:1357-1361
- Henderson C (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics* 31:423-447
- Horita M, Tsuchiya K (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407
- Ivey MLL, McSpadden Gardener BB, Opina N, Miller SA (2007) Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467-1475
- Jaunet TX, Wang JF (1999) Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-327
- Jeger MJ, Viljanen-Robinson S (2001) The use of area under the disease progress curve (AUDPC) to assess quantitative disease resistance in crop cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 102:32-40
- Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Disease* 91:195-203
- Jiang C, Zeng ZB (1995) Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693-695
- Kelman A (1998) One hundred and one years of research on bacterial Wilt. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) Bacterial Wilt Disease : Molecular and Ecological Aspects Springer, pp 1-5
- Knapp S, Stroup W, Ross W (1985) Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Science* 9:257-262
- Lafortune D, Béramis M, Daubèze A-M, Boissot N, Palloix A (2005) Partial resistance of pepper to bacterial wilt is oligogenic and stable under tropical conditions. *Plant Disease* 89:501-506
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199
- Lander ES, Green P, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, Grimsley N, Boucher C (2002) 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*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15:1058-1068
- 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
- Li G, Quiros CF (2001) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and Applied Genetics* 103:455-461
- Li HP, Goth RW, Barksdale TH (1988) Evaluation of resistance to bacterial wilt in eggplant. *Plant Disease* 72:437-439



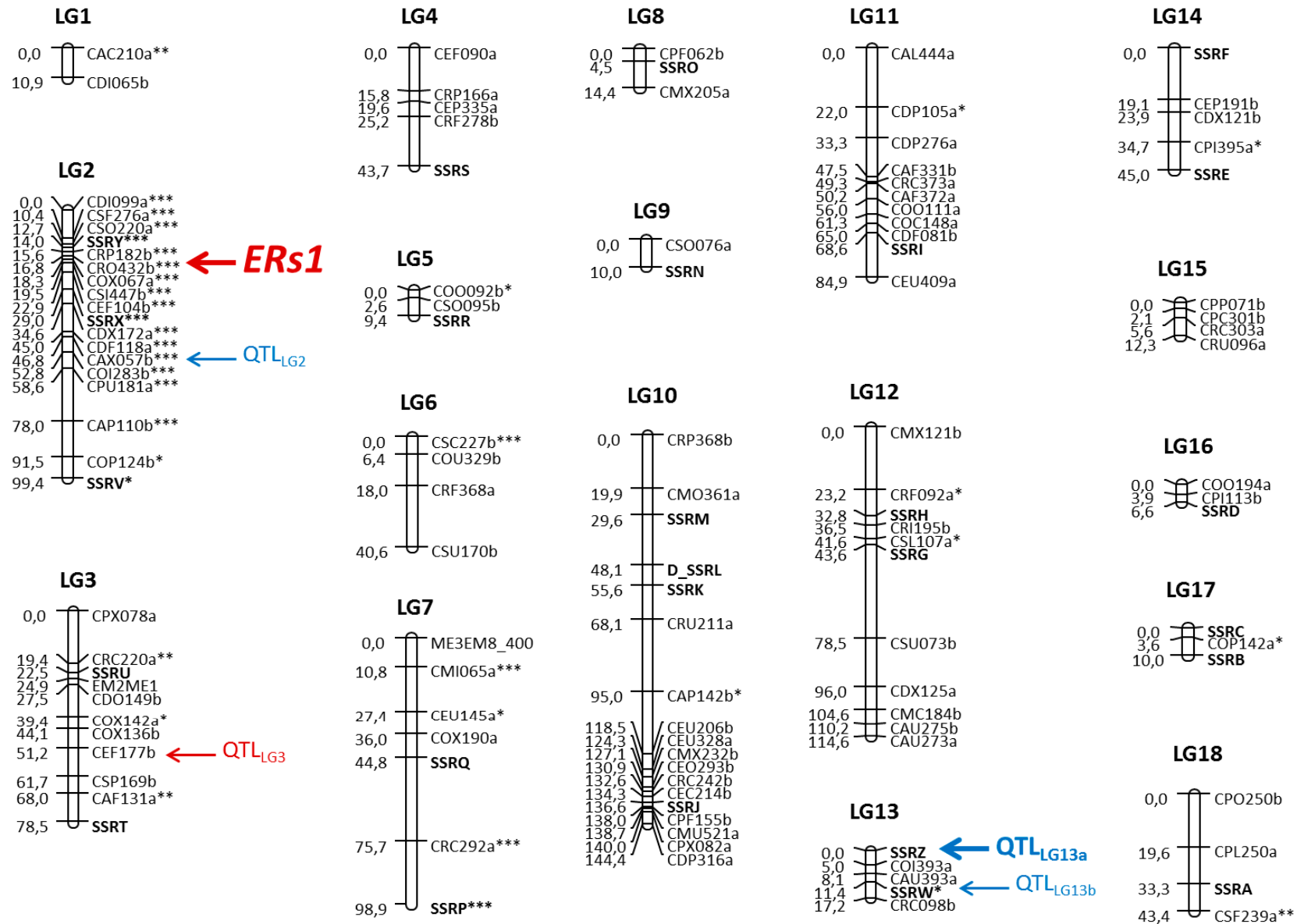
## Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

- Li M, Wang Y, Tian S, Luo Z, Wang X (2006) Genetic analysis of resistance to bacterial wilt and identification of an associated AFLP marker in eggplant (*Solanum melongena*). *Acta Horticulturae Sinica* 33:869-872
- Lyttle TW (1991) Segregation distorters. *Annu Rev Genet* 25:511-557
- Mahbou Somo Toukam G (2010) Diversité de *Ralstonia solanacearum* au Cameroun et bases génétiques de la résistance chez le piment (*Capsicum annuum*) et les solanacées. Thèse. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)
- Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, Prior P (2009) Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Disease* 93:1123-1130
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J, Grimsley NH (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151:1165-1172
- Messiaen CM (1975) Le Potager tropical. 2. Cultures spéciales. Presses Univ. de France
- Miao L, Shou S, Cai J, Jiang F, Zhu Z, Li H (2009) Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Molecular Biology Reports* 36:479-486
- Mochizuki H, Yamakawa K (1979) Resistance of selected eggplant cultivars and related wild *Solanum* species to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*). *Bulletin of the Vegetable and Ornamental Crops* 6:1-10
- Mohamed M, Umaharan P, Phelps RH (1997) Genetic nature of bacterial wilt resistance in tomato (*lycopersicon esculentum* Mill.) accession La 1421. *Euphytica* 96:323-326
- Norman DJ, Zapata M, Gabriel DW, Duan YP, Yuen JMF, Mangravita-Novo A, Donahoo RS (2009) Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* 99:1070-1077
- Nunome T, Ishiguro K, Yoshida T, Hirai M (2001) Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding Science* 51:19-26
- Nunome T, Negoro S, Kono I, Kanamori H, Miyatake K, Yamaguchi H, Ohyama A, Fukuoka H (2009) Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 119:1143-1153
- Nunome T, Suwabe K, Iketani H, Hirai M, Wricke G (2003a) Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding* 122:256-262
- Nunome T, Suwabe K, Ohyama A, Fukuoka H (2003b) Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. *Breeding Science* 53:77-83
- Nunome T, Yoshida T, Hirai M (1998) Genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*). In: Palloix A, Daunay MC (eds) Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* & Eggplant. INRA Paris, Avignon, France, pp 239-242
- Pegg KG, Moffett M (1971) Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husbandry* 11:696-698
- Ponnuswami V, Chen NC, Shanmugasundaram S (1996) New sources of resistance to bacterial wilt in eggplant. *TVIS Newsletter* 1:16
- Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J (1999) Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hrp gene region. *Appl Environ Microbiol* 65:2184-2194
- Prior P, Bart S, Leclercq S, Darrasse A, Anais G (1996) Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathol* 45:720-726
- Rao MVB, Sohi HS, Vijay OP (1976) Reaction of some varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) *Pseudomonas solanacearum* Sm. *Vegetable Science* 3:61-64
- Sakata Y, Monma S, Narikawa T, Komochi S (1996) Evaluation of resistance to bacterial wilt and *Verticillium* wilt in eggplants (*Solanum melongena* L.) collected in Malaysia. *Journal of the Japanese Society for horticultural Science* 65:81-88
- Sanchez Perez A, Mejia L, Fegan M, Allen C (2008) Diversity and distribution of *Ralstonia*

## Chapitre 2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

---

- solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol* 57:320-331
- Scott JW, Somodi GC, Jones JB (1988) Bacterial spot resistance is not associated with bacterial wilt resistance in tomato. *Proceeding of Florida State Horticultural Society* 101:390-392
- Sequeira L (1962) Control of bacterial wilt of bananas by crop rotation and fallowing *Tropical Agriculture* 39:211-216
- Sitaramaiah K, Sinha SK, Vishwakarma SN (1985) Reaction of brinjal cultivars to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 14:218-222
- Stagel A, Portis E, Toppino L, Rotino G, Lanteri S (2008) Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. *BMC Genomics* 9:357
- Sun B, Liao Y, Li Z, Li Z, Sun G (2008) AFLP markers linked to genes related to bacterial wilt resistance of eggplant. *Molecular Plant Breeding* 6:929-934
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N (1996) Quantitative trait Loci determining Resistance to Bacterial Wilt in Tomato Cultivar Hawaii7996. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:826-836
- Utz HF, Melchinger AE (1996) PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *JQTL* 2
- Vasse J, Danoun S, Trigalet A (2005) Microscopic studies of root infection in resistant tomato cultivar Hawaii7996. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, St Paul, pp 285-291
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP : a new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414
- Wang JF, Chen JT, Li HM (1998) Resistance sources to bacterial wilt in eggplant (*Solanum melongena*). In: Prior P, Allen C, Elphinstone JG (eds) *Bacterial wilt disease - Molecular and ecological aspects*. Springer-Verlag, Berlin, pp 284-289
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant-Microbe Interact* 13:6-13
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Prior P (2009) Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathol* 58:853-861
- Wu F, Eannetta NT, Xu Y, Tanksley SD (2009) A detailed synteny map of the eggplant genome based on ortholog set II (COSII) markers. *Theor Appl Genet* 118:927-935
- Xu J, Pan Z, Prior P, Zhang Z, Zhang H, Zhang L, He L, Feng J (2009) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641-653
- Zeng ZB (1994) Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136:1457-1468



**Figure 17.** Carte génétique issue du croisement entre MM738 et AG91-25 chez l'aubergine. Les astérisques signalent les marqueurs présentant une distorsion de ségrégation. \* :  $\chi^2$  significatif au seuil 5%, \*\* :  $\chi^2$  significatif au seuil 1%, \*\*\* :  $\chi^2$  significatif au seuil 0,1%. Les microsatellites sont en gras. Les facteurs génétiques impliqués dans la résistance aux souches CMR134, PSS366 et GMI1000 (en rouge) et à la souche PSS4 (en bleu) sont indiqués sur la carte.

## 2. Complément d'article

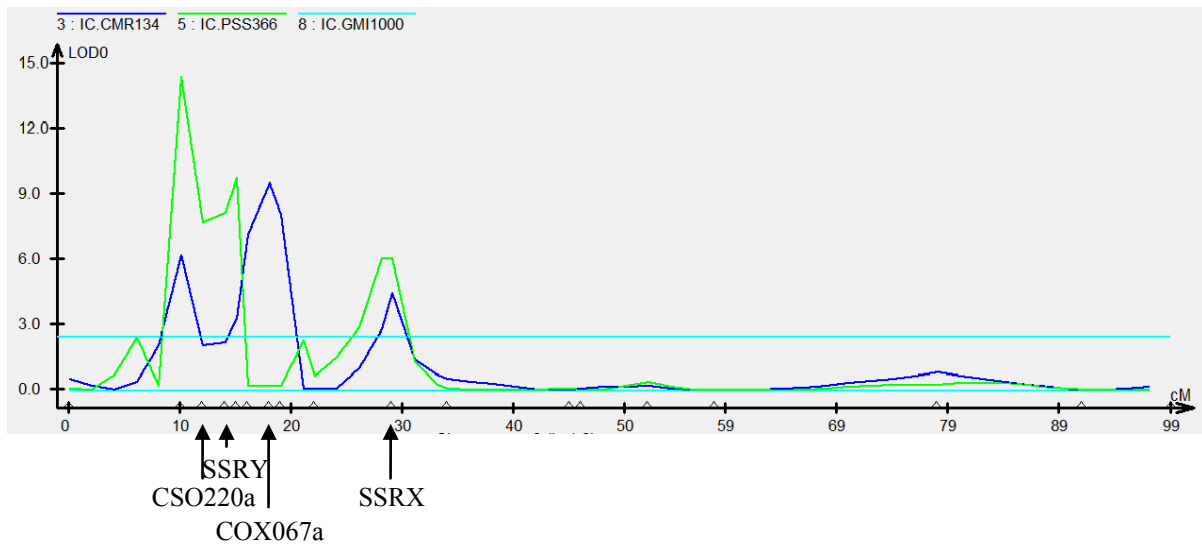
### COMPLÉMENT D'INFORMATION CONCERNANT LE DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE

Une meilleure couverture de notre carte, avec un plus grand nombre de marqueurs, serait nécessaire pour détecter tous les facteurs de résistance issus de AG91-25 et valider définitivement l'hypothèse de l'existence d'un seul locus majeur de résistance. Pour cela, d'autres combinaisons AFLP peuvent générer des marqueurs dominants supplémentaires, notamment en utilisant des enzymes de restriction différentes telles que *Pst*I qui est sensible à la méthylation du C, comme l'ont fait Barchi et al. (2010) sur leur carte intraspécifique d'aubergine. Il est envisageable également de tester d'avantage de combinaisons SRAP/RGA à l'exemple de Mutlu et al. (2009) sur une autre carte intraspécifique de l'aubergine, ou enfin et surtout d'utiliser des marqueurs SNP pouvant générer de nombreux marqueurs polymorphes chez l'aubergine, comme l'a fait l'équipe de Fukuoka et al. (2010).

Nous avons également testé un certain nombre de marqueurs COS cartographiés chez la tomate, l'aubergine et le piment, et qui ont servi à l'analyse génétique comparative entre les 3 espèces (Wu et al. (2009b)). Mais moins de 5 % d'entre eux se sont révélés polymorphes sur notre population intraspécifique et aucun n'a pu être cartographié. Néanmoins, d'autres enzymes de restriction devraient être testés pour augmenter le polymorphisme des marqueurs COS, dont l'intérêt majeur est leur rôle d'ancrage des cartes aubergine et piment sur la carte tomate, et qui s'ajouteraient ainsi à la vingtaine de marqueurs SSR que nous avons cartographiés.

Cette carte génétique est incomplète du fait du nombre limité de marqueurs la composant, des 18 LGs qu'elle comporte au lieu des 12 attendus (**Figure 17**), et de sa longueur totale < 800 cM, alors que la carte intraspécifique la mieux couverte (Fukuoka et al. 2010) est de 1250 cM. Notre carte, malgré ses limites, a néanmoins permis de mettre en évidence un gène majeur contrôlant spécifiquement les souches CMR134, PSS366 et GMI1000. Le locus est situé dans une zone de marqueurs AFLP très fortement distordus, qui pourrait correspondre à une portion, introgressée en bloc, du génome de *S. aethiopicum* MM134, qui est l'une des accessions entrant dans le pedigree complexe de AG91-25 (Ano et al. 1991). En effet, la suppression de la recombinaison dans les segments génomiques introgressés à partir d'espèces apparentées, a été déjà observée dans plusieurs études (Francia





**Figure 18.** Courbe de LOD obtenues suivant la méthode SIM sur le groupe de liaison 2, pour la variable indice de colonisation pour les souches CMR134, PSS366 et GMI1000.

**Tableau 14.** Détection des facteurs génétiques associés à la résistance de la souche *R. solanacearum* indonésienne (phylotype I) basés sur les analyses CIM et la SIM du pourcentage de plante flétries à 21 jours après inoculation chez la population RILs F<sub>6</sub>.

LG <sup>a</sup>	QTL		CIM			SIM		
	Pos. (cM) <sup>b</sup>	Intervalle entre les marqueurs	LOD <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sup>d</sup>	a <sup>e</sup>	LOD	R <sup>2</sup>	a
13	0	SSRZ-COI393a	25.26	51.5	-13.16**	11.42	25.6	-0.4
13	12	SSRW-CR098b	-	-	-	21.49	45.9	-12.6**
2	48	CAX057b-COI283b	-	-	-	12.34	27.3	-1.09
R <sup>2</sup> total <sup>f</sup>				42.3			42.4	

<sup>a</sup> LG: Groupe de liaison, <sup>b</sup> Pos.: Position du QTL du groupe de liaison, <sup>c</sup> LOD: Valeur maximale du log de la vraisemblance, <sup>d</sup> R<sup>2</sup>: pourcentage de la variation phénotypique expliquée par le QTL calculé par PLABQTL, <sup>e</sup> a: valeur estimée de l'effet additif. Le signe de a indique l'origine de l'allèle contribuant à la résistance: valeur négative provenant du parent résistant (AG91-25), <sup>f</sup> R<sup>2</sup> total: (%) somme des effets pour un caractère de résistance expliqués par les marqueurs liés au QTL calculé par PLABQTL.

et al. 2005). L'efficacité du gène, qui bloque la colonisation et le flétrissement suggère qu'il a un effet pléiotropique. Néanmoins, il pourrait aussi s'agir de deux gènes proches, non distinguables avec notre nombre réduit de marqueurs, chacun étant spécialisé dans le contrôle d'un des deux traits de la résistance.

La détection de ce locus majeur a été confirmée avec l'utilisation du logiciel QTLCartographer version 2.5 (Wang et al. 2010) (WinQTL) et de trois méthodes d'analyse: l'ANOVA analyse marqueur par marqueur, les méthodes SIM et CIM. On détecte le même gène majeur sur le LG2, contrôlant les souches CMR134, PSS366 et GMI1000, et les mêmes QTLs mineurs spécifiques de la souche PSS4 (**Figure 18**).

Par ailleurs, très récemment, nous avons pu analyser les résultats (obtenus par l'un des partenaires du contrat ayant financé nos recherches) du phénotypage de la population RILs face à une souche virulente (SV) du phylotype I et originaire d'Indonésie. Ce test, bien qu'effectué dans des conditions environnementales différentes de la Réunion et selon une technique d'inoculation également différente (30ml d'inoculum concentré à  $10^8$  cfu/ml déposés par plant, au lieu de 100-200mL d'inoculum à  $10^6$  cfu/ml), a fourni des résultats similaires à ceux obtenus à la Réunion avec la souche PSS4. On observe dans les ceux cas le contournement du gène majeur par les souches SV et PSS4, et l'expression d'une résistance partielle dans la phase précoce de l'infection (à 21 jours). Cependant, à la différence de l'essai conduit à la Réunion avec la souche PSS4, AG91-25 s'est montré extrêmement résistant face à la souche indonésienne puisqu'à la fin de l'essai, aucune plante n'a été notée flétrie à 35 jours. Le fait que les QTLs associés à la résistance soient les mêmes que ceux révélés par PSS4 (**Tableau 14**), suggère qu'ils sont spécifiques des souches virulentes qui contournent le gène majeur, du moins pour les souches du phylotype I. La confrontation de la résistance face à des souches appartenant à d'autres phylotypes, permettrait de déterminer si ces QTLs sont spécifiques à certaines souches du phylotype I ou s'ils sont spécifiques de certaines souches, quel que soit leur phylotype d'appartenance.

# Conclusions et perspectives

## Conclusion et perspectives

La lutte intégrée contre le flétrissement bactérien chez les solanacées (tomate, aubergine et piment) nécessite certainement la construction de nouveaux génotypes dotés de résistances plus durables, en particulier capable de contrôler une majorité des nombreuses souches qui constituent le complexe d'espèce *R. solanacearum*. Ce projet ambitieux a impliqué d'acquérir des connaissances nouvelles sur les interactions possibles entre les solanacées et la diversité phylogénique des souches chez *R. solanacearum*. De même, les bases de la génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine devaient être établies pour venir exploiter ultérieurement la forte synténie entre ces espèces, car ces bases existaient déjà chez la tomate et le piment.

