



**HAL**  
open science

# Epidémiologie et étiologie de la nervation blanche de la courgette causée par des bactéries du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae*

Caroline Lacault

► **To cite this version:**

Caroline Lacault. Epidémiologie et étiologie de la nervation blanche de la courgette causée par des bactéries du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae*. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0005 . tel-03738036

**HAL Id: tel-03738036**

**<https://theses.hal.science/tel-03738036>**

Submitted on 25 Jul 2022

**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.

**DOCTORAT / ECOLOGIE**  
**BRETAGNE / GEOSCIENCES**  
**LOIRE / AGRONOMIE ALIMENTATION**



# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
Spécialité : *Sciences agronomiques*

Par

**Caroline LACAULT**

## **Epidémiologie et étiologie de la nervation blanche de la courgette causée par des bactéries du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae***

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 29 avril 2021.

Unité de recherche : EmerSys, IRHS (Université d'Angers, INRAE, Institut Agro) UMR 1345

Thèse N° :

Rapporteurs avant soutenance :

Isabelle ROBENE  
Denis FAURE

Chercheuse HDR, CIRAD  
Directeur de Recherches, CNRS

Composition du Jury :

Président :

Examineurs : Thomas BALDWIN  
Thomas GUILLEMETTE

Ingénieur, GEVES  
Professeur, Université d'Angers

Directrice de thèse : Marie-Agnès JACQUES  
Co-encadrante de thèse: Armelle DARRASSE

Directrice de Recherches, INRAE  
Ingénieure de Recherches, INRAE



À maman et à papi,





## Remerciements

# REMERCIEMENTS

Nous y voilà. Quelque part, j'ai un doute sur le fait qu'il s'agisse de la réalité, et pourtant je crois bien que c'est vrai. Il y a quelques semaines, je me disais que c'était strictement impossible d'y arriver, que cette épreuve serait insurmontable et cette thèse interminable. C'est particulièrement dans ces instants les plus difficiles que l'on perçoit à quel point notre entourage est la source de notre énergie et est contributeur de notre détermination. La thèse est une expérience assez unique, source de joie immense à certains instants mais aussi d'angoisses profondes à d'autres. Avec le recul, cette expérience hors du commun m'a appris beaucoup de choses sur le plan scientifique, humain et personnel. Aujourd'hui je suis heureuse d'être arrivée jusqu'ici, mais surtout je suis extrêmement reconnaissante d'avoir eu la chance d'être accompagnée par de nombreuses personnes dans cette folle aventure.

Tout d'abord, je souhaiterais remercier **Isabelle Robène, Denis Faure, Thomas Baldwin et Thomas Guillemette** pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie également **Christian Vernière** et **Odile Berge**, membres de mon comité de suivi individuel pour leur gentillesse, leur bienveillance et leurs conseils scientifiques avisés.

**Marie-Agnès**, je sais que tu n'aimes pas quand je fais des « listes à la Prévert » mais promis, celle-ci est l'une des dernières. Je voudrais t'exprimer toute ma reconnaissance et te remercier d'avoir accepté d'encadrer cette thèse. Je suis admirative de ta rigueur scientifique, de ton incroyable perspicacité, de ta capacité à corriger les papiers en un temps record et de ta connaissance de milliers de références. Tu as toujours été disponible pour moi, toujours bon conseil et prête à partir sur le front dans toutes les situations. Merci pour ta grande bienveillance. Merci aussi pour ta patience, notamment dans les moments de la rédaction, où ça n'a pas été facile.

**Armelle**, en premier lieu, je tiens à te remercier pour avoir accepté de me faire confiance pour encadrer ta première thésarde ! Cette expérience était pour moi incroyable, et c'est vraiment avec toute mon affection et amitié que je voudrais te remercier. Tout au long de cette thèse tu as toujours été à l'écoute, bienveillante, hyper impliquée et super disponible. Toujours de super conseils scientifiques pour améliorer mon travail, m'aider aux analyses, à la rédaction, super pédagogue pour m'expliquer les choses incomprises et toujours prête à venir à la rescousse quand ça n'allait pas ! Je crois que tu n'imagines pas à quel point tu as été importante pour que je tienne le cap, notamment lors de la rédaction de cette thèse. Ton encadrement était exceptionnel et je suis vraiment heureuse d'avoir partagé cette expérience avec toi. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite, et ce sera avec un plaisir immense de t'accueillir à la maison lorsque nous aurons déménagé dans le sud pour de nouvelles aventures !