Mes travaux de thèse ont le mérite de fournir des outils immédiatement applicables pour les sélectionneurs œuvrant au contrôle du flétrissement bactérien. Les résultats publiés dans *Phytopathology* ont véritablement vocation à nourrir différents modèles qui pourront en être extrait, afin de servir toutes études visant à mieux comprendre les mécanismes de résistance au flétrissement bactérien chez les Solanacées.

### **1. Caractérisation des propriétés des sources de résistances chez la tomate, l'aubergine et le piment confrontées à la diversité des souches de *R. solanacearum***

L'étude des interactions entre une collection de 30 accessions de solanacées (tomate, aubergine, piment), Core-TEP, et une collection de 12 souches représentatives de la diversité chez *R. solanacearum* phylotypes I, II et III, Core-Rs2, m'a permis de définir six phénotypes allant de très résistant à très sensible. Des groupes de souches ont été constitués en fonction des profils de virulence et d'agressivité, le pathoprofil dans le cas de la Core-TEP, et le pathotype dans le cas d'une espèce hôte en particulier (tomate, aubergine ou piment). Nous cherchons, par l'établissement du pathoprofil ou du pathotype de telle ou telle souche de *R. solanacearum* étudiée, à conférer une valeur prédictive du comportement de la source de résistance confronté à ce type de souches et donc d'anticiper sur le fond génétique le plus adapté à déployer au champ. Même si l'ampleur des travaux réalisés est considérable, il est

bien entendu nécessaire de compléter l'étude avec d'autres souches, afin de définir au mieux les différents pathoprofils et pathotypes et leurs spécificités d'interaction, soit en les établissant à partir de la Core-TEP, soit à partir d'un nombre plus restreint d'accessions comme la Core-TEP2 s'il s'agit d'étudier un plus grand nombre de souches.

Ces données expérimentales ont été recueillies en condition contrôlée et réclament donc d'être validées en condition naturelle, avec des tests au champ. Certains partenaires privés, impliqués dans ce projet, ont réalisé des essais en serre avec la Core-TEP inoculée avec 4 souches provenant d'Asie (2 souches indonésiennes du phylotype I testées par Vilmorin & Cie et 2 souches taïwanaises du phylotype I et II testées par l'AVRDC) (communications personnelles de T. Jaunet de Vilmorin & Cie et de J-F. Wang et C-H. Lin de l'AVRDC). Bien que l'indice de colonisation ne soit pas indiqué pour toutes les interactions, il est quand même possible de définir les phénotypes d'interaction et d'en déduire les différents profils de virulence et d'agressivité pour chacune des souches et donc de leur assigner un pathoprofil.

D'un point de vue académique, les résultats des interactions Core-TEP x Core-Rs2 fournissent aussi une base unique au monde pour la recherche d'effecteurs bactériens impliqués dans l'interaction hôte-pathogène (communication personnel des travaux en cours d'E. Wicker, CIRAD 3P). La comparaison des pathoprofils et les phénotypes définis ici avec les données d'hybridation génomique comparative (CGH) fournies par la puce pangénomique 7K qui rassemble 7000 gènes communs et spécifiques dans le complexe d'espèces de *R. solanacearum* (Guidot et al. 2009a) a permis d'identifier des répertoires de gènes bactériens codant pour des effecteurs de type III spécifiquement associées à la virulence ou à l'avirulence. Un certain nombre d'effecteurs putatifs ont été identifiés en confrontant les répertoires d'effecteurs provenant d'une collection de 48 souches et les phénotypes de virulence ou d'avirulence de ces souches sur deux lignées résistantes d'aubergine et une lignée résistante de tomate appartenant à la Core-TEP (stage de Flora Pensec). Les phénotypes observés au cours de ces travaux viennent bien confirmer ceux que nous avons définis lors de l'interaction Core-TEP x Core-Rs2. L'exception est la souche CFBP6783 provenant de Martinique, dont le comportement a été très peu agressifs sur les aubergines y compris sur leur témoin sensible. Dans son rapport de stage, Pensec déduit que le répertoire d'effecteur ne peut pas expliquer le phénotype d'une souche chez *R. solanacearum*. Cependant, la comparaison du contenu en effecteurs des trois souches CMR134, PSS366, GMI1000 et de la souche très agressive PSS4 montre que certains effecteurs comme RSc0826 (PopP1), RSp0572 (HopH1 like), et RSc0868 (PopP2) étaient présents chez ces trois souches

et absent chez PSS4. RSp0572 a été identifié chez *R. solanacearum* (Salanoubat et al. 2002) comme un homologue de HopH1 (Hop, Hrp outer protein), anciennement nommé HopPtoH, décrit chez *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (Petnicki-Ocwieja et al. 2002).

PopP1 et PopP2 sont des protéines d'avirulence de la souche GMI1000 inoculée au pétunia St40 (Lavie et al. 2002) et sur l'écotype Nd-1 d'*Arabidopsis* (Deslandes et al. 2002), respectivement. Le contenu en effecteur pourrait peut-être expliquer pourquoi le locus majeur de résistance observé lors des interactions avec les souches CMR134, PSS366, GMI1000 est contournée lors de l'interaction avec PSS4.

Il est possible de phénotyper la population RILs F<sub>6</sub> issue du croisement MM738 x AG91-25 avec d'autres souches de *R. solanacearum* de phylotype I pour confirmer la présence du locus majeur de résistance lorsque la population est inoculée par des souches pour lesquelles les effecteurs sont présents et qui devront être peu agressifs, voire avirulent sur AG91-25 et très agressifs sur MM738. Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'analyse du contenu en gènes d'effecteurs de type III de PSS358, dernière souche de phylotype I de la Core-Rs2, qui est agressifs sur MM738 mais pas sur AG91-25, et le phénotypage à partir de cette souche et la cartographie de facteurs génétique résultante. Autrement dit, la recherche de facteurs génétiques à partir de souches appartenant à d'autres phylotypes permettrait de vérifier si ce contenu en effecteur est ou non une spécificité du phylotype I. Les souches de la Core-Rs2 pour lesquelles le contenu en gènes des effecteurs de type III est connu (E. Wicker, communication personnelle) et pour lesquelles le phénotype d'interaction avec les parents de la population lors des tests en chambre climatique est connu, donneraient une indication sur la spécificité/aspécificité du contenu en gènes. Du point de vue contenu en gènes d'effecteurs de type III, CMR32 (phylotype III) et CFBP3059 (phylotype III) possèdent le gène popP1, CMR32, CMR39 (phylotype IIA) et CMR15 (phylotype III) possèdent le gène HopH1 like, CFBP3059, CMR32, CMR39 et CMR15. Du point de vue des phénotypes, CFBP3059 est agressif sur AG91-25 (4) et MM738 (5) ; CMR32 est peu agressif sur MM738 (3.1) et pas du tout sur AG91-25 (1) avec 0% d'indice de colonisation ; CMR39 est agressif sur MM738 (4) et pas du tout sur AG91-25 (1) ; CMR15 est très agressif sur AG91-25 et MM738 (5). La comparaison des phénotypes observés en chambre climatique associé au contenu en effecteurs de type III ne permet pas de conclure sur le rôle de ces effecteurs dans l'interaction hôte-pathogène.

L'action de ces effecteurs dans l'interaction avec la résistance de AG91-25 et les trois souches CMR134, PSS366, GMI1000 pourrait être confirmée par mutagénèse dirigée. La

modification artificielle de la séquence nucléotidique d'un des gènes de ces effecteurs de type III (popP1, popP2) permettrait de modifier l'activité biologique qui en découle. Ainsi, si les mutants obtenus présentent un phénotype différent de la bactérie sauvage alors le gène de l'effecteur de type III muté intervient bien dans l'absence d'agressivité de la souche bactérienne face à AG91-25. De tels mutants existent pour la souche GMI1000 mais ils n'ont pas été testés sur l'aubergine. Il serait également intéressant de tester AG91-25 avec une souche PSS4 mutée possédant le(s) gène(s) popP1et/ou popP2 et de regarder s'il y a rétablissement de la reconnaissance de la bactérie par la plante qui se traduirait par une résistance élevée de AG91-25.

Ce travail de thèse a certainement contribué à la compréhension de la génétique de la résistance, ainsi qu'à la détection de quelques facteurs génétiques impliqués dans ce déterminisme.

### **2. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25**

Cette étude a permis de mettre en évidence le deuxième gène de résistance à une maladie chez l'aubergine, après le gène majeur dominant contrôlant la résistance à l'anthracnose des fruits (Kaan, 1973). La cartographie chez l'aubergine du gène majeur dominant *ERs1* contrôlant différentes souches du phylotype I et totalement contourné par la souche virulente PSS4 de ce même phylotype constitue une base pour ensuite étudier l'interaction aubergine/*R. solanacearum*, essayer de comprendre quelles sont ses bases moléculaires et ainsi comprendre son contournement. Les difficultés que nous avons rencontrées pour produire des marqueurs polymorphes et les cartographier dans notre population intraspécifique sont comparables à ceux rencontrés par d'autres auteurs. Néanmoins, environ 200 marqueurs ont pu être génotypés et utilisés pour cartographier cette résistance. Les différentes approches utilisées convergent et montrent la présence d'un locus porteur d'un facteur majeur expliquant jusqu'à près de 87% de la part de la variation phénotypique expliquée. Les hypothèses de départ suite aux analyses mendéliennes sur les générations F<sub>2</sub>, BC<sub>1s</sub> et la descendance RILs F<sub>6</sub> n'ont pas été totalement confirmées par l'analyse QTL qui n'a permis de mettre en évidence qu'un seul facteur majeur, contrairement aux deux ou trois

attendus. La présence d'un autre facteur majeur dans une région non couverte du génome est néanmoins peu probable mais pas à écarter totalement. Dans ce cas, son action ne changerait pas le résultat final, étant donné que la quasi-totalité de la variation est expliquée par le gène *ERs1*. Une autre éventualité est la présence de deux facteurs majeurs au même locus sur le groupe de liaison 2, non distinguables par l'approche QTL. Si *ERs1* apparaît clairement suffisant pour contrôler la résistance vis-à-vis de certaines souches du phylotype I, il n'est pas du tout efficace vis-à-vis de certaines souches virulentes comme les souches asiatiques PSS4 et la souche indonésienne (Vilmorin & Cie), comme nous l'avons démontré. De plus, qui dit gène majeur, dit risque de contournement à plus ou moins long terme. Une priorité est donc de tester l'efficacité de ce gène vis-à-vis des autres phylotypes et souches de la bactérie, de façon à préciser son spectre d'action et préciser les zones de culture dans lesquelles le déployer.

*R. solanacearum* possède un arsenal d'effecteurs qui sont susceptibles d'intervenir dans la pathogénicité de la bactérie. Ces effecteurs sont majoritairement des déterminants de la virulence, cependant certains de ces effecteurs jouent un rôle dans l'avirulence. Ce sont des protéines caractérisées par une région centrale de répétitions en tandem et un domaine de signal nucléaire (NLS). Chez *R. solanacearum*, trois effecteurs ont été décrits comme étant des protéines d'avirulence : AvrA, PopP1 et PopP2. Les séquences des gènes *popP1* et *popP2* sont présentes chez CMR134, PSS366 et GMI1000 mais absentes chez PSS4 comme le montrent des travaux en cours au sein de l'équipe (Wicker, communication personnelle). Chez les solanacées, les gènes codant pour les protéines R connues pour interagir spécifiquement avec ces protéines d'avirulence, constituent potentiellement des gènes candidats. A ce jour, le seul gène R de résistance à *R. solanacearum* connu est le gène *RRS1-R* chez *Arabidopsis*, qui a été démontré interagir spécifiquement avec *popP2* de la souche GMI1000 (phylotype I). Les tentatives préliminaires pour trouver des orthologues de ce gène chez la tomate (Carmeille, 2006) n'ont rien donné. Des recherches avec le logiciel BLAST (basic alignment search tool) dans le génome de l'aubergine n'ont pas permis d'identifier de séquence homologue dans le génome de l'aubergine. La première conclusion est que *ERs1* contrôlerait un mécanisme différent de celui mise en évidence chez *Arabidopsis*.

La présence d'un QTL à effet intermédiaire agissant à un stade précoce de l'infection par une souche virulente contournant le gène majeur n'est pas à négliger. Ce QTL, qui explique plus de 40 % de la variation phénotypique de la résistance testée face à la souche indonésienne et permet donc un contrôle au moins partiel d'une telle souche, doit aussi être sélectionné. L'existence de tels QTLs dans les sources de résistance est probablement fréquente comme



pour beaucoup de caractères de résistance à des maladies et ravageurs. Leur exploitation en sélection est plus difficile que les gènes majeurs mais ils peuvent être sélectionnés en partie avec le fond génétique par les méthodes classiques phénotypiques.

Néanmoins, il faut poursuivre la recherche d'autres facteurs majeurs de résistance dans le germplasm de l'aubergine, dans l'optique à terme de pyramider différents gènes /QTLs susceptibles de contrôler différents mécanismes de défense chez la plante. Les études menées ailleurs sont rares et concernent exclusivement l'Asie. Elles font référence à des souches de la bactérie pas clairement identifiées, du moins par rapport au système de classification par phylotype, et ne permettent pas de se faire une idée de la diversité de la résistance chez l'aubergine. Cette diversité doit être mieux connue car la résistance multiple est la seule solution à long terme pour contrôler au mieux le pathogène et sa grande diversité, avec une inconnue majeure qui est celle de l'évolution des populations bactérienne soumises à la pression de sélection exercée par la résistance et leur potentiel de faire émerger de nouvelles souches virulentes. Une seule publication (Daly, 1976) mentionne l'accroissement d'agressivité des populations dans les champs de Martinique et de Guadeloupe, suite à la culture intensive de l'hybride F<sub>1</sub> Kalenda, initialement partiellement résistant. De ce point de vue, notre étude constitue une étape majeure pour étudier la durabilité de la résistance, dans un premier temps en confrontant *ERs1* à des populations de la bactérie et leur potentiel évolutif. La population F<sub>2</sub> issue du croisement MM738 x MM195 et sur laquelle a été établie la carte de référence actuelle de l'aubergine (Doganlar et al. 2002a) a été testée contre la souche PSS4 et les analyses en cours apporteront une première indication sur la diversité génétique des facteurs de résistance disponibles pour contrôler une telle souche virulente. Les premières analyses montrent une résistance partielle précoce, ensuite contournée comme dans le cas de l'aubergine AG91-25, et probablement sous le contrôle de QTLs mineurs. Cela tendrait à montrer qu'au stade actuel des recherches, on ne dispose pas encore de facteurs génétiques efficaces pour contrôler ces souches virulentes.

La macro-synténie entre les génomes de l'aubergine, de tomate et de piment permet de comparer les régions génomiques associées à la résistance. Grâce au marqueur SSRX présent à proximité du gène majeur, nous avons tenté d'établir un lien avec la région correspondante chez la tomate sur le bras long du chromosome 9. Dans la région du marqueur SSRX, seul un gène majeur de résistance à *Phytophthora infestans* a été cartographié (*Ph-3*) (Chunwongse et al. 1998). La question se pose de savoir s'il s'agit d'une coïncidence ou d'une forme allélique d'un gène homologue chez la tomate qui aurait évolué pour conférer la résistance à ce champignon. En tout état de cause, aucun QTL de résistance à *R. solanacearum* n'a été

déecté dans cette zone chez la tomate. En ce qui concerne les QTL mineurs que nous avons déectés chez l'aubergine, il serait intéressant de voir si l'un d'entre eux correspond chez la tomate au locus portant le QTL majeur généraliste dans la zone du cluster de gènes/QTLs de résistance du chromosome 6. L'approche synténique tentée par Mahbou (2010) entre le piment et l'aubergine s'est soldée plutôt par un échec, aucun locus de résistance ne correspondant clairement chez les deux espèces.

La caractérisation et le séquençage d'*ERsI* sont un préalable indispensable si l'on veut comprendre son mode d'action et si l'on veut vérifier l'hypothèse d'une relation de type gène pour gène dans le contrôle de la résistance. Une fois la nature d'un gène R confirmée, il sera possible de connaître l'effecteur bactérien avec lequel il interagit. Cela permettra pratiquement de cibler les souches vis-à-vis desquelles il faudra donc déployer le gène. Le clonage positionnel est une technique qui a permis d'identifier plusieurs gènes de résistance à des maladies et ravageurs chez la tomate (Foolad 2007). Le succès des gènes clonés chez la tomate nous laisse supposer qu'il est possible de réaliser le clonage positionnel d'*ERsI* chez l'aubergine, du fait surtout des nombreux outils génomiques disponibles actuellement chez l'espèce modèle proche qu'est la tomate. Le fait d'avoir positionné ce gène dans un intervalle réduit de l'ordre du cM, nous laisse entrevoir la possibilité de densifier cette zone, notamment à l'aide de marqueurs de type AFLP, mais également SRAP et RGA qui correspondent à des régions codantes du génome. La cartographie de marqueurs RGA permettrait de cibler dans la zone un gène de résistance candidat qui pourrait correspondre à notre gène majeur. Cette technique a déjà été utilisée avec succès chez *Arabidopsis* (Aarts et al. 1998), la laitue (Shen et al. 1998), le soja (*Glycine max* L.) (Kanazin et al. 1996), le tournesol (*Helianthus annuus* L.) (Gentzbittel et al. 1998), le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) (López et al. 2003; Mutlu et al. 2006), la pomme de terre (Leister et al. 1996) et le piment (Pflieger et al. 1999) et al. 1999). Chez *S. melongena*, Mutlu et al. (2008) ont déecté, au cours d'une approche BSA, un gène majeur de résistance à *F. oxysporum* f. sp. *melongenae* en utilisant des marqueurs de type SRAP, RGA, SRAP-RGA. Toppino et al. (2008) ont mis en évidence, pour le même agent pathogène, l'existence de deux formes alléliques d'un gène majeur de résistance, *Rfo-Sal*, issu de *S. aethiopicum* groupe *Aculeatum* (= *S. integrifolium*) et groupe *Gilo*, et qu'elles ont introgressé dans le génome de l'Aubergine par fusion somatique. Ils ont développé des marqueurs RADP puis des CAPS étroitement liés. Des marqueurs polymorphes de ce type doivent être cartographiés dans cette zone. Comme nous l'avons constaté au cours de notre étude, cela demanderait des améliorations importantes des protocoles et l'emploi de techniques de révélation plus efficaces pour ce type de marqueur. La difficulté de

cartographier des marqueurs polymorphes en nombre suffisant dans la zone sur une population intraspécifique risque d'être un facteur limitant pour la réussite d'une telle entreprise. L'intervalle de confiance autour du gène est réduit (>4 cM) mais cela peut se traduire par des millions de paires de bases et donc plusieurs centaines de gènes (Dupuis and Siegmund 1999). Ainsi, l'approche classique de « marche chromosomique » peut prendre un temps considérable avant de cibler le clone génomique contenant le gène. La cartographie à haute résolution dans l'intervalle portant le gène nécessite en outre de tester des milliers d'individus. Ensuite, en supposant que l'on ait franchi les deux premières étapes, il restera à identifier le bon clone et à identifier le gène parmi les ADNc criblés. Au final, le processus est long, coûteux et le succès n'est pas garanti. Néanmoins, l'exemple du gène *Pto* de résistance à *Pseudomonas syringuae* (Martin et al. 1993) montre qu'il est possible de cloner un gène de résistance à une bactérie chez les solanacées.

L'approche gène-candidat peut également aider à caractériser le gène soit sur la base de connaissance des mécanismes moléculaires et physiologiques (gènes candidats dits fonctionnels), soit la liaison du gène candidat au locus d'intérêt étant caractérisée comme étroitement liée (gènes candidats dits positionnels). Cette approche est largement utilisée dans le domaine de la génétique humaine et animale (Rothschild and Soller 1997; Tabor et al. 2002; Wayne and McIntyre 2002) mais aussi en génétique des plantes (Byrne and McMullen 1996; Pflieger et al. 2001). La définition d'un gène candidat diffère selon la discipline concernée, pour les physiologistes, il s'agit d'un gène impliqué dans l'expression d'un caractère alors que pour les généticiens, c'est un gène polymorphes potentiellement impliqués dans la variation du caractère (Pflieger et al. 2001). On peut par exemple rechercher une activité enzymatique co-ségrégeant avec le locus de résistance. Dans le cas du contrôle de la bactérie dans la plante, Aribaud et al. (2010) ont mis en évidence une activité amine-oxydase beaucoup plus importante chez l'accession sauvage résistante *S. torvum* que chez une aubergine cultivée sensible, cela au niveau pariétal comme au niveau soluble. Ces travaux qui se poursuivent actuellement sur les deux parents de notre population donnent des pistes concernant de telles activités enzymatiques qui pourraient être à l'origine d'une résistance à la bactérie chez l'aubergine. Une approche de génétique inverse ou « reverse », basée sur l'utilisation de la transformation génétique (transformation ciblée ou mutagénèse aléatoire), constitue également un outil qui peut aider à cibler un gène candidat au flétrissement bactérien.

### 3. *Perspectives*

#### 3.1. Sur le plan de la sélection de la résistance

Le transfert et la sélection de la résistance dans des cultivars d'aubergine commerciaux de type hybrides  $F_1$  est relativement aisé avec un gène majeur dominant. Il suffit pour cela de disposer de marqueurs facilement utilisables et reproductibles liés à ce gène. La conversion des deux marqueurs AFLP flanquant le gène en marqueurs de type SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) ou CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) fournirait aux sélectionneurs les outils moléculaires pour mettre en pratique la SAM sur ce caractère, et ainsi minimiser le nombre de cycle de sélection sous inoculation artificielle. A l'extrême limite, il serait possible de se contenter de sélectionner uniquement sur marqueurs les individus porteurs de l'allèle de résistance jusqu'en  $BC_3F_2$  et de ne réaliser un cycle d'infestation qu'à la fin du schéma de transfert de la résistance dans la lignée receveuse. La conversion en marqueurs SCAR codominants faciliterait ce transfert et la fixation du gène. La dominance complète du gène se traduira par une résistance totale transférable dans des formules hybrides, à côté d'autres gènes apportés par l'un ou l'autre des géniteurs. Dans l'immédiat et en attendant la production de ces marqueurs, il est possible d'utiliser les marqueurs microsatellites SSRY et SSRX entourant le locus. Etant donné les risques de contournement à plus ou moins long terme d'un tel gène majeur (Gallais 1990; McDonald and Linde 2002), il convient de l'utiliser en combinaison avec les autres résistances disponibles, y compris celles reposant sur des QTLs et pouvant être sélectionnées avec ou sans l'aide des marqueurs. A ce titre, le QTL sur le LG13 peut être sélectionné en se servant du marqueur microsatellite SSRZ trouvé lié, sans négliger les facteurs mineurs sélectionnés au cours des choix phénotypiques face à la résistance. La perspective à plus long terme de pyramider des gènes d'origines différentes Ainsi, le coût de la virulence sera multiplié par le nombre de gènes R introduit dans cette variété d'aubergine résistante (Pedersen and Leath 1988). C'est la seule stratégie pouvant retarder l'apparition de variants virulents de la bactérie.

L'objectif de la durabilité de la résistance se heurtera néanmoins à la probabilité d'émergence de souches hyper virulentes dans les zones de culture intensive et fortement infestées, comme cela s'est déjà manifesté aux Antilles françaises pour l'hybride commercial résistant au flétrissement bactérien,  $F_1$  Kalenda (Daly, 1976). C'est pourquoi les autres méthodes de lutte

doivent également être utilisées en parallèle de la résistance variétale, notamment pour la production en serres, cela de façon à diminuer les quantités d'inoculum dans les plants et la probabilité d'adaptation de la bactérie.

### 3.2. Sur le plan académique

Les données qui ont été présentées sur la biologie des différentes souches de *R. solanacearum* et leurs interactions différentielles avec l'hôte permettent de comprendre la difficulté de régler le problème posé par le flétrissement bactérien au plan international. La recherche d'une propriété de résistance « universelle » semble bien illusoire. En revanche, combiner différentes propriétés de résistances portées par différents fonds génétiques est un pari qui semble accessible et qui mérite d'être relevé. La description d'un système génétique d'héritabilité simple (gène majeur dominant) gouvernant une résistance solide et mise en échec par seulement une minorité de souches chez l'aubergine est un événement à la portée remarquable. Il s'agit désormais de mettre en perspectives l'ensemble de ces résultats dans une approche de génomique comparative, aussi bien pour ce qui concerne le contenu en gène et l'organisation des génomes bactériens contrôlés ou non par telle ou telle source de résistance, que dans le cas des processus et mécanismes de résistance développés par telle ou telle source de résistance. L'ère des « omics » permet une telle approche sans *a priori* et les travaux développés dans l'équipe qui m'a accueillie seront exploités pour mieux comprendre ce qu'est la résistance variétale et de quels répertoires de gènes ou moyens de régulations doivent disposer les souches capable de contourner les différentes propriétés de résistance ou de tolérance. Cela nécessite une exploration avec une résolution absolue et à haut débit des génomes bactériens. Cela est rendu possible compte tenu du développement de programmes en (i) génomique comparative des souches de *R. solanacearum* (Remenant et al. 2010), associé (ii) au développement d'une puce à ADN pangénomique (11000 gènes identifiés) utilisée pour comparer de nombreux génomes bactériens (Cellier and Prior 2010). Finalement, les avancées technologiques dans le domaine du séquençage permettent maintenant d'envisager de disposer rapidement de centaines de génomes chez *R. solanacearum* afin de compléter le pangénome chez cette espèce et d'identifier les souches intermédiaires qui font encore défauts pour mieux comprendre le passé évolutif des souches, voire des pathoprofiles que nous avons présentés.

Du côté de la génomique chez la plante, ici encore les avancées en matière d'exploration moléculaires laissent à penser que le clonage du gène *ERs1* est une étape qui n'est pas infranchissable si les moyens techniques et financiers sont consentis, et force sera alors de constater que ce sera le premier gène de résistance au flétrissement bactérien qui aura été cloné. J'écarte volontairement le gène *RRS1* qui confère une résistance partielle à certaines souches de *R. solanacearum* chez certains écotypes de la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Comme nous l'avons vu, il est fort probable que *ERs1* soit porté par de l'ADN introgressé de *S. aethiopicum*, l'aubergine botanique africaine. La recherche d'orthologues dans d'autres fonds génétiques est une voie de recherche prometteuse, en tout cas les propriétés de ce gène devront être établies rigoureusement et faire l'objet d'une approche de génomique fonctionnelle en collaboration avec des équipes internationales.

Au final, une sélection efficace de la résistance à *R. solanacearum* n'est possible qu'à travers la compréhension précise des déterminants génétiques gouvernant celle-ci chez les Solanacées, et des composants de la virulence de la bactérie. Ce travail de thèse, qui a conjugué la génétique de trois hôtes appartenant à la famille des Solanacées, à la génétique de la bactérie, contribue à la compréhension de la génétique de la résistance chez l'aubergine par la détection de facteurs génétiques à spectre souche spécifique, ainsi qu'à la structuration du pouvoir pathogène des souches bactériennes en pathoprofiles et pathotypes, sur la base des phénotypes qu'elles induisent chez les Solanacées.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- Aarts MGM, Lintel Hekkert Bt, Holub EB, Beynon JL, Stiekema WJ, Pereira A (1998) Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:251-258
- Abdullah H, Maene LM, Naib H (1983) The effects of soil types and moisture levels on bacterial wilt disease of groundnut (*Arachi hypogaea*). *Pertanika* 6:26-31
- Acosta J, Gilbert J, Quinon V (1964) Heritability of bacterial wilt resistance in tomato. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 84:455-461
- Adie BAT, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:1665-1681
- Adler J (1966) Chemotaxis in Bacteria. *Science* 153:708-716
- Afroz A, Khan MR, Ahsan N, Komatsu S (2009) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. *Peptides* 30:1600-1607
- Akiba F, Ribeiro R de LD, Castro LAB de, Robbs CF, Kimura O, Sudo S 1972. Resistance to bacterial wilt in the eggplant variety Nihon Nassu. *Archivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* 2(2): 7-21.
- Akiew S, Trevorrow PR, Kirkegaard J (1996) Mustard green manure reduces bacterial wilt. *ACIAR Bacterial wilt Newsletter* 13:5-6
- Aldon D, Brito B, Boucher C, Genin S (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO Journal* 19:2304-2314
- Ali M, Quadir MA, Okubo H, Fujieda K 1990. Resistance of eggplant, its wild relatives and their hybrids to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Scientia Horticulturae* 45(1-2): 1-9.
- Allen C, Gay J, Simon-Buela L (1997) A regulatory locus, *pehSR*, controls polygalacturonase production and other virulence functions in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 10:1054-1064
- Allen C, Huang Y, Sequeira L (1991) Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 4:147-154
- Álvarez B, Lopez MM, Biosca EG (2008a) Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology* 154:3590-3598
- Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, Trigalet-Démery D, López MM, Trigalet A (2008b) Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* 98:59-68
- Andrews J (1984) Peppers- the domesticated Capsicums. University of Texas Press, Austin
- Angot A, Peeters N, Lechner E, Vailleau F, Baud C, Gentzbittel L, Sartorel E, Genschik P, Boucher C, Genin S (2006) *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:14620-14625
- Angus JF, Gardner PA, Kirkegaard JA, Desmarchelier JM (1994) Biofumigation: Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit the growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162:107-112
- Anith KN, Momol MT, Kloepper JW, Marois JJ, Olson SM, Jones JB (2004) Efficacy of plant growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl, and soil amendment for integrated pest management of bacterial wilt of tomato. *Plant Disease* 88:669-673
- Ano G, Hébert Y, Prior P, Messiaen CM (1991) A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L. x *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11:555-560



- Ano G, Prior P, Manyri J, Vincent C (1990) Stratégies d'amélioration de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) pour la résistance au flétrissement bactérien causé par *Pseudomonas solanacearum* E.F.S. Journées maraîchères CIRAD-ORSTOM-INRA:570-579.
- Aribaud M, Jégo S, Wicker E, Fock I (2010) *Ralstonia solanacearum* induces soluble amine-oxidase activity in *Solanum torvum* stem calli. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:787-796
- Arlat M, van Gijsegem F, Huet JC, Pernollet JC, Boucher CA (1994) PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific *Petunia* genotypes, is secreted via the Hrp pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO Journal* 13:543-553
- Arthy JR, Akiew EB, Kirkegaard JA, Trevorrow PR (2002) Using *Brassica* spp. as biofumigants to reduce the population of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Bacterial Wilt Symposium*, p 25
- Arumuganathan K, Earle E (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9:208-218
- Asha Sankar 1982. Efficiency of four methods of selection in brinjal improvement in relation to resistance to bacterial wilt. M.Sc. (Hort.) thesis, College of Horticulture, Kerala Agricultural University, Vellanikkara, India.
- Bai Y, Huang CC, van der Hulst R, Meijer-Dekens F, Bonnema G, Lindhout P (2003) QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:169-176
- Balatero CH, Hautea DM (2001) Identification of AFLP and RGA markers associated with bacterial wilt resistance QTL derived from tomato *Lycopersicon pimpinellifolium*. In: van den Berg RG, Barendse GWM, van der Weerden GM, Mariani C (eds) *Solanaceae V: Advances in Taxonomy and Utilization*. Nijmegen University Press, The Netherlands, pp 225-243
- Baral J, Bosland PW (2002) Genetic diversity of a *Capsicum* germplasm collection from Nepal as determined by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J Amer Soc Hort Sci* 127:316-324
- Barchi L, Bonnet J, Boudet C, Signoret P, Nagy I, Lanteri S, Palloix A, Lefebvre V (2007) A high-resolution, intraspecific linkage map of pepper (*Capsicum annuum* L.) and selection of reduced recombinant inbred line subsets for fast mapping. *Genome* 50:51-60
- Barchi L, Lanteri S, Stigel A, Toppino L, Valè GP, Acciarri N, Rotino GL (2010) Construction of an intra-specific linkage map in eggplant (*Solanum melongena* L.). In: Prohens J, Rodríguez A (eds) *Advances in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Editorial de la universitat Politècnica de València, València, Spain, pp 359-366
- Ben Chaim A, Grube RC, Lapidot M, Jahn M, Paran I (2001) Identification of quantitative trait loci associated with resistance to cucumber mosaic virus in *Capsicum annuum*. *Theoretical and Applied Genetics* 102:1213-1220
- Bereau M, Messiaen CM (1975) Réceptivité comparée des sols à l'infestation par *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Phytopathology* 7:191-193
- Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, Briere C, de Wit PJGM, Marco Y, Deslandes L (2008) RD19, an Arabidopsis cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocated to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20:2252-2264
- Bertolla F, Frostegård Å, Brito B, Nesme X, Simonet P (1999) During infection of its host, the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* naturally develops a state of competence and exchanges genetic material. *Mol Plant-Microbe Interact* 12:467-472
- Bertolla F, Van Gijsegem F, Nesme X, Simonet P (1997) Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 63:4965-4968
- Bohs L (2007) Phylogeny of the *Cyphomandra* clade of the genus *Solanum* (*Solanaceae*) based on ITS sequence data. *Taxon* 56:1012-1026
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD (1988) RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103
- Bora LC, Bhattacharyya SK, Bora GC, Saikia BK 1993. Screening for resistance against bacterial wilt of brinjal in Assam. *J. of the Agric. Sci. Soc. Of North East India* 6:83-84.

- Bosland PW (1992) Chiles: A Diverse Crop. HortTechnology 2:6-10
- Bosland PW (1996) Capsicums: Innovative uses of an ancient crop. In: Janick J (ed) Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA.
- Bostein D, White RL, Skolnick M, David RW (1980) Construction of genetic maps in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet 32:314-331
- Boucher C, Genin S, Arlat M (2001) Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. Current concepts of pathogenicity in plant pathogenic bacteria. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie 324:915-922
- Boucher CA, Barberis PA, Demery DA (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. J Gen Microbiol 131:2449-2457
- Boucher CA, Gough CL, Arlat M (1992) Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on *hrp* genes. Annu Rev Phytopathol 30:443-461
- Boucher CA, Van Gijsegem F, Barberis P, Arlat AM, Zischek C (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. Journal of Bacteriology 169:5626-5632
- Brito B, Aldon D, Barberis P, Boucher C, Genin S (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum* *hrp* genes. Mol Plant-Microbe Interact 15:109-119
- Brito B, Marena M, Barberis P, Boucher C, Genin S (1999) *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by *PrhA* in *Ralstonia solanacearum*. Molecular Microbiology 31:237-251
- Brumbley SM, Carney BF, Denny TP (1993) Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of *PhcA*, a putative LysR transcriptional regulator. Journal of Bacteriology 175:5477-5487
- Brumbley SM, Denny TP (1990) Cloning of wild-type *Pseudomonas solanacearum* *phcA*, a gene that when mutated alters expression of multiple traits that contribute to virulence. Journal of Bacteriology 172:5677-5685
- Buddenhagen I, Kelman A (1964) Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu Rev Phytopathol 2:203-230
- Buell CR, Rensink A, Hart A, Rehfeld K, Liu J, Ly E (2006) Functional and comparative genomic resources for the *Solanaceae* at TIGR. Plant & Animal Genome XIV Conference, January 2006, San Diego, California, USA
- Butler L (1952) The linkage map of the tomato. Journal of Heredity 43:25-36
- Büttner D, Bonas U (2006) Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. Current Opinion in Microbiology 9:193-200
- Byrne PF, McMullen MD (1996) Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. Probe 7:24-27
- Cao BH, Lei JJ, Wang Y, Chen GJ (2009) Inheritance and identification of SCAR linked to bacterial wilt-resistance in eggplant. African Journal of Biotechnology 8:5201-5207
- Cariglia A (2007) Lutte préventive contre le flétrissement bactérien en culture de tomate hors sol - Etat des connaissances et conseils.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, Prior P, Luisetti J, Besse P (2006a) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo-type II resistance in tomato. Theoretical and Applied Genetics 113:110-121
- Carmeille A, Prior P, Kodja H, Chiroleu F, Luisetti J, Besse P (2006b) Evaluation of resistance to race 3, biovar 2 of *Ralstonia solanacearum* in tomato germplasm. Journal of Phytopathology 154:398-402
- Carney BF, Denny TP (1990) A cloned avirulence gene from *Pseudomonas solanacearum* determines incompatibility on *Nicotiana tabacum* at the host species level. Journal of Bacteriology 172:4836-4843

- Caruso P, Palomo JL, Bertolini E, Alvarez B, Lopez MA, Biosca EG (2005) Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 71:140-148
- Cellier G, Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100:1250-1261
- Chadha ML 1993. Improvement of brinjal. P.105-135. In: KL Chadha G Kalloo (eds.), *Advances in Horticulture. 5. Vegetable crops, part 1*, Malhotra, New Delhi, India.
- Chagué V, Mercier JC, Guénard M, de Courcel A, Vedel F (1997) Identification of RAPD markers linked to a locus involved in quantitative resistance to TYLCV in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 95:671-677
- Chang ML, Hsu ST (1988) Suppression of bacterial wilt of tomato by soil amendments. *Plant Protection Bulletin* 30:349-359
- Chaudhary DR 2000. Inheritance of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum* E.F. Smith) in eggplant. *Haryana J. of Hort. Sci.* 29 (1/2): 89-90.
- Chellemi DO, Olson SM, Mitchell DJ (1994) Effects of soil solarization and fumigation on survival of soilborne pathogens of tomato in north Florida. *Plant Disease* 78:1167-1172
- Chen NC, Li HM, Wang JF 1997. Bacterial wilt resistance sources in eggplant, *Solanum melongena*. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 16: 111-114.
- Chunwongse J, Chunwongse C, Black LL, Hanson PM (1998) Mapping of the *Ph3* gene for late blight from *L. pimpinellifolium* L3708. *Report of the Tomato Genetics Cooperative* 48:963-971
- Clain C, Da Silva D, Fock I, Vaniet S, Carneille A, Gousset C, Sihachakr D, Luisetti J, Kodja H, Besse P (2004) RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae) accessions from Reunion Island. *Plant Science* 166:1533-1540
- Clairon M 1984. Possibility of reducing bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in eggplant (*Solanum melongena* L.) by modifying nitrogen fertilization. *Bull. Agronomique Antilles-Guyane* n°3: 4-5.
- Coenye T, Vandamme P (2003) Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GM11000 genome. *BMC Genomics* 4
- Collonnier C, Fock I, Daunay MC, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Souvannavong V, Sihachakr D (2003) Somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. sisymbriifolium*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal wilts. *Plant Science* 164:849-861
- Collonnier C, Mulya K, Fock I, Mariska I, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Souvannavong V, Ducreux G, Sihachakr D (2001) Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Plant Science* 160:301-313
- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. *Mol Plant-Microbe Interact* 2:113-121
- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1991) DNA probes as tools for the study of host-pathogen evolution: The example of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hennecke H, Verma DPS (eds) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 103-108
- Cook D, Sequeira L (1994) Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp 77-93
- Cook RJ (1985) Biological control of pathogens: theory to application. *Phytopathology* 75:25-29
- Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology* 54:735-774
- Coupat B, Chaumeille-Dole F, Fall S, Prior P, Simonet P, Nesme X, Bertolla F (2008) Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. *FEMS Microbiology Ecology* 66:14-24