**Tim**, tout d'abord j'espère que ta retraite se passe bien et que tu profites des grasses matinées avec le journal et les croissants au lit. Je voudrais te remercier d'avoir initié cette thèse et de m'avoir fait confiance. Sans toi et ta curiosité scientifique assidue, ce projet n'aurait pas été possible. J'ai pris beaucoup de plaisir à travailler avec toi, notamment parce-que tu portes bien souvent un regard critique et différent sur les choses. J'ai beaucoup apprécié toutes nos discussions diverses et variées pour « refaire le monde » surtout quand c'était agrémenté de ces petites pointes d'humour anglais, parfois insaisissable. Je te souhaite vraiment tout le meilleur pour la suite et au plaisir de se revoir prochainement. Et surtout : « NOUS LES AURONS A L'USURE ! »

**Juliette**, je voudrais te remercier pour ta bienveillance à mon égard, tes conseils lors des comités de thèse, ton soutien pour la rédaction (en connaissance de cause !) et ta disponibilité quand j'en avais besoin. C'était un plaisir de pouvoir échanger avec toi et discuter de différents aspects de cette thèse. Merci d'avoir pu me fournir toutes les données dont j'avais besoin pour mes travaux. **Hubert**, merci d'avoir toujours été disponible pour cette thèse et pour les diverses discussions que nous avons eu sur les travaux. Merci également pour ta confiance et ton accueil lors de mes visites au laboratoire. Merci à vous deux pour vos relectures du manuscrit et des articles scientifiques. Merci à **Martine** et **Michel** pour leur grande sympathie, leur disponibilité et leur aide quand j'en avais besoin.

**Stacy**, c'était super de pouvoir t'encadrer pour ton stage de césure. J'espère que tu as trouvé une alternance en sélection variétale. Merci de m'avoir aidé pour les essais.

Merci beaucoup à **Joachim** pour les prospections dans les parcelles de courgettes. C'était un plaisir de partir échantillonner avec une personne aussi spontanée, passionnée et impliquée dans son travail. Je garderai des bons souvenirs des échantillonnages dans le Gard à 22h et de la prêle sapin. Pour les prospections, je tiens également à remercier **Marie M.**, **Sophie C.** et **Matthieu N.** Merci à **Denis B.**, **Christophe** et **Laurent** pour le suivi des courgettes lors de l'essai transmission. La serre va enfin pouvoir être disponible cet été pour une autre culture ! Merci à **Perrine D.**, **Clément**, **Pierrick** et **Sandrine** pour leur aide lors des tests de pouvoir pathogène. Merci à **Sylvie** et **Stéphane** pour les lots de semences de courgette. Merci à **Sophie V.**, **Fabien**, **Coraline** et **Julien** pour toutes les discussions que nous avons eu autour des courgettes et de *Pseudomonas syringae*. C'était toujours passionnant de discuter avec vous. Merci à **Thomas** pour tout le temps qu'il m'a accordé, son intérêt pour la thèse et sa bienveillance. Merci à **Florence** et **Maria** pour toutes les réponses aux questions que j'ai pu avoir et leur sympathie. Merci à **Dominique**, **Elodie** et **Anne** pour leur aide administrative.

Merci à **Daniel** pour tous les tests à l'INRAE sous serre. Merci aussi à **Tristan**, **Guillaume L.B** et Florian pour leur aide dans les analyses sur la plateforme Phénotic. Merci à **Muriel** et **Coralie** du Plateau ANAN ainsi qu'à **Aurélia** et **Fabienne** du plateau I-mac. Merci à **Perrine**, **Cécile**, **Géraldine** et **Audrey** de la CFBP pour les souches. Sans vous, les thésards seraient bien embêtés ! Merci pour votre aide.