- Crosby KM (2008) Pepper. In: Prohens J, Nuez F (eds) Handbook of Plant Breeding , Vegetables II : Fabaceae, Liliaceae, Umbelliferae, and Solanaceae. Springer, New York, pp 221-248
- Cunnac S, Boucher C, Genin S (2004a) 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 186:2309-2318
- Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C, Genin S (2004b) 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 53:115-128
- Daly P (1976) "IRAT L3" une nouvelle variété de tomate combinant plusieurs résistance aux maladies. Agronomie Tropicale 31:398-402
- Daly P 1972. Recherches effectuées à l'IRAT/Martinique en vue de l'obtention d'une variété d'aubergine tolérante au *Pseudomonas solanacearum*. Agronomie Tropicale. Série 1 : Riz et Riziculture et Cultures Vivrières Tropicales, 27 (4) : 462-472.
- Daly P 1973. Obtention d'une nouvelle variété d'aubergine tolérante au *Pseudomonas solanacearum*. Agronomie Tropicale. Série 1 : Riz et Riziculture et Cultures Vivrières Tropicales, 28 (1) : 28-33.
- Daly P 1986. L'implantation de l'aubergine aux Antilles ou la nécessaire adaptation du matériel végétal à des problèmes sanitaires. Bulletin Technique d'Information 409/411:453-457.
- Danesh D, Aarons S, McGill GE, Young ND (1994) Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. Mol Plant-Microbe Interact 7:464-471
- D'Arcy WG (1991) The *Solanaceae* since 1976 with a review of its biogeography. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada-R N (eds) *Solanaceae* III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, pp 75-137
- Das CR, Chattopadhyay SB 1955. Bacterial wilt in eggplant. Indian Phytopath. 8:130-135.
- Daunay MC (2008) Eggplant. In: Prohens J, Nuez F (eds) Vegetables II. Springer, New York, pp 163-220
- Daunay MC, Allender C, Astley D, Bas N, van Dooijeweert W, van Treuren R, Branca R, Díez MJ, Geoffriau E, Keller ERJ, Kotlińska T, Smékalová K, Engels J, Maggioni L (2011) More efficient conservation and use of vegetable genetic resources in Europe: ECPGR Achievements and Perspectives. 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress, Lisboa Portugal, 22-27 August 2010. Acta Horticulturae, submitted.
- Daunay MC, Dalmon A, Lester RN (1999) Management of a collection of (*Solanum melongena* L.) breeding purposes. In: Nee M, Symon DE, Lester RN, Jessop JP (eds) *Solanaceae* IV: Advances in Biology and Utilization. Royal Botanic Gardens, Kew, UK
- Daunay MC, Janick J (2007) History and iconography of eggplant. Chronica Horticulturae 47:16-22
- Daunay MC, Laterrot H, Janick J (2008a) Iconography and history of *Solanaceae*: Antiquity to the XVIIth century. Horticultural Reviews 34:1-111 (+ 118 plates)
- Daunay MC, Lester RN (1989) The usefulness of taxonomy for *Solanaceae* breeders, with special reference to *Solanum melongena* L. (Eggplant). Capsicum Newsletter 7:70-79
- Daunay MC, Lester RN, Ano G (2001) Eggplant. In: Charrier A, Jacquot M, Hamon S, Nicolas D (eds) Tropical Plant Breeding. CIRAD (France) & Science Publishers, Inc. (USA), pp 199-222
- Daunay MC, Lester RN, van der Weerden G (2008b) Taxonomie des Solanacées : ce qu'il faut savoir et les pièges à éviter. In: Marchoux G, Gognalons P, Gébré Sélassié K (eds) Les virus des Solanacées, du génome viral à la protection des cultures. Quae Collection Synthèses, pp 3-10 (+ annexe pp 700-721)
- Davidson HF 1935: Bacterial wilt of solanaceous crops. Trop. Agriculturist, IXXXXV (4): 257-259.
- de Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. Mol Plant-Microbe Interact 15:1173-1180

- Deka AK, Shadeque A, Das KK, Duara PK (1992) Reaction of some varieties of brinjal to *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith under Assam conditions. *South Indian Horticulture* 40(5): 280-282.
- Denny TP, Brumbley SM, Carney BF, Clough SJ, Schell MA (1994) Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp 137-143
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S, Marco Y (2003) 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* 100:8024-8029
- Deslandes L, Olivier J, Theulières F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2404-2409
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Can C, Williams K, Holub E, Beynon J, Arlat M, Marco Y (1998) Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:659-667
- Dharmatilake AJ, Bauer WD (1992) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl Environ Microbiol* 58:1153-1158
- Dickinson MJ, Jones DA, Jones JDG (1993) Close linkage between the *Cf-2/Cf-5* and *Mi* resistance loci in tomato. *Mol Plant Microbe Interaction* 6:341-347
- Díez MJ, Nuez F (2008) Tomato. In: Prohens J, Nuez F (eds) *Vegetables II*. Springer, New York, pp 249-323
- Digat B, M. D (1968) A study of the varietal resistance to bacterial wilt. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society, 6th Annual meeting, St Augustine, Trinidad*, pp 95-101
- Dixon MS, Jones DA, Keddie JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84:451-459
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley S (2002a) A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics* 161:1697-1711
- Doganlar S, Frary A, Daunay MC, Lester RN, Tanksley SD (2002b) Conservation of gene function in the Solanaceae as revealed by comparative mapping of domestication traits in eggplant. *Genetics* 161:1713-1726
- Dunal MF (1852) *Solanaceae*. In: de Candolle AP (ed) *Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*, Vol 13 (1). Victoris Masson, Paris, pp 1-690
- Dupuis J, Siegmund D (1999) Statistical methods for mapping quantitative trait loci from a dense set of markers. *Genetics* 151:373-386
- Duvick JP, Sequeira L (1984) Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Appl Environ Microbiol* 48:192-198
- Enfinger JM, McCarter SM, Jaworski CA (1979) Evaluation of chemicals and application methods for control of bacterial wilt of tomato transplants. *Phytopathology* 69:637-640
- Eshbaugh WH (1977) The Taxonomy of the genus *Capsicum*-Solanaceae. In: Pochard E (ed) *Capsicum 77 Comptes Rendus 3ème Congrès EUCARPIA Piment, Avignon-Montfavet, France*
- Eshbaugh WH (1980) The taxonomy of the genus *Capsicum* (Solanaceae). *Phytologia* 47:153-166
- Eshbaugh WH, Guttman SI, McLeod MJ (1983) The origin and evolution of domesticated *Capsicum* species. *J Ethnobiol* 3:349-354
- Frag N, Stead DE, Janse JD (1999) *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3, biovar 2, Detected in Surface (irrigation) Water in Egypt. *Journal of Phytopathology* 147:485-487

- Farag NS, Lashin SM, All-Abdel RS, Shatta HM, Seif-Elyazal AM (1982) Antibiotics and control of potato black leg and brown rot diseases. *Agricultural Research Review* 60:149-166
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex". In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. APS Press, St. Paul, USA, pp 449-461
- Fegan M, Taghavi M, Sly LI, Hayward AC (1998) Phylogeny, diversity and molecular diagnostics of *Ralstonia solanacearum*. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. INRA Editions, Paris, France, pp 19-33
- Fei Z, Tang X, Albar R, Giovannoni J (2006) Tomato Expression Database (TED): a suite of data presentation and analysis tools. *Nucleic Acids Res* 34
- Feng LL, Qu DY, Jin LP, Lyan Y (2003). Genetic analysis of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Horticulturae Sinica* 30(2): 163-166.
- Flor HH (1955) Host-parasit interaction in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:449-455
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296
- Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics*:64358
- Fortnum BA, Martin SB (1998) Disease management strategies for control of bacterial wilt of tobacco in the Southeastern USA. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. INRA Editions, Paris, France, pp 394-402
- Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, Dall'Aglio E, Vale G (2005). Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82(3): 317-342.
- Frary A, Doganlar S, Daunay MC (2007) Eggplant. In: Kole C (ed) *Vegetables*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 287-313
- Frary A, Doganlar S, Daunay MC, Tanksley SD (2003) QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of solanaceous species. *Theoretical and Applied Genetics* 107:359-370
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289:85-88
- Fukuoka H, Miyatake K, Nunome T, Negoro S, Yamaguchi H, Ohshima A (2010a) Development of an integrated linkage map using genomic SSR and gene based SNPs markers in eggplant. In: Prohens J, Rodriguez A (eds) *Advances in Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*. Editorial de la universitat Politècnica de València, València, Spain, pp 359-375
- Fukuoka H, Yamaguchi H, Nunome T, Negoro S, Miyatake K, Ohshima A (2010b) Accumulation, functional annotation, and comparative analysis of expressed sequence tags in eggplant (*Solanum melongena* L.) the third pole of genus *Solanum* species after tomato and potato. *Gene* 450:76-84
- Fulton TM, Van der Hoeven R, Eannetta NT, Tanksley SD (2002) Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14:1457-1467
- Galán JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284:1322-1328
- Galán JE, Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* 444:567-573
- Gallais A (1990) *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Ed Masson
- Geetha PT, Peter KV (1993). Bacterial wilt resistance in a few selected lines and hybrids of brinjal (*Solanum melongena* L.). *Journal of tropical Agriculture* 31(2): 274-276.
- Genin S, Boucher C (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 42:107-134
- Genin S, Gough CL, Zischek C, Boucher CA (1992) Evidence that the *HrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology* 6:3065-3076

- Gentzbittel L, Mouzeyar S, Badaoui S, Mestries E, Vear F, Tourvieille De Labrouhe D, Nicolas P (1998) Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. Theoretical and Applied Genetics 96:519-525
- Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH, Marco Y (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. Plant J 36:353-365
- González ET, Brown DG, Swanson JK, Allen C (2007) Using the *Ralstonia solanacearum* Tat secretome to identify bacterial wilt virulence factors. Appl Environ Microbiol 73:3779-3786
- Gopalakrishnan TR, Gopalakrishnan PK 1985. Relative susceptibility of brinjal lines resistant to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* Smith). Agric. Res. J. of Kerala 23(2): 209-211.
- Gopalakrishnan TR, Singh PK, Sheela KB, Shankar MA, Kutty PCJ, Peter KV 2005. Development of bacterial wilt resistant varieties and basis of resistance in eggplant (*Solanum melongena* L.). P. 293-300. In: C. Allen, P. Prior and A. Hayward (eds.), Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex, APS Press, St Paul.
- Gopimony R, George MK 1979. Screening brinjal varieties for wilt resistance. Agric. Res. J. of Kerala 17(1): 7-10.
- Gopimony R, Nair NK, Nair VG 1983. Breeding for bacterial wilt resistance in eggplant. Nat. Seminar on Breed. Crop Plants for resistance to Pests and Diseases, May 25-27 1983, Coimbatore, Tamil Nadu, India.
- Gopinath G, Madalageri BB 1986. Inheritance of resistance to bacterial wilt in eggplant. Current Research, Univ. of Agric, Sciences, Bangalore 15(5/6): 50-51.
- Goth RW, Haynes KG, Barksdale TH 1991. Improvement of levels of bacterial wilt resistance in eggplant through breeding. Plant Disease 75: 398-401.
- Goth RW, Madalageri BB, Barksdale TH, Webb RE 1986. Screening world eggplant germplasm for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology 76(5): 563.
- Goth RW, Peter KV, Webb RE 1983. Bacterial wilt, *Pseudomonas solanacearum* resistance in pepper and eggplant lines. Phytopathology 73(5): 808.
- Gousset C, Collonnier C, Mulya K, Mariska I, Rotino GL, Besse P, Servaes A, Sihachakr D (2005) *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). Plant Science 168:319-327
- Gousset C, Karden M, Mariska I, Rotino G, Servaes A, Sihachakr D 2004a. High levels of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) and fungal (*Fusarium oxysporum*) wilts and genetic homogeneity in Indonesian accessions of *Solanum torvum*, a wild relative of eggplant. Proceedings of the 12th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant, Noordwijkerhout, The Netherlands: 184.
- Gousset C, Lian Y, Mariska I, Rotino G, Servaes A, Sihachakr D 2004b. Determination of the inheritance of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in eggplant (*Solanum melongena*). Proceedings of the 12th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant: 183.
- Gowda TKS, Shetty KS, Balasubramanya RH, Setty KP, Patil RB 1974. Studies on the bacterial wilt of solanaceous crops caused by *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith in the wilt sick soil. Mysore J. of Agric. Sciences 8(4): 560-566.
- Gowde PHR, Siddaganaiah, Seenappa K, Shivasankar KT 1990. Varietal and cultural methods to control bacterial wilt of brinjal. Current research, Univ. of Agric. Sciences (Bangalore) 19(5): 82.
- Gowha PHR, Shivashankara KT 1990. Intervarietal hybridization in brinjal for bacterial wilt resistance. Current Research, Univ. of Agric, Sciences, Bangalore 19(4): 70-71.
- Granada GA, Sequeira L (1983) Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere, and plant roots. Canadian Journal of Microbiology 29:433-440
- Grey BE, Steck TR (2001) The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Appl Environ Microbiol 67:3866-3872

- Grimault V, Gélie B, Lemattre M, Prior P, Schmit J (1994) Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 44:105-123
- Grimault V, Prior P (1993) Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol* 42:589-594
- Grimault V, Prior P (1994) Invasiveness of *Pseudomonas solanacearum* in tomato, eggplant and pepper: a comparative study. *European Journal of Plant Pathology* 100:259-267
- Grimault V, Prior P, Anaïs G (1995) A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii 7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Phytopathology* 143:349-352
- Guéneron M, Timmers ACJ, Boucher C, Arlat M (2000) Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the Hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 36:261-277
- Guidot A, Coupat B, Fall S, Prior P, Bertolla F (2009a) Horizontal gene transfer between *Ralstonia solanacearum* strains detected by comparative genomic hybridization on microarrays. *ISME J* 3:549-562
- Guidot A, Elbaz M, Carrère S, Siri MI, Pianzola MJ, Prior P, Boucher C (2009b) Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99:1105-1112
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, Carrere S, Genin S, Boucher C (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *Journal of Bacteriology* 189:377-387
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324
- Hallauer AR, Miranda GV (1981) Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State University Press, Ames, USA
- Hanson PM, Licardo O, Hanudin, Wang JF, Chen JT (1998) Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Disease* 82:74-78
- Hanson PM, Wang JF, Licardo O, Hanudin, Mah SY, Hartman GL, Lin YC, Chen JT (1996) Variable reactions of tomato lines to bacterial wilt evaluated at several locations in Southeast Asia. *Hortscience* 31:143-146
- Hartman GL, Elphinstone JG (1994) Advances in control of *Pseudomonas solanacearum* race1 in major food crops. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK, pp 157-178
- Hartman GL, Hong WF, Hanudin, Hayward AC (1993) Potential of biological and chemical control of bacterial wilt. In: Hartman GL, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt*. ACIAR, Canberra, Australia, pp 322-326
- Hayward AC (1964) Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl Bacteriol* 27:265-277
- Hayward AC (1991) Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* 29:67-87
- Hayward AC, Sequeira L, French ER, El-Nashaat H, Nydegger U (1992) Tropical variant of biovar 2 of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 82:608 (Abstract)
- He LY, Sequeira L, Kelman A (1983) Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease* 67:1357-1361
- He SY, Huang HC, Collmer A (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin<sub>PSS</sub>: a protein that is secreted via Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266
- He SY, Nomura K, Whittam TS (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694:181-206
- Hebert Y (1985) Comparison of the resistance level of 9 *Solanum* species to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) and root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and possible



- implications in eggplant (*Solanum melongena*) breeding for the hot humid tropics. *Agronomie* 5:27-32
- Hendrick CA, Sequeira L (1984) Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 48:94-101
- Hernandez-Blanco C, Feng DX, Hu J, Sanchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, Berrocal-Lobo M, Keller H, Barlet X, Sanchez-Rodriguez C, Anderson LK, Somerville S, Marco Y, Molina A (2007) Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 19:890-903
- Hirsch J, Deslandes L, Feng DX, Balagué C, Marco Y (2002) Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 92:1142-1148
- Horita M, Tsuchiya K (2001) Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91:399-407
- Hsu ST, Hong WF, Tzeng KC, Chen CC (1993) Bacterial wilt of perilla caused by *Pseudomonas solanacearum* and its transmission. *Plant Disease* 77:674-677
- Hu J, Barlet X, Deslandes L, Hirsch J, Feng DX, Somssich I, Marco Y (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *Plos One* 3:e2589
- Huang CC, Hoefs-van de Putte PM, Haanstra-van Der Meer JG, Meijer-Dekens F, Lindhout P (2000) Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two *Ol*-genes on chromosome 6 of tomato. *Heredity* 85:511-520
- Hussain MZ 2005. Screening of brinjal accessions for bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Bangladesh J. Bot.* 34(1): 53-58.
- Ivey MLL, McSpadden Gardener BB, Opina N, Miller SA (2007) Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467-1475
- Janse JD (1996) Potato brown rot in western Europe - history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *EPPO Bulletin* 26:679-695
- Janse JD, Araluppan FAX, Schans J, Wenneker M, Westerhuis W (1998) Experiences with bacterial brown rot *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in the Netherlands. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. INRA Paris Springer, Berlin Heidelberg, pp 146-152
- Janse JD, van den Beld HE, Elphinstone J, Simpkins S, Tjou-Tam-Sin NNA, van Vaerenbergh J (2004) Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology* 86:147-155
- Jarrell KF, McBride MJ (2008) The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology* 6:466-476
- Jaunet TX, Wang JF (1999) Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* 89:320-327
- Jeong EL, Timmis JN (2000) Novel insertion sequence elements associated with genetic heterogeneity and phenotype conversion in *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 182:4673-4676
- Jessykutty PC, Peter KV 1986. Additional source of resistance to bacterial wilt in brinjal. *Agric. Res. J. of Kerala* 24(1): 71-73.
- Ji P, Allen C, Sanchez-Perez A, Yao J, Elphinstone JG, Jones JB, Momol MT (2007) New diversity of *Ralstonia solanacearum* strains associated with vegetable and ornamental crops in Florida. *Plant Disease* 91:195-203
- Ji X, Lu G, Gai Y, Zheng C, Mu Z (2008) Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Microbiology Ecology* 65:565-573
- Jiang C, Zeng ZB (1995) Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The Plant Immune System. *Nature* 444:323-329

- Kaan F 1973. Etude de l'hérédité de la résistance de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) à l'antracnose des fruits (*Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *melongenae* Penzig Fournet). Ann. Amélior. Plantes 23 (2): 127-131.
- Kanazin V, Marek LF, Shoemaker RC (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. Proc Natl Acad Sci U S A 93:11746-11750
- Kang Y, Huang J, Mao G, He LY, Schell MA (1994) Dramatically reduced virulence of mutants of *Pseudomonas solanacearum* defective in export of extracellular proteins across the outer membrane. Mol Plant-Microbe Interact 7:370-377
- Kang YW, Liu HL, Genin S, Schell MA, Denny TP (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Molecular Microbiology 46:427-437
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695
- Kelman A 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station, Tech. Bul. N°99: 194 pp.
- Kelman A, Hartman GL, Hayward AC (1994) Introduction. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) Bacterial wilt : the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, pp 1-7
- Kelman A, Sequeira L (1965) Root-to-root spread of *Pseudomonas solanacearum* 55:304-309
- Kerala Agricultural University 1981. Cataloguing brinjal germplasm to isolate line(s) resistant to bacterial wilt. Annual Report 1982-83, pp 140, Directorate of Research, Kerala Agricultural University, Vellanikkara.
- Khan ANA, Shetty KS, Patil RB 1988. Multiplication of *Pseudomonas solanacearum* in rhizosphere and root tissue of susceptible and resistant varieties of *Solanum melongena*. J. of Phytopathology 121(4): 313-317.
- Kim SH, Olson TN, Schaad NW, Moorman GW (2003) *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, the causal agent of brown rot of potato, identified in geraniums in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. Plant Disease 87:450-450
- Knapp S (2001) Is morphology dead in *Solanum* taxonomy. In: van den Berg RG, Barendse GWM, van der Weerden GM, Mariani C (eds) *Solanaceae* V: Advances in Taxonomy and Utilization. Nijmegen University Press, The Netherlands, pp 23-38
- Knapp S (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspectives on fruit diversity in the *Solanaceae*. Journal of Experimental Botany 53:2001-2022
- Knapp S, Bohs L, Nee M, Spooner DM (2004) *Solanaceae* — a model for linking genomics with biodiversity. Comparative and Functional Genomics 5:285-291
- Lafortune D, Bérarnis M, Daubèze A-M, Boissot N, Palloix A (2005) Partial resistance of pepper to bacterial wilt is oligogenic and stable under tropical conditions. Plant Disease 89:501-506
- Lander ES, Green P, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1:174-181
- Laterrot H, Kaan F (1978) Resistance to *Corynebacterium michiganense* of lines bred for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Report of the Tomato Genetics Cooperative 28
- Lavie M, Seunes B, Prior P, Boucher C (2004) Distribution and sequence analysis of a family of type III-dependent effectors correlate with the phylogeny of *Ralstonia solanacearum* strains. Mol Plant-Microbe Interact 17:931-940
- Lavie M, Shillington E, Eguiluz C, Grimsley N, Boucher C (2002) 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*. Mol Plant-Microbe Interact 15:1058-1068
- Leister D, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (1996) A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. Nature Genetics 14:421-429

- Lester RN, Hasan SMZ (1991) Origin and domestication of the brinjal-eggplant *Solanum melongena*, from *S. incanum* in Africa and Asia. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada-R N (eds) *Solanaceae* III: Taxonomy, Chemistry, Evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, UK
- Lester RN, Jaeger PML, Bleijendaal-Spierings BHM, Bleijendaal HPO, Holloway HLO (1990) African eggplants : a review of collecting in West Africa. *Plant Genetic Resources Newsletter* 81-82
- Li HP, Goth RW, Barksdale TH 1987. Increased tolerance to bacterial wilt in eggplant. *Phytopathology* 77(6): 988.
- Li HP, Goth RW, Barksdale TH 1988. Evaluation of resistance to bacterial wilt in eggplant. *Plant Disease* 72(5): 437-439.
- Li JG, Liu HX, Cao J, Chen LF, Gu C, Allen C, Guo JH (2010) PopW of *Ralstonia solanacearum*, a new two-domain harpin targeting the plant cell wall. *Mol Plant Pathol* 11:371-381
- Li M, Wang YQ, Tian SB, Luo ZY, Wang XJ 2006. Genetic analysis of resistance to bacterial wilt and identification of an associated AFLP marker in eggplant (*Solanum melongena*). *Acta Horticulturae Sinica* 33(4): 869-872.
- Li X, Dorsch M, Del Dot T, Sly L, Stakebrandt E, Hayward AC (1993a) Phylogenetic studies of the rRNA group II pseudomonads based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Bacteriol* 74:324-329
- Li X, Dorsch M, Del Dot T, Sly LI, Stakebrandt E, Hayward AC (1993b) Phylogeny of biovars of *Pseudomonas solanacearum* based on sequencing of 16S rRNA. In: Hartman GL, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 Oct 1992 ACIAR Proceedings No 45*. ACIAR, Canberra, Australia, pp 93-95
- Linnaeus C (1753) *Species plantarum*. Salvius, L., Stockholm, Sweden
- Liu H, Zhang SP, Schell MA, Denny TP (2005) Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:1296-1305
- Liu HL, Kang YW, Genin S, Schell MA, Denny TP (2001) Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology* 147:3215-3229
- Livingstone KD, Lackney VK, Blauth JR, van Wijk R, Jahn MK (1999) Genome Mapping in Capsicum and the Evolution of Genome Structure in the Solanaceae. *Genetics* 152:1183-1202
- Llorente F, Alonso-Blanco C, Sánchez-Rodríguez C, Jorda L, Molina A (2005) ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant Journal* 43:165-180
- López CE, Acosta IF, Jara C, Pedraza F, Gaitán-Solís E, Gallego G, Beebe S, Tohme J (2003) Identifying resistance gene analogs associated with resistances to different pathogens in common bean. *Phytopathology* 93:88-95
- Machmud M (1993) Control of peanut bacterial wilt through Crop Rotation. In: Hartman GL, Hayward AC (eds) *Bacterial Wilt Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 1992*. ACIAR, pp 221-224
- Madalageri BB, Sulladmath UV, Belkhindi GB 1983. Wilt resistant high yielding brinjal. *Current Research, Univ. of Agric. Sciences (Bangalore)* -10/12: 108-109.
- Mahbou Somo Toukam G (2010) Diversité de *Ralstonia solanacearum* au Cameroun et bases génétiques de la résistance chez le piment (*Capsicum annum*) et les solanacées. Thèse. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)
- Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, Guilbaud C, Kahane R, Allen C, Prior P (2009) Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. *Plant Disease* 93:1123-1130
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J, Grimsley NH (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151:1165-1172
- Martin GB, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262:1432-1436
- Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* 56:289-314

- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349
- McLeod MJ, Eshbaugh WH, Guttman SI (1979) A preliminary biochemical systematic study of the genus *Capsicum*-Solanaceae. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, New York, pp 701-714
- Melton TA, Powell NT (1991) Effects of two-year crop rotations and cultivar resistance on bacterial wilt in flue-cured tobacco. *Plant Disease* 75:695-698
- Messiaen CM, Laterrot H, Kaan F (1978) Cumulate resistances to *Pseudomonas solanacearum* and to *Meloidogyne icognita* with determinate growth in tomato. *Vegetables for the hot humid tropics*. Mayaguez Institute of Tropical Agriculture, Puerto Rico pp 48-51
- Miao L, Shou S, Cai J, Jiang F, Zhu Z, Li H (2009) Identification of two AFLP markers linked to bacterial wilt resistance in tomato and conversion to SCAR markers. *Molecular Biology Reports* 36:479-486
- Michel VV, Wang J-F, Midmore DJ, Hartman GL (1997) Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathol* 46:600-610
- Miller P (1754) *The gardeners dictionary abridged*. 4th ed
- Miller P (1768) *The gardeners dictionary abridged*. 8th ed
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10:1307-1320
- Mochizuki H, Yamakawa K 1979a. Resistance of selected eggplant cultivars and related wild *Solanum* species to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*). *Bull. Veg. & Ornament. Crops Rs. Stn* n°6: 1-10; Tsu, Mie, Japan.
- Mochizuki H, Yamakawa K 1979b. Potential utilization of bacterial wilt resistant *Solanum* species as rootstocks for commercial eggplant production. *Bull. Veg. Ornamental Crop Res. Stn. A. 6*: 11-18.
- Mohamed M, Umaharan P, Phelps RH (1997) Genetic nature of bacterial wilt resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) accession La 1421. *Euphytica* 96:323-326
- Mondal SN, Khan MA, Rahman MT, Rashid MA, Nahar S 1991. Reaction of eggplant cultivars/lines and wild species of *Solanum* to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* Smith). *Ann. Bangladesh Agric.* 1 (2): 65-68.
- Monma S, Sakata Y, Matsunaga H (1997) Inheritance and selection efficiency of bacterial wilt resistance in tomato. *Jarq-Japan Agricultural Research Quarterly* 31:195-204
- Morales VM, Sequeira L (1985) Indigenous plasmids in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 75:767-771
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *The American Journal of Human Genetics* 7:277-318
- Mueller LA, Solow TH, Taylor N, Skwarecki B, Buels R, Binns J, Lin C, Wright MH, Ahrens R, Wang Y, Herbst EV, Keyder ER, Menda N, Zamir D, Tanksley SD (2005) The SOL Genomics Network. A comparative resource for solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology* 138:1310-1317
- Mukaihara T, Tamura N, Murata Y, Iwabuchi M (2004) Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 54:863-875
- Mutlu N, Boyacı F, Göçmen M, Abak K (2008) Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theoretical and Applied Genetics* 117:1303-1312
- Mutlu N, Miklas P, Coyne DP (2006) Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. *Molecular Breeding* 17:127-135
- Nakamura Y, Itoh T, Matsuda H, Gojobori T (2004) Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genetics* 36:760-766

- Narayanan KK, Nair VG 1983. Evaluation of brinjal varieties for resistance to bacterial wilt. *Agric. Res. J. of Kerala* 21(2): 58-60.
- Narikawa T, Sakata Y, Komochi S, Melor R, Heng CK, Jumali S 1988. Collection of solanaceous plants in Malaysia and screening for disease resistance. *Japan Agric. Res. Quarterly* 22(2): 101-106.
- Nicole JF (1995) Influence de facteurs biotiques ou abiotiques sur la dynamique des populations de *Pseudomonas solanacearum* au cours de l'infection et sur le développement de la maladie. Thèse. Université de Nantes
- Nombela G, Williamson VM, Muñoz M (2003) The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Mol Plant-Microbe Interact* 16:645-649
- Norman DJ, Zapata M, Gabriel DW, Duan YP, Yuen JMF, Mangravita-Novo A, Donahoo RS (2009) Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology* 99:1070-1077
- Noutoshi Y, Ito T, Seki M, Nakashita H, Yoshida S, Marco Y, Shirasu K, Shinozaki K (2005) A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* 43:873-888
- Nunome T, Ishiguro K, Yoshida T, Hirai M (2001) Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breeding Science* 51:19-26
- Nunome T, Negoro S, Kono I, Kanamori H, Miyatake K, Yamaguchi H, Ohyama A, Fukuoka H (2009) Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 119:1143-1153
- Nunome T, Suwabe K, Iketani H, Hirai M, Wricke G (2003) Identification and characterization of microsatellites in eggplant. *Plant Breeding* 122:256-262
- Nunome T, Yoshida T, Hirai M (1998) Genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*). In: Palloix A, Daunay MC (eds) Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding on *Capsicum* & Eggplant. INRA Paris, Avignon, France, pp 239-242
- Occhialini A, Cunnac S, Reymond N, Genin S, Boucher C (2005) Genome-wide analysis of gene expression in *Ralstonia solanacearum* reveals that the *hrpB* gene acts as a regulatory switch controlling multiple virulence pathways. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:938-949
- Olmstead RG, Bohs L (2007) A summary of molecular research in *Solanaceae*:1982-2006. *Acta Horticulturae* 745:255-259
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF, Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the *Solanaceae*. *Taxon* 57:1159-1181
- Olsson K (1976) Experience of brown rot caused by *Pseudomonas solanacearum* (Smith) in Sweden. *EPPO Bulletin* 6:199-207
- Opina N, Tavner F, Hollway G, Wang J-F, Li T-H, Maghirang R, Fegan M, Hayward AC, Krishnapillai V, Hong WF, Holloway BW, Timmis J (1997) A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia Pacific J Mol Biol Biotech* 5:19-30
- Paret ML, Cabos R, Kratky BA, Alvarez AM Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* race 4 and bacterial wilt of edible ginger. *Plant Disease* 94:521-527
- Parrella G, Moretti A, Gognalons P, Lesage ML, Marchoux G, Gebre-Selassie K, Caranta C (2004) The *Am* gene controlling resistance to *Alfalfa mosaic virus* in tomato is located in the cluster of dominant resistance genes on chromosome 6. *Phytopathology* 94:345-350
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: Comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 127:181-197
- Pedersen WL, Leath S (1988) Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annu Rev Phytopathol* 26:369-378

- Pedley KF, Martin GB (2003) Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* 41:215-243
- Pegg KG, Moffett M (1971) Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust J Exp Agric Anim Husbandry* 11:696-698
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. Report of the Tomato Genetics Cooperative 56:6-12
- Peralta IE, Spooner DM, Knapp S (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Systematic Botany Monographs* 84:1-186
- Pertuzé RA, Ji Y, Chetelat RT (2002) Comparative linkage map of the *Solanum lycopersicoides* and *S. sitiens* genomes and their differentiation from tomato. *Genome* 45:1003-1042
- Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ, Tam VC, Chancey ST, Shan L, Jamir Y, Schechter LM, Janes MD, Buell CR, Tang X, Collmer A, Alfano JR (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7652-7657
- Pflieger S, Lefebvre V, Caranta C, Blattes A, Goffinet B, Palloix A (1999) Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42:1100-1110
- Pflieger S, Lefebvre V, Causse M (2001) The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7:275-291
- Philouze J, Laterrot H (1992) La tomate. In: Gallais A, Bannerot H (eds) Amélioration des espèces végétales cultivées Objectifs et critères de sélection. INRA Editions, Paris, pp 379-391
- Pickersgill B (1971) Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution Int J Org Evolution* 25:683-691
- Pickersgill B (1980) Some aspects of interspecific hybridization in *Capsicum*. IV<sup>th</sup> Meeting Eucarpia Working Group, Wageningen, The Netherlands, p 15
- Pickersgill B, Heiser J, McNeill J (1979) Numerical taxonomic studies on variation and domestication in some species of *Capsicum*. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) The biology and taxonomy of the Solanaceae. Academic Press, New York, pp 679-700
- Pochard E (1970) Description des trisomiques de piment (*Capsicum annum* L.) obtenus dans la descendance d'une plante haploïde. *Annales Amélioration des Plantes* 20:233-256
- Pochard E (1977) Methodes pour l'étude de la résistance partielle au virus du concombre chez le piment. *Capsicum 77 Comptes Rendus 3ème Congrès EUCARPIA Piment*, Avignon-Montfavet, France, pp 93-104
- Pochard E, Palloix A, Daubèze AM (1992) Le piment. In: Gallais A, Bannerot H (eds) Amélioration des espèces végétales cultivées Objectifs et critères de sélection. INRA Editions, Paris, pp 420-434
- Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, Deslandes L, Peeters N, Cazale-Noel AC, Boucher C, Genin S (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GM1000 determine host-range specificity on Tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:538-550
- Poueymiro M, Genin S (2009) Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current Opinion in Microbiology* 12:44-52
- 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. Thèse. Université Rennes
- Poussier S, Prior P, Luisetti J, Hayward C, Fegan M (2000a) Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst Appl Microbiol* 23:479-486
- Poussier S, Thoquet P, Trigalet-Demery D, Barthet S, Meyer D, Arlat M, Trigalet A (2003) Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology* 49:991-1003
- Poussier S, Trigalet-Demery D, Vandewalle P, Goffinet B, Luisetti J, Trigalet A (2000b) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP

- and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146:1679-1692
- Poussier S, Vandewalle P, Luisetti J (1999) Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *Appl Environ Microbiol* 65:2184-2194
- Poysa V (1993) Use of *Lycopersicon cheesmanii* and *L. chmielewskii* to increase dry matter content of tomato fruit. *Canadian Journal of Plant Science* 73:273-279
- Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones JB (2003) Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease* 87:423-427
- Prakash, Shivashankar KT, Gowda PHR 1994. Assessment of resistance to bacterial wilt disease in brinjal (*Solanum melongena* L.). *Karnataka J. of Agric. Sciences* 7(3): 273-276.
- Prince JP, Pochard E, Tanksley SD (1993) Construction of a molecular linkage map of pepper and comparison of a synteny with tomato. *Genome* 36:404-417
- Prior P, Beramis M, Clairon M, Quiqampoix H, Robert C, Schmit J (1993) Contribution to integrated control against bacterial wilt in different pedoclimatic situations : Guadeloupe experiments. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK, pp 209-223
- Quezado-Soares AM, Lopes CA, Ribeiro CSC 1997. Breeding for bacterial resistance of eggplant in Brazil. *Capsicum & Eggplant Newsletter* n°16: 118-119.
- Rahman MA, Abullah H, Vanhaecke M (1999) Histopathology of susceptible and resistant *Capsicum annuum* cultivars infected with *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Phytopathology* 147:129-140
- Rajput JC, Palve SB, Limaye VP 1982. Control of bacterial wilt of tomato. *J. of Maharashtra Agric. Universities* 7(2): 191.
- Ranc N, Munos S, Santoni S, Causse M (2008) A clarified position for *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biology* 8, Article 130
- Rao MVB, Sohi HS, Vijay OP 1976. Reaction of some varieties of brinjal (*Solanum melongena* L.) to *Pseudomonas solanacearum* Sm. *Vegetable Science* 3(1): 61-64.
- Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Molecular Biology* 53:741-754
- Remenant B, Coupât-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, Medigue C, Prior P (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* 11:379
- Ribaut JM, Hu XY, Hoisington D, Gonzalez-de-Leon D (1997) Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in a marker-assisted selection-backcross scheme. *Plant Molecular Biology* 15:154-162
- Rick CM (1973) Potential genetic resources in tomato species: Clues from observations in native habitats. *Genes, Enzymes, and Populations*. Plenum Press, New York, pp 255-269
- Rick CM (1979) Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum*. In: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, New York
- Rizza F, Mennella G, Collonnier C, Sihachakr D, Kashyap V, Rajam MV, Prestera M, Rotino GL (2002) Androgenetic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group Gilo as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae*. *Plant Cell reports* 20:1022-1032
- Roberts DP, Denny TP, Schell MA (1988) Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* 170:1445-1451
- Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, Fortnum BA, Kluepfel DA (2004) Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:1376-1384

- Roine E, Raineri DM, Romantschuk M, Wilson M, Nunn DN (2007) Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:1048-1056
- Rothschild MF, Soller M (1997) Candidate gene analysis to detect genes controlling traits importance in domestic livestock. *Probe* 8:13-20
- Rushton PJ, Somssich IE, Ringler P, Shen QJ (2010) WRKY transcription factors. *Trends in Plant Science* 15:247-258
- Sadashiva AT, Deshpande AA, Reddy KM, Singh R 1993. New sources of resistance to bacterial wilt in eggplant. *Capsicum & Eggplant Newsletter* 12: 94-96.
- Saddler GS, Allen C, Prior P, Hayward AC (2005) Management of bacterial wilt disease. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. APS press, St. Paul, M. N., pp 121-132
- Sakata Y, Monma S, Narikawa T, Komochi S 1995. Evaluation of resistance to bacterial wilt in eggplants (*Solanum melongena* L.) collected in Malaysia. *Proceedings of the IX<sup>th</sup> Eucarpia meeting on Genetics and Breeding on Capsicum and Eggplant*, Budapest, Hungary, August 21-25, 1995: 204-207.
- Sakata Y, Nishio T, Monma S 1989. Resistance of *Solanum* species to *Verticillium* wilt and bacterial wilt. *Proceeding of the VII<sup>th</sup> EUCARPIA meeting on Genetics & Breeding of Capsicum and Eggplant*, Kragujevac, Yugoslavia: 27-30.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, Cattolico L, Chandler M, Choisine N, Claudel-Renard C, Cunnac S, Demange N, Gaspin C, Lavie M, Moisan A, Robert C, Saurin W, Schiex T, Siguier P, Thebault P, Whalen M, Wincker P, Levy M, Weissenbach J, Boucher CA (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497-502
- Sanchez Perez A, Mejia L, Fegan M, Allen C (2008) Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol* 57:320-331
- Sánchez-Rodríguez C, Estévez JM, Llorente F, Hernández-Blanco C, Jordá L, Pagán I, Berrocal M, Marco Y, Somerville S, Molina A (2009) The ERECTA receptor-like kinase regulates cell wall-mediated resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:953-963
- Sandbrink JM, Ooijen JW, Purimahua CC, Vrieling M, Verkerk R, Zabel P, Lindhout P (1995) Localization of genes for bacterial canker resistance in *Lycopersicon peruvianum* using RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 90:444-450
- Sankar MA, Jessykutty PC, Peter KV 1987. Efficiency of four selection methods to improve level of bacterial wilt resistance in eggplant. *Ind. J. of Agric. Sciences* 57(3): 138-141.
- Schell MA (1987) Purification and characterization of an endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* 53:2237-2241
- Schell MA (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* 38:263-292
- Schell MA, Roberts DP, Denny TP (1988) Analysis of the *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in phytopathogenicity. *Journal of Bacteriology* 170:4501-4508
- Scott JW, Somodi GC, Jones JB (1988) Bacterial spot resistance is not associated with bacterial wilt resistance in tomato. *Proceeding of Florida State Horticultural Society* 101:390-392
- Scott JW, Wang JF, Hanson PM (2005) Breeding tomatoes for resistance to bacterial wilt, a global view. In: Momol MT, Ji P, Jones JB (eds) *Proceedings of the first international symposium on tomato diseases*. International Society Horticultural Science, Brugge, Belgium, pp 161-172
- Seneviratne SN (1988) Soil survival of *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial diseases of the Planning Conference on Bacterial Disease of the Potato*, March 16-20, 1987, Lima, Peru, pp 85-91
- Sequeira L, Hartman GL, Hayward AC (1993) Bacterial wilt: past, present, and future. *Bacterial wilt Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 Oct 1992 ACIAR Proceedings No 45*. ACIAR, Canberra, Australia, pp 12-21