Merci à **Super Martial** d'être venu à la rescousse de si nombreuses fois. Entre les problèmes de génomes, de mots de passe, d'ordinateur en panne, de license Geneious, de VNP qui ne marche plus etc. Tu étais le **sauveur** ! C'était un plaisir de partager ton bureau. J'espère que la prochaine personne sera moins bordélique que moi. Merci à **Enora** et **Sophie C.** pour toutes les astuces dans le design de la q-PCR multiplex. Merci à **Marie S.** pour ses conseils autour des analyses, notamment avec R. Merci à **Sophie B.** pour tous ses conseils pour les électroporations et les autres manip. Merci à **Marion** pour son aide en phylogénie. Merci à **Anne** et **Chrystelle** pour leur coup de pouce pour les manip pendant que j'avais mal à l'épaule. Merci aussi à **Matthieu** pour sa relecture du papier n°1. Merci **Karine** pour ton aide sur ClonalFrame. Merci à toute l'équipe **EmerSys** pour ces moments agréables !! ☺

Merci aux copains doctorants, **Enora, Justine, Ellen, Aude** et **Guillaume**. C'était une super chouette expérience de vivre ça avec vous ! Merci les filles pour votre soutien pendant les dernières semaines un peu difficiles ☺ Merci aux copains qui m'ont soutenu pendant toute cette thèse, **FAN, Ange, Toni, Bardoche**, toute la team **PPE, Felix** et **Thom**.

Merci à toute ma famille. Plus particulièrement à mon **papa** et **Coco**. Je crois qu'*elle* est tellement fière de nous en voyant ce lien incassable que nous avons. Papa tu n'as jamais douté de mon frère et de moi une seule seconde et *elle* ne te remerciera jamais assez pour ça. Tu m'as accompagné en tant que femme jusqu'ici et aussi dans cette épreuve qui est la thèse. Merci pour ton énième soutien et pour ta confiance. Merci papa pour tes relectures de ce manuscrit (c'était une langue qui venait d'une autre planète, non ?).

**Sébastien**, je sais que cette thèse a représenté une concession pour toi, et je suis reconnaissante que tu m'ais encouragé à me lancer cette aventure. Tu t'es investi comme personne ne l'aurait fait dans cette thèse. Tu as été mon pilier le plus solide du début à la fin. Tu es celui qui a partagé mon quotidien, toutes mes joies et mes nombreuses peurs. Tu es celui qui a épongé toutes mes émotions sans jamais me juger, celui qui donne à la vie une note incroyablement palpitante, celui qui me fait rire aux éclats tous les jours ~~même~~ surtout avec des blagues nulles, celui avec qui je refais le monde pour essayer de le rendre meilleur. Tu es celui qui écoute et aussi celui qui entend. Et tu es aussi celui qui m'a beaucoup aidé pour finir ce manuscrit. Tu me rends profondément heureuse et je crois ne pas m'être trompée en disant OUI !

Ce qui suit est superflu mais ça a son importance pour moi. Merci à mon **vélo** d'avoir accepté de m'emmener faire des tours pendant la rédaction (450 km en quelques semaines mais oui, oui je travaillais). Grâce à toi, j'ai pu m'aérer la tête à de nombreuses reprises. Promis, on va repartir à l'aventure prochainement pour découvrir le monde. Merci aux animaux, **Princesse Sushi**, les ronrons de **Chachatte** et **Gaston** et les chants de **Coqlicot** et ses poulettes (**Vador, Ali, Corbeille, Crêpe, Salade**) qui étaient des plus apaisants pendant la rédaction. Merci à la musique Métal, rien de plus motivant qu'un bon Parkway Drive, Architect ou Slipknot pour se motiver ! (PS : Mais ça ne vaudra jamais **Man's Land**).