- Sharma JP, Kumar S 1995. Evaluation of host resistance in brinjal to *Pseudomonas* wilt in Chotanagpur. Ind. Phytopath. 48(1): 81-83.
- Sharma JP, Singh DP, Prasad VRSK 1995. Differential reaction and source of resistance to wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in brinjal (*Solanum melongena*). Ind. J. of Agri. Sciences 65(9): 686-690.
- Sheela KB, Gopalakrishnan PK, Peter KV 1984. Resistance to bacterial wilt in a set of eggplant breeding lines. Ind. J. of Agric. Sciences 54(6): 457-460.
- Shekhawat GS, Chakrabarti SK, Kishore V, Sunaina V, Gadewar AV (1993) Possibilities of biological management of potato bacterial wilt with strains of *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and Actinomycetes. In: Hartman GL, Hayward AC (eds) Bacterial wilt. ACIAR, Canberra, Australia, pp 327-330
- Shen KA, Meyers BC, Islam-Faridi MN, Chin DB, Stelly DM, Michelmore RW (1998) Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. Mol Plant-Microbe Interact 11:815-823
- Singh B 1991. Field reaction of eggplant (*Solanum melongena* L.) germplasm to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Nagaland. Indian J. of Agric. Sci. 61(9): 694-695.
- Singh PK, Indira P, Gopalakrishnan TR, Rajan S, Peter KV 1998. New sources of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in eggplant and paprika pepper. Proceedings X<sup>th</sup> Meeting on Genetics & Breeding of Capsicum and Eggplant, Avignon, September 7-11, 1998: 151-153.
- Sitaramaiah K, Singh RS, Vishwakarma SN, Dubey GS 1981. Brinjal cultivars resistant to *Pseudomonas* wilt. Ind. Phytopath. 34(1): 113.
- Sitaramaiah K, Sinha SK, Vishwakarma SN 1985. Reaction of brinjal cultivars to bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ind. J. of Mycology and Plant Pathology 14(3): 218-222.
- Smith EF (1914) Bacteria in relation to plant disease. Carnegie Institution of Washington, Washington D. C.
- Smith PG, Villalon B, Villa PL (1987) Horticultural classification of pepper grown in the United States. Hortscience 22:11-13
- Sohi HS, Rao MVB, Rawal RD, Kishum R 1981. Effect of crop rotations on bacterial wilt of tomato and eggplant. Ind. J. of Agric. Sciences 51(8): 572-573.
- Spooner DM, Anderson GJ, Jansen RK (1993) Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (*Solanaceae*). American Journal of Botany 80:676-688
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S (2005) Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. Taxon 54:43-61
- Srinivasan K, Gopinathan R, Swaminathan M, Kumarapillai B 1969. On the resistance of a wild brinjal variety to bacterial wilt. Agric. Res. J. Kerala 7: 39-40.
- Stackebrandt E, Murray RGE, Truper HG (1988) *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 38:321-325
- Stagel A, Portis E, Toppino L, Rotino G, Lanteri S (2008) Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. BMC Genomics 9:357
- Sun SK, Huang JW (1985) Formulated soil amendment for controlling fusarium wilt and other soilborne diseases. Plant Disease 69:917-920
- Sunseri F, Sciancalepore A, Martelli G, Acciarri N, Rotino GL, Valentino D, Tamietti G (2003) Development of RAPD-AFLP map of eggplant and improvement of tolerance to *Verticillium* wilt. In: Hammerschlag FA, Saxena P (eds) Biotechnology in horticultural crop improvement: Achievements, opportunities and limitations. Acta Horticulturae, pp 107-115
- Suzuki I, Sugahara Y, Kotani A, Todaka S, Shimada H (1964) Studies on breeding eggplants and tomatoes for resistance to bacterial wilt. I. Investigations on method of evaluating the resistance and on the source of resistance in eggplants and tomatoes. Bulletin-Horticultural Research Station Ministry of Agriculture and Forestry Series A 3:77-106
- Tabor HK, Risch NJ, Myers RM (2002) Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nature Reviews Genetics 3:391-397

- Taghavi M, Hayward C, Sly LI, Fegan M (1996) 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* 46:10-15
- Tamura N, Murata Y, Mukaihara T (2002) A somatic hybrid between *Solanum integrifolium* and *Solanum violaceum* that is resistant to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Reports* 21:353-358
- Tang X, Szinay D, Lang C, Ramanna MS, van der Vossen EAG, Datema E, Lankhorst RK, de Boer J, Peters SA, Bachem C, Stiekema W, Visser RGF, de Jong H, Bai Y (2008) Cross-species bacterial artificial chromosome-fluorescence in situ hybridization painting of the tomato and potato chromosome 6 reveals undescribed chromosomal rearrangements. *Genetics* 180:1319-1328
- Tanksley SD (1984) Linkage relationships and chromosomal locations of enzyme-coding genes in pepper, *Capsicum annuum*. *Chromosoma* 89:352-360
- Tanksley SD, Bernatzky R, Lapitan NL, Prince JP (1988) Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6419-6423
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de-Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160
- Tans-Kersten J, Brown D, Allen C (2004) Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant-Microbe Interact* 17:686-695
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology* 183:3597-3605
- Taylor IB, Atherton JG, Rudich J (1986) Biosystematics of the tomato. *The tomato crop: A scientific basis of improvement*. Chapman & Hall, London, pp 1-34
- Thoquet P, Oliver J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anaïs G, Mangin B, Bazin B, Nazer R, Grimsley N (1996a) Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:837-842
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N (1996b) Quantitative trait Loci determining Resistance to Bacterial Wilt in Tomato Cultivar Hawaii7996. *Mol Plant-Microbe Interact* 9:826-836
- Thurston HD (1963) Bacterial wilt of potatoes in Colombia. *Am Potato J* 40:381-390
- Titarenko E, Lopez-Solanilla E, Garcia-Olmedo F, Rodriguez-Palenzuela P (1997) Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *Journal of Bacteriology* 179:6699-6704
- Toppino L, Vale G, Rotino GL (2008) Inheritance of *Fusarium* wilt resistance introgressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and *Aculeatum* groups into cultivated eggplant (*S. melongena*) and development of associated PCR-based markers. *Molecular Breeding* 22:237-250
- Toppino L, Vale G, Rotino GL (2008) Inheritance of *Fusarium* wilt resistance introgressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and *Aculeatum* groups into cultivated eggplant (*S. melongena*) and development of associated PCR-based markers. *Molecular Breeding* 22(2): 237-250.
- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y (1996) The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8:735-746
- Trigalet A, Trigaletdemery D (1990) Use of Avirulent Mutants of *Pseudomonas-Solanacearum* for the Biological-Control of Bacterial Wilt of Tomato Plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36:27-38
- Turner M, Jauneau A, Genin S, Tavella MJ, Vailleau F, Gentzbittel L, Jardinaud MF (2009) Dissection of bacterial wilt on *Medicago truncatula* revealed two type III secretion system

- effectors acting on root infection process and disease development. *Plant Physiology* 150:1713-1722
- Ushamani P, Peter KV 1987: Field resistance of brinjal to bacterial wilt. *Agric. Res. J. of Kerala* 25(1): 133-135.
- Utz HF, Melchinger AE (1996) PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *JQTL* 2
- Valls M, Genin S, Boucher C (2006) Integrated regulation of the Type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* 2:e82
- van der Beek JG, Pet G, Lindhout P (1994) Resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *Ol-1* on chromosome 6. *Theoretical and Applied Genetics* 89:467-473
- Van der Hoeven RS, Ronning C, Giovannoni JJ, Martin G, Tanksley SD (2002) Deduction about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *The Plant Cell* 14:1441-1456
- van Elsas JD, Kastelein P, de Vries PM, van Overbeek LS (2001) Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water. *Canadian Journal of Microbiology* 47:842-854
- van Elsas JD, Kastelein P, van Bekkum P, van der Wolf JM, de Vries PM, van Overbeek LS (2000) Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato Brown Rot, in Field and Microcosm Soils in Temperate Climates. *Phytopathology* 90:1358-1366
- Van Gijsegem F, Gough C, Zischek C, Niqueux E, Arlat M, Genin S, Barberis P, German S, Castelo P, Boucher C (1995) The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. *Molecular Microbiology* 15:1095-1114
- van Overbeek LS, Bergervoet JHH, Jacobs FHH, van Elsas JD (2004) The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* biovar 2. *Phytopathology* 94:463-469
- Vasse J, Frey P, Trigalet A (1995) Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 8:241-251
- Wallis FM, Truter SJ (1978) Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. *Physiological Plant Pathology* 13:307-310, IN309-IN316, 311-317
- Wang JF, Berke T 1997. Sources of resistance to bacterial wilt in *Capsicum annuum*. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 16: 91-93.
- Wang JF, Hanson P, Barnes JA (1998) Worldwide evaluation of an international set of resistant sources to bacterial wilt in tomato. In: Prior P, Allen C, Elphinstone JG (eds) *Bacterial wilt disease - Molecular and ecological aspects*. Springer-Verlag, Berlin, pp 269-275
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L, Grimsley NH (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant-Microbe Interact* 13:6-13
- Wang S, Basten CJ, Zeng ZB (2010) *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC
- Warnock SJ (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience* 23:669-673
- Wayne ML, McIntyre LM (2002) Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14903-14906
- Weese TL, Bohs L (2007) A three gene phylogeny of the genus *Solanum* (*Solanaceae*). *Systematic Botany* 32:445-463
- Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* 257:85-88

- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, Mian D, Prior P (2009) Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies). *Plant Pathol* 58:853-861
- Williamson L, Nakaho K, Hudelson B, Allen C (2002) *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease* 86:987-991
- Williamson VM (1999) Plant nematode resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology* 2:327-331
- Winstead N.N., Kelman A 1960. Resistance to bacterial wilt in eggplant in North Carolina. *Plant Dis. Reporter* 44: 432-434.
- Wu F, Eannetta NT, Xu Y, Durrett R, Mazourek M, Jahn MM, Tanksley SD (2009a) A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics* 118:1279-1293
- Wu F, Mueller LA, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD (2006) Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the Euasterid plant clade. *Genetics* 174:1407-1420
- Wu FN, Eannetta NT, Xu YM, Tanksley SD (2009b) A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theoretical and Applied Genetics* 118:927-935
- Wydra K, Diogo R, Dannon E, Semrau J (2005) Soil amendment with silicon and bacterial antagonists induce resistance against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato. In: Tielkes E, Hülsebusch C, Häuser I, Deininger A, Becker K (eds) *Tropentag 2005, International Research on Food Security, Natural Resource Management and rural Development*, Stuttgart
- Xu J, Pan Z, Prior P, Zhang Z, Zhang H, Zhang L, He L, Feng J (2009) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *European Journal of Plant Pathology* 125:641-653
- Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki Y, Arakawa M (1992) Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol* 36:1251-1275
- Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y (1996) Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Douderoff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol* 39:897-904
- Yao J, Allen C (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 188:3697-3708
- Yao J, Allen C (2007) The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of Bacteriology* 189:6415-6424
- Yoshida T, Monma S, Matsunaga H, Sakata Y, Sato T, Saito T, Saito A, Yamada T 2004a. New rootstock 'Eggplant Ano 2' with highly resistance to bacterial wilt and *Fusarium* wilt. *Proceedings of the 12th Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant*: 98.
- Yu JQ (1999) Allelopathic suppression of *Pseudomonas solanacearum* infection of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-Chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system. *J Chem Ecol* 25:2409-2417
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *TY-1*. *Theoretical and Applied Genetics* 88:141-146
- Zeng ZB (1994) Precision Mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136:1457-1468
- Zhu HW, Yao YG, Liu ZM, Yang JG, Chen HM, Zou XX 2005. Studies on RAPD marker of bacterial wilt resistance gene in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Acta Hort. Sinica* 32 (2): 321-323.

# ANNEXES

## ANNEXES

## ANNEXE 1. Caractéristiques des espèces de tomates et d'espèces sauvages proches (Peralta et al. 2006; Peralta et al. 2008).

Nom <i>Solanum</i>	Equivalent <i>Lycopersicon</i>	Compatibilité et mode de reproduction <sup>1</sup>	Répartition géographique
<i>Solanum lycopersicoides</i> Dunal	<i>L. lycopersicoides</i> (Dunal in DC.) Child ex Shaw	AI, O	Du sud du Pérou au Nord du Chili sur les versants ouest des Andes sur les collines rocheuses et arides, 2 900-3 600 m d'altitude
<i>Solanum sitiens</i> Johnst.	<i>L. sitiens</i> (Johnst.) Shaw	AI, O	Sur les versants ouest des Andes dans le sud du Chili à partir de 2 350-3 500 m, sur les montagnes rocheuses et sur les coteaux secs
<i>Solanum juglandifolium</i>	<i>L. ochranthum</i> (Dunal) Shaw	AI, O	Dans les forêts montagneuses du centre de la Colombie (Cordillère centrale et occidentale) au sud du Pérou (dept. Apurimac) ; 1 900-4 100 m
<i>Solanum ochranthum</i>	<i>L. juglandifolium</i> (Dunal) Shaw	AI, O	Habituellement, plante de zones ouvertes et des routes ou des bords de clairières ; nord-est de la Colombie (dept. Santaner) au Sud de l'équateur dans les trois Cordillères ; 1 200-3 100 m, présent parfois à Páramo du sud de l'équateur
<i>Solanum pennellii</i>	<i>L. pennellii</i> (Correll) D'Arcy	Habituellement AI, quelques AC	Du nord du Pérou au Nord du Chili (Tarapaca) dans les collines rocheuses et sèches et les zones de sable à partir de 3 000 m
<i>Solanum habrochaites</i> Knapp and Spooner	<i>L. hirsutum</i> Dunal	Généralement AI, 1-2 collections d'AC mais avec dépression de consanguinité	Dans différents types de forêts, des forêts de type premontane aux forêts sèches sur les versants ouest des Andes depuis le centre de l'équateur au centre du Pérou ; 500-2 500 m d'altitude

<i>Solanum chilense</i> (Dunal) Reiche	<i>L. chilense</i> Dunal	AI, O	Sur le versant ouest de la cordillère des Andes du dept. De Tacna dans le sud du Pérou au Nord du Chili, dans les plaines rocheuses hyper-arides et dans les déserts côtiers du niveau de la mer à 2 000m
<i>Solanum huaylasense</i> Peralta and Knapp	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	Généralement AI, O	Sur les versants rocheux de Callejón de Huaylas le long du Río Santa dans le dept. Ancash, au Pérou et dans le drainage adhécent du Río Fortaleza
<i>Solanum peruvianum</i> L.	<i>L. peruvianum</i> (L.) Miller	Généralement AI, O	Dans les formations Iomas et occasionnellement dans les déserts côtiers du centre du Pérou au Nord du Chili à 600 m d'altitude. Présent parfois sur les bords de terrain dans les vallées côtières
<i>Solanum corneliomuelleri</i> Macbr. (1 race géographique : Misti nr. Arequipa)	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller; aussi connu comme <i>L. glandulosum</i> Müll. <i>S. peruvianum</i> S Spooner	Généralement AI, O	Moyenne à haute altitude sur le versant ouest des Andes du centre (proche de Lima) au sud du Pérou, présent parfois sur les plus bas versants sur les bords de glissements (huaycos), (400) 1 000-3 000 m
<i>Solanum arcanum</i> Peralta (4 races géographiques : « humifusum », Iomas, Marañon, Chotano-Yamaluc)	Part of <i>L. peruvianum</i> (L.) Miller <i>S. peruvianum</i> N Spooner	Généralement AI, O	Côtières et vallées intérieures des Andes au sud du Pérou ; 100-2 500 m ; présent dans Iomas, coteaux secs et versants rocheux et secs
<i>Solanum chmeilewskii</i> (Rick, Kesicki, Fobes and Holle) Spooner, Anderson, Jansen	<i>L. chmeilewskii</i> Rick, Kesicki, Fobes and Holle	AC, O	Dans les hautes vallées sèches andines du dept. Apurimac dans le Sud du Pérou à Sorata dans le Nord de la Bolivie, 2 300-2 880 m d'altitude
<i>Solanum neorickii</i> Spooner, Anderson, Jansen	<i>L. parviflorum</i> Rick, Kesicki, Fobes and Holle	AC, hautement S	Du sud du Pérou (dept. Apurimac) au sud de l'équateur (Dept. Azuay) dans les vallées sèches inter-andines à 1 950-2 600 m, souvent trouvé sur les bancs rocheux et sur les bords des routes

<i>Solanum</i> <i>pimpinellifolium</i> L.	<i>L. pimpinellifolium</i> L. Miller	AC, S, O facultatif	Apparemment, originaire des régions côtières du centre de l'Equateur au centre du Chili, 0-500 m
<i>Solanum</i> <i>lycopersicum</i> L.	<i>L. esculentum</i> L. Miller	AC, S, O facultatif	Seule forme cultivée connue, répartie dans le monde entier dans différents types d'habitats
<i>Solanum</i> <i>cheesmaniae</i> (Riley) Fosberg	<i>L. cheesmaniae</i> Riley	AC, S strict	Endémique aux îles Galápagos, 500 m
<i>Solanum</i> <i>galapagense</i> Darwin and Peralta	Part de <i>L. cheesmaniae</i> Riley	AC, S strict	Endémique aux îles Galápagos, en particulier les îles de l'ouest et de sud, majoritairement présent sur la lave côtières à moins d'1m de la marque de la marée haute à portée d'embruns mais présent aussi sur les versants du volcan sur Isabela et Fernandina

<sup>1</sup>AC : autocompatible, AI : auto-incompatible, S : autogame, O : allogame.



## ANNEXE 2. Résultat des croisements interspécifiques entre *S. melongena* et les espèces proches (Daunay 2008).

Section	Espèce	Résultats <sup>a</sup>	Caractéristiques des semences d'hybride interspécifique <sup>b</sup>
<i>Acanthophora</i> Dunal	<i>S. capsicoides</i> All.	Pas de germination des semences	
	<i>S. mammosum</i> L.	Semences anormales	
	<i>S. viarum</i> Dunal <sup>c</sup>	Hybride quasi stérile	
<i>Anisantherum</i> Bitter <i>Campanulata</i> Symon	<i>S. pubescens</i> Willd.	Hybride quasi stérile	
	<i>S. campanulatum</i> Symon	Semences anormales	
<i>Croatianum</i> D'Arcy & Keating	<i>S. heinianum</i> D'Arcy & Keating	Pas de formation de fruit	
<i>Cryptocarpum</i> Dunal	<i>S. sisymbriifolium</i> Lam.	Mort des plantules hybrides	
<i>Ischyracanthum</i> Bitter	<i>S. dennekense</i> Dammer	Pas de formation de fruit	
<i>Lasiocarpa</i> (Dun.) D'Arcy	<i>S. stramonifolium</i> Jacq.	Pas de formation de fruit	
<i>Melongena</i> (Mill.) Dun.	<i>S. aculeastrum</i> Dunal	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. beaugleholei</i> Symon	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. cerasiferum</i> Dunal	Hybride partiellement fertile	Forme des semences normale
	<i>S. chippendalei</i> Symon	Mort des plantules hybrides	
	<i>S. °cinereum</i> R. Br.	Hybride quasi stérile	
	<i>S. clarkiae</i> Symon	Pas d'embryon d'hybride viable	
	<i>S. dasyphyllum</i> Thonn.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. dioicum</i> W. V. Fitz	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. diversiflorum</i> F. Muell.	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. incanum</i> group A ( <i>S. campylacanthum</i> Hochst. Ex A. Rich)	Pas de germination de semences	
	<i>S. incanum</i> group B ( <i>S. delagoense</i> Dunal) <sup>d</sup>	Hybride fertile	Descendances viables obtenues
	<i>S. incanum</i> L. sensu stricto (group C)	Hybride fertile	
	<i>S. incanum</i> group D ( <i>S. lichtensteinii</i> Willd.)	Hybride fertile	
<i>S. linnaeanum</i> Hepper & Jaeger	Hybride partiellement fertile		
<i>S. macrocarpon</i> L.	Hybride partiellement fertile	Descendances viables obtenues	
<i>S. marginatum</i> L. fil.	Hybride quasi stérile		
<i>S. melanospermum</i> F. Muell.	Hybride partiellement fertile	Aucune semence	
<i>S. phlomoides</i> A. Cunn. Ex Benth.	Pas d'embryon d'hybride viable		

(suite p.)

Résultat des croisements interspécifiques entre *S. melongena* et les espèces proches (Daunay 2008). (suite)

Section	Espèce	Résultats <sup>a</sup>	Caractéristiques des semences d'hybride interspécifique <sup>b</sup>
	<i>S. richardii</i> Dunal	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. sessilistellatum</i> Bitter	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. tudununggae</i> Symon	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. virginianum</i> L. <sup>e</sup>	Hybride partiellement fertile	
<i>Monodolichopus</i> Bitter	<i>S. coagulans</i> Forssk. ( <i>S. dubium</i> Fresen.)	Hybride quasi stérile	Semences vides
<i>Nyctarium</i> (Ventenat) Dunal	<i>S. lidii</i> Sunding	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. verspertilio</i> Ait.	Pas de formation de fruit	
<i>Oliganthes</i> (Dunal) Bitter	<i>S. aethiopicum</i> L. <sup>f</sup>	Hybride partiellement fertile	Descendances obtenues viables
	<i>S. anguivi</i> Lam. ( <i>S. indicum</i> auct. Non L. p.pte)	Hybride partiellement fertile	
	<i>S. burchelli</i> Dunal	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. carpense</i> L.	Hybride quasi stérile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. catombelense</i> Peyr.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. coccineum</i> Jacq.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. cyaneopurpureum</i> De Wild.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. dinteri</i> Bitter	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. forskalii</i> Dunal ( <i>S. albicaule</i> Kotschy ex Dunal)	Hybride quasi stérile	Pas de semences
	<i>S. hastifolium</i> Hochst.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. kurzii</i> Brace & Prain ( <i>S. sanitwongsei</i> Craib.)	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. lamprocarpum</i> Bitter <sup>g</sup>	Hybride quasi stérile	Pas de semences
	<i>S. myoxotrichum</i> Baker	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. pyracanthos</i> Lam.	Pas de germination des semences	
	<i>S. rigescens</i> Jacq.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. rigescentoides</i> Hutch.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. rubetorum</i> Dunal ( <i>S. rigescens</i> auct. Non Jacq.)	Hybride partiellement fertile	
	<i>S. supinum</i> Dunal	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. toliaraea</i> D'Arcy & Rakotozafy	Fruits parthénocarpiques	

(suite p.)

Résultat des croisements interspécifiques entre *S. melongena* et les espèces proches (Daunay 2008). (suite)

Section	Espèce	Résultats <sup>a</sup>	Caractéristiques des semences d'hybride interspécifique <sup>b</sup>
Stellatipilum sensu Seithe Torva Nees	<i>S. tomentosum</i> L.	Hybride partiellement fertile	Mélange de semences à forme normale et de semences vides
	<i>S. tribolatum</i> L.	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. violaceum</i> Ort. ( <i>S. indicum</i> auct. Non L. p. pte)	Hybride partiellement fertile	
	<i>S. grandiflorum</i> Ruiz & Pavon ( <i>S. macranthum</i> Dunal)	Hybride quasi stérile	
	<i>S. giganteum</i> Jacq.	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. goetzii</i> Dammer	Hybride quasi stérile	Pas de semences
	<i>S. hispium</i> Pers. ( <i>S. warscewiczii</i> Weick. ex Lambertye)	Hybride quasi stérile	
	<i>S. schimperianum</i> Hochst.	Fruits parthénocarpiques	
	<i>S. torvum</i> Sw.	Hybride quasi stérile	Descendances obtenues viables <sup>h</sup>
Inconnu	<i>S. mahoriensis</i> D'Arcy & Rakotozafy	Pas d'embryons viables	

Le sens du croisement n'est pas spécifié.

Hybride quasi stérile : stabilité du pollen < 10%

Hybride partiellement fertile : 10% < stabilité du pollen < 50%

Hybride fertile : 50% < stabilité du pollen < 100%

<sup>a</sup> quand un croisement interspécifique est réalisé, de nombreux résultats peuvent être obtenus : pas de formation de fruit sur la plante mère, obtention de fruits parthénocarpiques, formation de fruit mais pas de germination des semences. Quand l'embryon se forme, de nouveaux résultats peuvent être obtenus : mort des plantules, survie des plantules avec production soit anormale soit normale de plantes. Dans le dernier cas, les plantes hybrides peuvent afficher différents niveaux de fertilité évalués ici par la stabilité du pollen.

<sup>b</sup> les résultats ne sont pas disponibles soit en terme de production de semences des hybrides interspécifiques (ces graines n'ayant jamais été semé), ou en terme de viabilité des descendants quand les graines étaient semées.

<sup>c</sup> synonyme : *S. klasianum* Clarke var. *chatterjeeanum* Sengupta, *S. xanthocarpum* auct. Non Schrad. & Wendl.

<sup>d</sup> cette espèce était mal nommée *S. panduriforme* in Daunay et al. 1991, 1999, 2001 et dans Lester and Hasan, 1991.

<sup>e</sup> synonyme : *S. xanthocarpum* Schrad. & Wendl. ; *S. surratense* Burm. F.

<sup>f</sup> les résultats fournis ici sont non détaillés pour *S. aethiopicum* cultigroup. *S. aethiopicum* comme indiqué ici incluent Aculeatum Group (nommé *S. integrifolium*), les groupes Gilo, Kumba et Shum.

<sup>g</sup> cette espèce a été mal nommée *S. zanzibarensis* Vatke in Daunay et al. 1998 et 1999.

<sup>h</sup> différents descendants étaient obtenus à l'INRA après tétraploidisation de hybride interspécifique par traitement à la colchicine, mais jusqu'à présent ils sont stériles (Daunay, 1989-90, Daunay et al. 1999).

ANNEXE 3. Cartes génétiques chez *Capsicum*.

Type de population	Parents	Nombre d'individus	Nom	Nombre de marqueurs	Type de marqueurs	Nombre de groupes de liaison	Longueur de la carte	Références
BC interspécifique	( <i>C. annuum</i> cv. NM6-4 x <i>C. chinense</i> CA4) x NM6-4	80-153		14	14 isozymes	4	~52 cM	Tanksley (1984)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> cv. NM6-4 x <i>C. chinense</i> CA4	85-295						
BC interspécifique	( <i>C. annuum</i> cv. Doux des Landes CA50 x <i>C. chinense</i> CA4) x CA50	46		80	RFLP isozymes	14	634 cM	Tanksley (1988)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> CA133 x <i>C. chinense</i> CA4	46		192	RFLP isozymes	19	720 cM	Prince et al. (1993)
Carte consensus issue de trois croisements intraspécifiques de <i>C. annuum</i>				83-189	RFLP RADP	15-19	417-1515 cM (K)	Lefebvre et al. (1997)
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Perennial x <i>C. annuum</i> Yolo Wonder	94	HD200					
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Vat x <i>C. annuum</i> CM334	44	HD591					
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Yolo x <i>C. annuum</i> CM334	31	HD702					
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> 2002 x <i>C. chinense</i> 1679	86		174	AFLP	12	non disponible	Kim et al. (1997)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> TF68 x <i>C. annuum</i> Habanero	107						Nam et al. (1997)
			SNU-map	580	150 RFLP 430 AFLP	16	1320 cM (K)	Kang et al. (2001)
				502	320 RFLP 136 AFLP 46 SSR	15	1750 cM (K)	Lee et al. (2003) Lee et al. (2004)
			SNU2	333	46 SSR 287 RFLP 139 EST-SSR 41 SSR	15 14	1761,5 cM (K)	Yi et al. (2006)
			SNU3	243	63 RFLP		2201,5 cM (K)	

F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> NuMex Rnaky x <i>C. chinense</i> PI159234	75		677	RFLP Isozyme RADP AFLP	13	1245,7 cM (K)	Livingstone et al. (1999)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> Maor x <i>C. annuum</i> Perennial	180		177	RFLP RAPD AFLP morphologiques	12	1740 cM (K)	Ben Chaim et al. (2001)
Trois populations issues de croisements intraspécifiques de <i>C. annuum</i>				208	RFLP RAPD AFLP morphologiques	16-20 par carte	685-1668 cM (H)	Lefebvre et al. (2002)
HD	H3 x Vania	101	HV			arrangés en 12 groupes consensus		
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Perennial x <i>C. annuum</i> Yolo Wonder	114		PY				
F2 intraspécifique	<i>C. annuum</i> Yolo Wonder x <i>C. annuum</i> CM334	151		YC				
BC2 interspécifique	( <i>C. annuum</i> cv. Maor) x <i>C. frutescens</i> BG2816	248		92	92 RFLP	12	1100 cM (K)	Rao et al. 2003
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> NuMex Rnaky x <i>C. chinense</i> PI159234	75		2262		13	1832 cM (disponible sur <a href="http://www.Keygene.com/pdf/int_map_papper_complete.pdf">http://www.Keygene.com/pdf/int_map_papper_complete.pdf</a> )	Paran et al. (2003)
BC1 intraspécifique	( <i>C. annuum</i> 100/63 x <i>C. chinense</i> PI152225) x 199/63	83						
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> Maor x <i>C. annuum</i> Perennial	180						
HD	(H3 x Vania)	101	HV					
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Perennial x <i>C. annuum</i> Yolo Wonder	114		PY				
	<i>C. annuum</i> Yolo Wonder x <i>C. annuum</i> CM334	151		YC2				
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> Manganji x <i>C. annuum</i> Tongari	117		374	SSR (dont 106 nouveaux)	13	1042,4 cM (K)	Minamiyama et al. (2006)
F2 interspécifique	<i>C. frutescens</i> var. BG2814-6 x <i>C. annuum</i> cv. NuMex Rnaky	94		230	169 COSII...?	12	1613 cM (K)	Ben-Chaim (2006) ; Wu et al. (2009)
F5 intraspécifique	<i>C. annuum</i> Yolo wonder x <i>C. annuum</i> CM334	297	F5YC	587	507 AFLP 40 SSR 19 RFLP 17 SSAP 4 STS	49	1533 cM	Barchi et al. (2007)

## ANNEXES

F2 intraspécifique	<i>C. annuum</i> CM334 x <i>C. annuum</i> Chilsungcho	100	SNU4	209	202 RFLP 6 WRKY 1 SSR	14 assignés aux 12 chromosomes	1482,3 cM (K)	Kim et al. (2008a)
			SNU5	302	175 AFLP 20 SSR 6 RFLP 71 rRAMP 30 WRKY	28	1892 cM (K)	Kim et al. (2008b)
-----								
Carte consensus issue de quatre cartes génétiques			SNU7	854	169 SSR 354 RFLP 29 STS 152 AFLP 51 WRKY 99 rRAMP	12	2143 cM	Lee et al. (2009)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> TF68 x <i>C. chinense</i> Habanero	107	SNU2,	567	236 SSR 318 RFLP 13 BAC		1858 cM	Lee et al. (2004),
			SNU3					Yi et al. (2006)
F2 interspécifique	<i>C. annuum</i> TF68 x <i>C. annuum</i> Habanero	93	SNU6	754	76 SSR 23 BAC 143 WRKY 234 AFLP 278 rRAMP			unpublished data
F2 intraspécifique	<i>C. annuum</i> CM334 x <i>C. annuum</i> Chilsungcho	100	SNU4	283	32 SSR 207 RFLP 4 BAC 9 STS 31 WRKY			Kim et al. (2008a)
			SNU5	754	65 SSR 13 RFLP 20 BAC 13 STS 41 WRKY 199 AFLP 97 rRAMP		1892 cM	Kim et al. (2008b)
-----								
HD intraspécifique	<i>C. annuum</i> PM687 x <i>C. annuum</i> Yolo Wonder)	117		117	114 AFLP 1 SCAR 2 loci de résistance ( <i>pvr2</i> et <i>Me3</i> )	14 dont 9 assignés à 8 chromosomes	737,1 cM (H)	Mahbou et al. en préparation

---

## ANNEXE 4. Extraction d'ADN à partir de feuilles d'aubergine

### Avant le prélèvement.

Préparer les solutions.

### Jour du prélèvement et de l'extraction.

- Allumer le bain marie à 65°C.
- Prélever des jeunes feuilles bien vertes et déposer sur feuille d'aluminium.
- Peser pour ~ 2g de feuilles.
- Ajouter le bisulfite de sodium dans le tampon d'extraction.
- Distribuer 5 ml de tampon d'extraction par échantillon dans des tubes falcon de 50ml. Mettre les tubes dans la glace.
- Broyer les feuilles dans le mortier en présence d'azote. Et déposer la poudre de feuilles dans les tubes falcon contenant le tampon d'extraction.
- Ajouter 5 ml de tampon de lyse et 2 ml de sarcosyl. Homogénéiser doucement par inversion. (Tampon de lyse → lyse des noyaux).
- Placer les tubes au bain marie à 65°C, 20 min. Mélanger par inversion de temps en temps.
- Ajouter ~ 15 ml de chloroforme/alcool iso amylique (24/1) sous la hotte. Mélanger doucement par inversion jusqu'à l'obtention d'un mélange bien homogène.
- Centrifuger à 3600 rpm, 20°C, 25 min. (centrifugeuse Sorval, rotor SLA600TC, Accel. 9 et Decel 8)
- Prélever à l'aide d'une psipette (sorte de poire-pipette) la phase aqueuse (phase supérieure) dans un nouveau tube falcon de 50 ml, sous la hotte. On récupère ~10 ml de la phase aqueuse (liquide jaune), surtout ne pas prélever de liquide de la phase inférieure (verte).
- Ajouter doucement le long de la paroi du tube 2 ml d'éthanol absolu froid (conservation au congélateur et durant les manips dans la glace). (0,35 vol d'éthanol absolu → précipitation des polysaccharides)
- **Mélanger immédiatement et doucement** par inversion jusqu'à l'homogénéisation (sinon précipitation de l'ADN).
- Incuber 15 min dans la glace.
- Centrifuger 10 min, 3600 rpm, 20°C. (Centrifugation → formation d'un culot clair et gélatineux correspondant aux polysaccharides)

- Pendant la centrifugation, ajouter 2ml Ethanol 76% /Ac Na 0,2 M dans des tubes à hémolyse.
- Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube en versant directement. Le culot des polysaccharides restent bien accroché au fond du tube.
- Ajouter au surnageant 1 vol d'éthanol absolu froid. Mélanger doucement par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN.
- Prélever l'ADN au crochet Pasteur et le mettre dans un tube à hémolyse contenant 2 ml d'éthanol.
- Ajouter de nouveau 1 vol d'éthanol absolu froid. Mélanger doucement par inversion jusqu'à l'apparition des filaments d'ADN. → pour bien récupérer tout l'ADN. Cependant une phase de précipitation peut être nécessaire si les filaments n'apparaissent pas ou si la pelote est trop petite (cf. fin de protocole)
- Laisser 10 min sur la paillasse (maxi 1 heure).
- Essorer la pelote contre le bord du tube et transférer l'ADN dans un tube Eppendorf contenant le TE (le volume dépend de la taille de la pelote (petite et moyenne pelote → 500µl de TE, grosse pelote → 750 µl de TE)
- Laisser reprendre 2 nuits à 4°C.
- Conserver l'ADN à 4°C (pour une courte période) ou congelé à -20°C.

#### Etape de précipitation

- Centrifuger les tubes 10min, 3600rpm, 4°C.
- Jeter le surnageant en gardant le culot d'ADN.
- Précipiter avec 2ml de Na Ac 1M
- Essayer de dissoudre au maximum le culot (vortex, agitation).
- Rajouter 2 volumes d'éthanol froid (1 par 1)
- Mélanger par inversion jusqu'à apparition de la pelote. Prélever l'ADN au crochet.
- Rincer l'ADN dans un tube à hémolyse contenant 2ml d'éthanol dans un tube Eppendorf contenant du TE.
- Laisse reprendre 2 nuits à 4°C.
- Conserver l'ADN à 4°C (pour une courte période) ou congelé à -20°C.



**Solutions et Matériels**

- ✓ Mortier et pilon
- ✓ Tubes en polypropylène de 50 ml (tube Falcon)
- ✓ Tampon d'extraction :

	Concentration	100 ml	500 ml	1050 ml
D-Sorbitol	0,35 M	6,375 g	31,88 g	66,9 g
Tris	0,1 M	1,21 g	6,05 g	12,7 g
EDTA	5 mM	0,17 g	0,85 g	1,78 g
NaCl	2 M	11,7 g	58,5 g	122,8 g

Ajuster le pH à 8,25 (avec HCl)

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (à rajouter au dernier moment)	70 mM	1,33 g	6,65 g	13,965 g
--	-------	--------	--------	----------

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : bisulfite de sodium

Le tampon doit être conservé à 4°C.

- ✓ Tampon de lyse :

	Concentration	100 ml	500 ml	1050 ml
Tris HCl 1M pH 8	200 mM	20 ml	100 ml	210 ml
EDTA 0,5 M pH 8	50 mM	10 ml	50 ml	105 ml
NaCl	2 M	11,7 g	58,5 g	122,8 g
CTAB	2 %	2 g	10 g	21 g

CTAB : hexadécyl-triméthyl-ammonium bromide

Le tampon de lyse doit être conservé à 20°C car le CTAB précipite à 4°C.

- ✓ Sarcosyl 5% (N Lauryl sarcosine)
- ✓ Chloroforme / alcool isoamylique : 24/1 (Utiliser des ustensiles en verre et travailler sous la hotte).
- ✓ Ethanol 76% / AcNa 0,2M  
 Pour 200 ml NaAc (3M) = 13,34 ml  
 EtOH pur ou 98% = 152,76 ou 155,1 ml  
 H<sub>2</sub>O = 33,9 ou 31,56 ml
- ✓ TE 10/1 pH8 (Tris / EDTA) → 10 mM Tris HCl et 1 mM EDTA

	Concentration	100 ml	
Tris HCl (157,6 g/mol)	10 mM	0,158 g	1 ml
EDTA	1 mM	0,034 g	0,2 ml

Ajuster le pH à 8 avec du HCl concentré.  
 Autoclaver.

- ✓ Ethanol absolu (100%)
- ✓ Pipette pasteur
- ✓ Pipette plastique

<u>Tris HCl 1M pH8 T° = 25°C</u>	Pour 1litre	Trizma HCl (sigma 7 - 9)	88,8 g
		Trizma Base	53 g
		H <sub>2</sub> O	1L

#### EDTA 0,5M pH8

H <sub>2</sub> O (ml)	125	250	500	1000	1200
EDTA (g)	23,26	46,53	93,06	186,12	223,34

Peser le produit. Ajouter eau osmosée  
 Ajuster pH8 avec Billes NaOH → EDTA se dissout qu'à pH basique  
 Ajuster le volume eau osmosée  
 Autoclaver.

### ANNEXE 5. AFLP protocole

The AFLP analysis was performed as described by Vos et al. (1995). The *EcoRI*/*MseI* primers were used for surveying the AFLP polymorphism between the two parents, MM738 and MM960, and then, they were used for genotyping the RILs population. 250 ng total genomic DNA was digested with 2.5 U of each both restriction enzymes *EcoRI* and *MseI* (AFLP® Core Reagent kit, Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for 2 h at 37°C in a final volume of 25 µl. The enzymes were inactivated for 15 min at 65°C and then, digestion products were ligated by adding 1 U T4 DNA ligase and the *EcoRI* and *MseI* adapters included in T4 DNA ligase reaction buffer (AFLP® Core Reagent kit, Invitrogen) in a final volume of 50 µl for 2 h at room temperature, then, 2 h at 20°C. The pre-amplification reactions were performed in a 50 µl volume with 5 µl of undiluted digestion – ligation products, 1.5 U *Taq* DNA polymerase, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X *Taq* buffer (RedGoldStar® DNA polymerase, Eurogentec, Seraing, Belgium), and 38.8 µl of AFLP® Pre-amp Primer Mix I kit (Invitrogen) that containing dNTPs and a pair of primers based on the adapter sequences, each having one selective nucleotide (*Eco*-A and *Mse*-C). The PCR reaction was performed on a GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using the following parameters: 72°C for 2 min, 94°C for 2 min, 25 cycles at 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 2 min; then a final elongation cycle 72°C for 10 min. The selective amplification of preamplified fragments was performed with eight *EcoRI* primers (Applied Biosystem) and eight *MseI* primers (GeneCust, Dudelange, Luxembourg), each with three selective nucleotides.

Name and sequence of selective amplification primers used in AFLP study.