# Sommaire

<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>17</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>25</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>27</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>29</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>33</b>
<b>CHAPITRE 1.</b>	
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>37</b>
<b>1. L'émergence des maladies, la colonisation des plantes et les interactions plantes-bactéries</b>	<b>39</b>
<b>1.1. Emergence d'une maladie, épidémiologie et étiologie .....</b>	<b>39</b>
1.1.1. Définitions .....	39
1.1.2. L'émergence d'une maladie .....	41
a) Le saut d'hôte .....	41
b) L'acquisition de nouveaux traits .....	43
c) La colonisation d'une nouvelle aire géographique .....	43
1.1.3. Les mécanismes d'émergence .....	45
a) La mutation.....	45
b) La recombinaison homologue .....	47
c) L'acquisition de gènes par transfert horizontal .....	47
1.1.4. Les forces évolutives .....	49
1.1.5. Les réservoirs d'émergence d'agents phytopathogènes .....	51
<b>1.2. La colonisation des plantes par les bactéries phytopathogènes .....</b>	<b>51</b>
1.2.1. Définitions .....	51
1.2.2. Les étapes de la colonisation bactérienne et les mécanismes impliqués .....	53
a) Les sources d'inoculum des bactéries phytopathogènes et les moyens de dissémination .....	53
1.2.3. La colonisation épiphyte de la phyllosphère .....	57
1.2.4. Les mécanismes impliqués la colonisation épiphyte .....	59
1.2.5. La formation de biofilms bactériens .....	61
1.2.6. Le détachement du biofilm.....	63
1.2.7. La colonisation endophyte .....	63
1.2.8. La dispersion.....	67
<b>1.3. Les interactions entre les plantes les bactéries phytopathogènes .....</b>	<b>69</b>
1.3.1. Les mécanismes impliqués dans les interactions plantes-bactéries.....	69
a) Les types d'interactions plantes-bactéries.....	69
b) Les mécanismes de défense basale des plantes .....	69
c) Les mécanismes impliqués dans la réponse spécifique .....	71
1.3.2. L'arsenal bactérien pour contourner les défenses de la plante .....	73
a) Les effecteurs de type III (ET3).....	73
1.3.3. La course à l'armement .....	75
1.3.4. Les autres facteurs de virulence interférant avec les défenses de la plante .....	75
1.3.5. Influence des conditions biotiques et abiotiques sur les maladies causées par les bactéries .....	77
<b>2. La transmission des bactéries à la semence et par la semence .....</b>	<b>79</b>
<b>2.1. La formation et la structure d'une graine.....</b>	<b>79</b>
2.1.1. La reproduction sexuée chez les angiospermes .....	79
2.1.2. La formation des graines dans le fruit .....	81
2.1.3. Structure de la graine mature de Cucurbitacées.....	81
2.1.4. Sortie de la dormance et germination de la graine .....	83
<b>2.2. Les voies de transmission des bactéries aux graines .....</b>	<b>85</b>
2.2.1. La voie florale .....	85
a) L'anthosphère.....	85
b) La transmission aux graines par la voie florale .....	87