Name	Sequence (5' to 3' )
<i>EcoRI</i> -AAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C
<i>EcoRI</i> -AAG	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G
<i>EcoRI</i> -ACA	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A
<i>EcoRI</i> -ACC	GAC TGC GTA CCA ATT CAC C
<i>EcoRI</i> -ACG	GAC TGC GTA CCA ATT CAC G
<i>EcoRI</i> -ACT	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T
<i>EcoRI</i> -AGC	GAC TGC GTA CCA ATT CAG C
<i>EcoRI</i> -AGG	GAC TGC GTA CCA ATT CAG G
<i>MseI</i> -CAA	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
<i>MseI</i> -CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
<i>MseI</i> -CAG	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
<i>MseI</i> -CAT	GAT GAG TCC TGA GTA ACA T
<i>MseI</i> -CTA	GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
<i>MseI</i> -CTC	GAT GAG TCC TGA GTA ACT C
<i>MseI</i> -CTG	GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
<i>MseI</i> -CTT	GAT GAG TCC TGA GTA ACT T

The sequences of the 3' selective nucleotides in the primers that we used for AFLP were *EcoRI* plus three selective nucleotides: AAC, AAG, ACA, ACC, ACG, ACT, AGC, AGG; *MseI* plus three selective nucleotides: CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC, CTG,CTT. The 5' end of *EcoRI* primers was labelled with fluorescent dye. The selective amplification was performed in 15 µl volume with 1X *Taq* buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 U *Taq* DNA polymerase (RedGoldStar®), 0.2 µM *MseI* primer, 0.1 µM *EcoRI* fluorescent primer, 0.2 mM dNTPs (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA) and 5 µl of 1/20-diluted preamplification products for one cycle of 94°C for 5 min; 13 cycles of 94°C for 30 s, 65°C decreasing by 0.7°C per cycle for 30 s, and 72°C for 2 min, 24 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 2 min, and then, a final elongation cycle 72°C for 10 min. PCR products (1 µl) were mixed with 10.7 µl of Hi-Di formamide (Applied Biosystems) and 0.3 µl of internal size standard GeneScan 500 LIZ (Applied Biosystems), denatured at 90°C during five minutes and immediately cooled on ice. The PCR fragments were separated by capillary electrophoresis with Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer. The AFLP data was analysed with the GelCompar II® software, version 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Only AFLP bands ranging from 50 to 500 bp were scored (1 if present, 0 if absent) and analyzed.

## ANNEXE 6. Protocoles de marquage

### Protocole de marquage COS

#### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		15,5
Tp10x	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	1
Amorce (de chaque)		0,5
Taq		0,5
ADN		2,5

#### Programme PCR

Etapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	5 min
Dénaturation		94°C	1 min
Hybridation	45 cycles	55°C	1 min 30 sec
Elongation		72°C	1 min 30 sec
Elongation final	1 cycle	72°C	6 min

Digestion	Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
Tp adapté	2
Enzyme	5
H <sub>2</sub> O	qsp 10 $\mu\text{L}$
Produit PCR	10

Ajouter 3 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 1,5% d'agarose.

Migrer à 120V durant 2h puis colorer dans du BET.

## Protocole de marquage CAPS

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité (µL)
H <sub>2</sub> O		9,5
Tp10x	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	1
Amorce (de chaque)	10µM	2,5
Taq		0,5
ADN		2,5

### Programme PCR

Etapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	5 min
Dénaturation		94°C	1 min
Hybridation	35 cycles	50°C	1 min
Elongation		72°C	1 min 30 sec
Elongation final	1 cycle	72°C	5 min

Digestion	Volume unité (µL)
Tp adapté	2
Enzyme	5
H <sub>2</sub> O	qsp 10 µL
Produit PCR	10

Ajouter 3µL de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8µL de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 3% d'agarose.

Migrer à 110V durant 2h30 puis colorer dans du BET.

## Protocole de marquage RGA

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		10,5
Tp10x	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	2
Amorce (de chaque)	10 $\mu\text{M}$	0,5
Taq		2
ADN	10 ng/ $\mu\text{L}$	5

### Programme PCR

Etapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	5 min
Dénaturation		94°C	30 sec
Hybridation	10 cycles	57°C	1 min
Elongation		72°C	1 min 10 sec
Dénaturation		94°C	30 sec
Hybridation	40 cycles	55°C	1 min
Elongation		72°C	1 min 10 sec
Elongation final	1 cycle	72°C	4 min

Ajouter 6 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 4% d'agarose.

Migrer à 130V durant 2h30 puis colorer dans du BET.

## Protocole de marquage SRAP

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		15,2
Tp10x	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	0,5
Amorce (de chaque)	10 $\mu\text{M}$	1
Taq		2
ADN	10 ng/ $\mu\text{L}$	2,5

### Programme PCR

Étapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	5 min
Dénaturation	5 cycles	94°C	1 min
Hybridation		35°C	1 min
Elongation		72°C	2 min
Dénaturation	30 cycles	94°C	1 min
Hybridation		50°C	1 min
Elongation		72°C	2 min
Elongation final	1 cycle	72°C	5 min

Ajouter 6 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 3% d'agarose.

Migrer à 150V durant 3h puis colorer dans du BET.



## Protocole de marquage RAPD

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		16,05
Tp10x	1X	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3
dNTP	10 mM	0,25
Amorce (de chaque)	10 $\mu\text{M}$	0,2
Taq		2,5
ADN	20 ng/ $\mu\text{L}$	1

### Programme PCR

Étapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	7 min
Dénaturation		94°C	1 min
Hybridation	40 cycles	35°C	1 min
Elongation		72°C	2 min
Elongation final	1 cycle	72°C	5 min

Ajouter 6 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 2% d'agarose.

Migrer à 110V durant 1h30 puis colorer dans du BET.

## Protocole de marquage SSR aubergine

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		9,7
Tp10x	1X	1
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,9
dNTP	10 mM	0,3
Amorces (mélange de forward et reverse)	5 $\mu\text{M}$	0,6
Taq		1,5
ADN	20 ng/ $\mu\text{L}$	1

### Programme PCR

Étapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	3 min
Dénaturation		94°C	30 sec
Hybridation	35 cycles	60°C	1 min
Elongation		72°C	1 min
Elongation final	1 cycle	72°C	5 min

Ajouter 6 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 5% d'agarose.

Migrer à 130V durant 3h puis colorer dans du BET.

## Protocole de marquage SSR tomate

### Mélange réactionnel

Produits		Volume unité ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		10
Tp10x	1X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	1
Amorce (de chaque)	10 $\mu\text{M}$	2,5
Taq		0,5
ADN	10 ng/ $\mu\text{L}$	2,5

### Programme PCR

Étapes	Nombre de cycle	Température	Temps
Dénaturation préliminaire	1 cycle	94°C	5 min
Dénaturation		94°C	30 sec
Hybridation	35 cycles	55°C	1 min
Elongation		72°C	1 min
Elongation final	1 cycle	72°C	7 min

Ajouter 3 $\mu\text{L}$  de tampon de charge pour chaque échantillon.

Déposer 8 $\mu\text{L}$  de marqueur de taille de 100 pb et les amplifiats sur un gel TAE1X à 4,5% d'agarose.

Migrer à 120V durant 2h30 puis colorer dans du BET.

## ANNEXE 7. Analyse du maximum de vraisemblance

Hypothèse 2 : Résistance au flétrissement bactérien portée par deux gènes indépendants A et B où au moins un des deux gènes confère la résistance.

Soit : le marqueur M,  
les génotypes parentaux  
MM738 [a b]  
AG91-25 [A B]

Si le marqueur M est lié à A,

$$\left. \begin{array}{l} \text{M-A} \quad \frac{1-r}{2} \\ \text{m-a} \quad \frac{1-r}{2} \\ \text{M-a} \quad \frac{r}{2} \\ \text{m-A} \quad \frac{r}{2} \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{parentaux} \\ \text{recombinés} \end{array}$$

$r$  : pourcentage de recombinaison

Valeurs des fréquences théoriques  $x_i$

Marqueur lié aux gènes

		B $\frac{1}{2}$	b $\frac{1}{2}$
M-A	$\frac{1-r}{2}$	$\frac{1-r}{4}$	$\frac{1-r}{4}$
m-a	$\frac{1-r}{2}$	$\frac{1-r}{4}$	$\frac{1-r}{4}$
M-a	$\frac{r}{2}$	$\frac{r}{4}$	$\frac{r}{4}$
m-A	$\frac{r}{2}$	$\frac{r}{4}$	$\frac{r}{4}$

Marqueur lié au phénotype

		B $\frac{1}{2}$	B $\frac{1}{2}$
M-A	$\frac{1-r}{2}$	M-résistant	M-résistant
m-a	$\frac{1-r}{2}$	m-résistant	m-sensible
M-a	$\frac{r}{2}$	M-résistant	M-sensible
m-A	$\frac{r}{2}$	m-résistant	m-résistant

Phénotype résistant (AB, Ab ou aB)

Phénotype sensible (ab)

Pour les lignées recombinantes (RILs),

$$r = \frac{R}{2(1-R)}$$

$R$  : pourcentage de lignées recombinantes

*Fréquences de l'association marqueur- phénotype*

	Fréquence		
	Théorique	Observé	Indépendant
M-résistant	$x_1 = \frac{2-r}{4}$	$a_1$	$\frac{3}{8}$
m-résistant	$x_2 = \frac{1+r}{4}$	$a_2$	$\frac{3}{8}$
M-sensible	$x_3 = \frac{r}{4}$	$a_3$	$\frac{1}{8}$
m-sensible	$x_4 = \frac{1-r}{4}$	$a_4$	$\frac{1}{8}$

Valeurs indépendantes sont calculées quand  $r = 0,5$ .

*Calcul du maximum de vraisemblance*

Loi de vraisemblance : 
$$e = K \times \prod_{i=1}^4 x_i^{a_i}$$

Avec  $K$  : constante

Simplification en log : 
$$L = \sum_{i=1}^4 a_i \log x_i$$

Le maximum d'une fonction est quand sa dérivée est nulle.

Maximum de vraisemblance : 
$$\frac{\partial L}{\partial x} = \sum_{i=1}^4 a_i \frac{\partial \log x_i}{\partial r} = 0$$

$$\frac{\partial L}{\partial x} = \sum_{i=1}^4 \left( a_i \frac{-\partial x_i}{x_i} \right) = \frac{a_1}{2-r} - \frac{a_2}{1+r} - \frac{a_3}{r} + \frac{a_4}{1-r}$$

On obtient, une équation du type  $Ar^3 + Br^2 + Cr + D = 0$

avec

$$A = a_1 + a_2 + a_3 + a_4$$

$$B = -(3a_2 + 2a_3 + a_4)$$

$$C = -(a_1 - 2a_2 + a_3 + 2a_4)$$

$$D = 2a_3$$

Résolution équation du 3<sup>ème</sup> degré

Résolution par la méthode de Cardan avec  $\Delta < 0$  et  $r$  compris entre 0 et 0,5.

$$r = 2R \cos\left(\frac{\alpha + 4\pi}{3}\right) + T$$

avec

$$R = \sqrt{-\frac{P}{3}}$$

$$P = \frac{C}{A} - \frac{B^2}{3A^2}$$

$$\alpha = \frac{\pi}{2} - \arctan\left(\frac{S}{\sqrt{1-S^2}}\right)$$

$$S = -\frac{Q}{2\sqrt{-\frac{P^3}{27}}}$$

$$Q = \frac{2B^3}{27A} + \frac{D}{A} - \frac{BC}{3A}$$

$$T = -\frac{B}{3A}$$

## Calcul du LOD score

$$LOD = \log_{10}\left(\frac{\text{Vraisemblance en fonction du } r \text{ calculé}}{\text{Vraisemblance sous l'hypothèse d'indépendance}}\right)$$

$$LOD = \log_{10}\left(\frac{e^{L(r)}}{e^{L(r=0,5)}}\right)$$

avec

$$e^{L(r)} = K \times \prod_{i=1}^4 x_i^{a_i}$$

pour des lignées recombinantes (RILs)  $R = \frac{2r}{1+2r}$

$$e^{L(r)} = K \left(\frac{2-R}{4}\right)^{a_1} \left(\frac{1+R}{4}\right)^{a_2} \left(\frac{R}{4}\right)^{a_3} \left(\frac{1-R}{4}\right)^{a_4}$$

$$e^{L(r=0,5)} = K \times \left(\frac{3}{8}\right)^{a_1} \times \left(\frac{3}{8}\right)^{a_2} \times \left(\frac{1}{8}\right)^{a_3} \times \left(\frac{1}{8}\right)^{a_4}$$

Pour chaque marqueur, on calcule le pourcentage de recombinaison ( $r$ ) et le LOD score.

Hypothèse 3 : Résistance au flétrissement bactérien portée par trois gènes indépendants A, B et C où au moins un des gènes confère la résistance.

Soit : le marqueur M,

les génotypes parentaux

MM738 [a b c]  
AG91-25 [A B C]

Si le marqueur M est lié à A,

$$\begin{array}{l}
 \text{M-A} \quad \frac{1-r}{2} \\
 \text{m-a} \quad \frac{1-r}{2} \\
 \text{M-a} \quad \frac{r}{2} \\
 \text{m-A} \quad \frac{r}{2}
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{parentaux} \\ \\ \text{recombinés} \end{array}$$

$r$  : pourcentage de recombinaison

Valeurs des fréquences théoriques  $x_i$

Marqueur lié aux gènes

		B		b	
		C $\frac{1}{2}$	c $\frac{1}{2}$	C $\frac{1}{2}$	c $\frac{1}{2}$
M-A	$\frac{1-r}{2}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$
m-a	$\frac{1-r}{2}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$	$\frac{1-r}{8}$
M-a	$\frac{r}{2}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$
m-A	$\frac{r}{2}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$	$\frac{r}{8}$

Marqueur lié au phénotype

		B		b	
		C $\frac{1}{2}$	c $\frac{1}{2}$	C $\frac{1}{2}$	c $\frac{1}{2}$
M-A	$\frac{1-r}{2}$	M-résistant	M-résistant	M-résistant	M-résistant
m-a	$\frac{1-r}{2}$	m-résistant	m-résistant	m-résistant	m-sensible
M-a	$\frac{r}{2}$	M-résistant	M-résistant	M-résistant	M-sensible
m-A	$\frac{r}{2}$	m-résistant	m-résistant	m-résistant	m-résistant

Phénotype résistant (ABC, ABc, AbC, Abc, aBC, aBc ou abc)

Phénotype sensible (abc)

Pour les lignées recombinantes (RILs),

$$r = \frac{R}{2(1-R)}$$

$R$  : pourcentage de lignées recombinantes

*Fréquences de la liaison marqueur-phénotype*

	Fréquence		
	Théorique	Observé	Indépendant
M-résistant	$x_1 = \frac{4-r}{8}$	$a_1$	$7/16$
m-résistant	$x_2 = \frac{3+r}{8}$	$a_2$	$7/16$
M-sensible	$x_3 = \frac{r}{8}$	$a_3$	$1/16$
m-sensible	$x_4 = \frac{1-r}{8}$	$a_4$	$1/16$

Valeurs indépendantes sont calculées quand  $r=0,5$ .

*Calcul du maximum de vraisemblance*

Loi de vraisemblance : 
$$e = K \times \prod_{i=1}^4 x_i^{a_i}$$

Avec  $K$  : constante

Simplification en log : 
$$L = \sum_{i=1}^4 a_i \log x_i$$

Le maximum d'une fonction est quand sa dérivée est nulle.

Maximum de vraisemblance : 
$$\frac{\partial L}{\partial x} = \sum_{i=1}^4 a_i \frac{\partial \log x_i}{\partial r} = 0$$

$$\frac{\partial L}{\partial x} = \sum_{i=1}^4 \left( a_i \frac{-\partial x_i}{x_i} \right) = \frac{a_1}{4-r} - \frac{a_2}{3+r} - \frac{a_3}{r} + \frac{a_4}{1-r}$$

On obtient, une équation du type  $Ar^3 + Br^2 + Cr + D = 0$

avec

$$A = a_1 + a_2 + a_3 + a_4$$

$$B = -(2a_1 + 5a_2 + 2a_3 + a_4)$$

$$C = -(3a_1 - 4a_2 + 11a_3 + 12a_4)$$

$$D = 12a_3$$



Résolution équation du 3<sup>ème</sup> degré

Résolution par la méthode de Cardan avec  $\Delta < 0$  et  $r$  compris entre 0 et 0,5.

$$r = 2R \cos\left(\frac{\alpha + 4\pi}{3}\right) + T$$

avec

$$R = \sqrt{-\frac{P}{3}}$$

$$P = \frac{C}{A} - \frac{B^2}{3A^2}$$

$$\alpha = \frac{\pi}{2} - \arctan\left(\frac{S}{\sqrt{1-S^2}}\right)$$

$$S = -\frac{Q}{2\sqrt{-\frac{P^3}{27}}}$$

$$Q = \frac{2B^3}{27A} + \frac{D}{A} - \frac{BC}{3A}$$

$$T = -\frac{B}{3A}$$

Calcul du LOD score

$$LOD = \log_{10}\left(\frac{\text{Vraisemblance en fonction du } r \text{ calculé}}{\text{Vraisemblance sous l'hypothèse d'indépendance}}\right)$$

$$LOD = \log_{10}\left(\frac{e^{L(r)}}{e^{L(r=0,5)}}\right)$$

avec

$$e^{L(r)} = K \times \prod_{i=1}^4 x_i^{a_i}$$

pour des lignées recombinantes (RILs)  $R = \frac{2r}{1+2r}$

$$e^{L(r)} = K \left(\frac{4-R}{8}\right)^{a_1} \left(\frac{3+R}{8}\right)^{a_2} \left(\frac{R}{8}\right)^{a_3} \left(\frac{1-R}{8}\right)^{a_4}$$

$$e^{L(r=0,5)} = K \times \left(\frac{3}{16}\right)^{a_1} \times \left(\frac{3}{16}\right)^{a_2} \times \left(\frac{1}{16}\right)^{a_3} \times \left(\frac{1}{16}\right)^{a_4}$$

Pour chaque marqueur, on calcule le pourcentage de recombinaison ( $r$ ) et le LOD score.

## ABSTRACT

The plant pathogenic soil-borne bacteria *Ralstonia solanacearum* causes heavy damage to solanaceous crops. One of the dilemmas for varietal breeding of solanaceous crops is the circumvention of the resistance to *R. solanacearum* due to the genotypic variability and plasticity of this pathogen. Thirty accessions of Tomato, Eggplant, and Pepper (Core-TEP), screened with a collection of 12 representative strains of *R. solanacearum* phylotype I, II and III (Core-Rs2) within the species complex ranked from highly resistant to highly susceptible. The strains were grouped according to their profile of virulence on all three solanaceous, and by considering each species individually. We refer to these groups respectively, as pathoprofiles and pathotypes. No universal resistance was found for the three host species. Genetic analysis of resistance to *R. solanacearum* in eggplant was conducted against four strains of phylotype I. We used a population of recombinant lines F6 as well as the generations derived from the intraspecific cross between *S. melongena* MM738 (S) and AG91-25 (R). A genetic map was built with 119 markers a combination of AFLPs, SSRs and SRAPs positioned on 18 linkage groups, for a total length of 884 cM. The genetic analysis revealed that resistance to strains CMR134, PSS366, and GMI1000 was controlled by one single major gene, which explained up to 87% of the phenotypic variation. When the resistance against the highly virulent PSS4 strain is tested, this gene is not detected. In this case, a significant QTL with intermediate effect that explains up to 38% of phenotypic variation was found on another linkage group for this strain.

## RESUME

*Ralstonia solanacearum* est une bactérie vasculaire d'origine tellurique dévastatrice chez les Solanacées maraîchères. L'une des difficultés pour la sélection variétale réside dans le contournement de la résistance, en raison de la grande variabilité et plasticité génotypique du pathogène. Trente accessions de tomate, aubergine et piment (Core-TEP) testées vis-à-vis de 12 souches représentatives des phylotypes I, II et III de *R. solanacearum* (Core-Rs2) ont été classées de très sensibles à très résistantes. Des groupes de souches définis en fonction de leur virulence et agressivité ont été nommés pathoprofiles, d'une part, lorsque établis sur les 3 espèces et pathotypes, d'autre part, lorsque établis sur chacune des trois espèces. Aucune résistance universelle n'a pu être mise en évidence chez aucune des trois espèces. Le déterminisme génétique de la résistance à *R. solanacearum* chez l'aubergine a été étudié sur une population de lignées recombinantes F6 ainsi que sur les générations issues du croisement intraspécifique *S. melongena* MM738 (S) x AG91-25 (R), testées vis-à-vis de quatre souches du phylotype I. Une carte génétique composée de 119 marqueurs AFLP, SSR et SRAP, positionnés sur 18 groupes de liaisons, pour une longueur totale de 884 cM, a été construite. Les analyses génétiques montrent que la résistance aux souches CMR134, PSS366, GMI1000 est contrôlée par un même gène majeur expliquant jusqu'à 87% de la variance phénotypique. Celui-ci n'est pas détecté vis-à-vis de la souche virulente PSS4 qui contourne cette résistance. Dans ce cas, seul un QTL à effet intermédiaire expliquant jusqu'à 38 % de la variance phénotypique est trouvé sur un autre groupe de liaison.