2.2.2.	La voie par contact .....	89
a)	La carposphère .....	89
b)	La transmission aux graines par la voie par contact .....	91
2.2.3.	La voie vasculaire .....	91
a)	La colonisation vasculaire .....	91
b)	La transmission par la voie vasculaire .....	93
2.2.4.	La localisation et la survie dans la graine .....	95
a)	La localisation .....	95
2.2.5.	La survie des bactéries dans les semences .....	97
<b>2.3.</b>	<b>La transmission des bactéries phytopathogènes par les semences .....</b>	<b>99</b>
2.3.1.	La spermosphère .....	99
2.3.2.	La colonisation de la plantule .....	101
<b>3.</b>	<b>Le contrôle des agents phytopathogènes transmis par les semences .....</b>	<b>103</b>
<b>3.1.</b>	<b>Les moyens de lutte contre les phytobactérioses transmises par les semences sur les cultures de porte-graine .....</b>	<b>103</b>
3.1.1.	La lutte chimique .....	103
3.1.2.	La résistance variétale .....	103
3.1.3.	Le bio-contrôle .....	105
3.1.4.	Les mesures prophylactiques .....	107
<b>3.2.</b>	<b>Tester l'état sanitaire des lots de semences .....</b>	<b>109</b>
3.2.1.	Objectifs et principes de la sélection sanitaire .....	109
3.2.2.	Les normes et les méthodes de détection standards .....	109
<b>3.3.</b>	<b>Les méthodes pour tester l'état sanitaire d'un lot de semences .....</b>	<b>113</b>
3.3.1.	Les analyses sur plantules à partir du semis d'un lot de graines .....	113
3.3.2.	Les analyses à partir d'un macérât de graines .....	113
a)	Obtention d'un macérât de graines .....	113
b)	Analyses du macérât et identification des clones suspects .....	115
3.3.3.	Les outils de détection et d'identification moléculaires .....	115
a)	Principe de base de la PCR .....	117
b)	Les PCR quantitatives ou en temps réel .....	119
c)	Le multiplexage des tests d'identification .....	119
d)	Les tests bio-PCR .....	121
e)	La détection en PCR des bactéries viables mais non cultivables (VNC) .....	121
f)	Les tests reposant sur une PCR isotherme .....	123
3.3.4.	La mise au point de nouveaux outils moléculaires .....	123
<b>3.4.</b>	<b>Les traitements pour décontaminer les semences .....</b>	<b>125</b>
3.4.1.	Les traitements physiques .....	125
3.4.2.	Les traitements chimiques .....	127
3.4.3.	Les traitements biologiques .....	129
<b>4.</b>	<b>Le complexe d'espèces <i>Pseudomonas syringae</i> .....</b>	<b>131</b>
<b>4.1.</b>	<b>Taxonomie .....</b>	<b>131</b>
4.1.1.	Définitions, concepts et notions .....	131
a)	La taxonomie .....	131
b)	Le concept de l'espèce bactérienne .....	131
c)	La notion de complexe d'espèces .....	133
d)	Les pathovars, une sous-division de l'espèce .....	135
4.1.2.	Les méthodes utilisées pour la taxonomie de <i>P. syringae</i> .....	137
a)	Les méthodes basées sur le phénotype bactérien .....	137
b)	Les méthodes basées sur le génome bactérien .....	137
4.1.3.	Historique de la taxonomie du complexe d'espèces <i>P. syringae</i> .....	141
a)	Classification actuelle .....	141
b)	Historique .....	143
<b>4.2.</b>	<b>Les schémas MLST et MLVA pour le typage bactérien .....</b>	<b>145</b>
4.2.1.	Le typage multi-locus sequence typing (MLST) .....	145
4.2.2.	Le typage Multi-Locus Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA) .....	147
<b>4.3.</b>	<b>Le phylogroupe 2 du complexe d'espèces <i>P. syringae</i> .....</b>	<b>147</b>
4.3.1.	Phylogénie .....	147
a)	Position dans le complexe d'espèces <i>P. syringae</i> .....	147



b)	Les clades du phylogroupe 2 .....	149
4.3.2.	Diversité des souches.....	149
a)	Ubiquité.....	149
b)	Les souches isolées de l'environnement non végétal.....	151
c)	Les souches pathogènes associées aux plantes .....	153
4.3.3.	Caractéristiques phénotypiques.....	155
4.3.4.	Caractéristiques génomiques .....	155
a)	Composition du génome .....	155
b)	Diversité et réarrangements génomiques .....	155
4.3.5.	Les facteurs impliqués dans la virulence de <i>P. syringae</i> .....	159
a)	Evolution vers une bactérie phytopathogène.....	159
b)	Les ET3.....	159
c)	Les toxines.....	161
d)	Le pouvoir glaçogène .....	163
<b>4.4.</b>	<b>Impacts des souches du complexe d'espèces <i>P. syringae</i> en agriculture .....</b>	<b>163</b>
<b>5.</b>	<b>La courgette .....</b>	<b>165</b>
<b>5.1.</b>	<b>Caractérisation génétique de la courgette .....</b>	<b>165</b>
5.1.1.	La taxonomie des Cucurbitacées et de <i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i> .....	165
5.1.2.	La famille des Cucurbitacées .....	165
5.1.3.	Le genre <i>Cucurbita</i> .....	167
5.1.4.	Origine et domestication de <i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i> .....	169
5.1.5.	La diversité inter et intra spécifique de la courgette .....	171
5.1.6.	Terminologie et étymologie.....	173
<b>5.2.</b>	<b>Caractérisation botanique, écologique et biochimique de la courgette.....</b>	<b>173</b>
5.2.1.	Caractéristiques botaniques .....	173
5.2.2.	Paramètres écologiques de la culture de la courgette .....	175
5.2.3.	Caractéristiques biochimiques de la courgette .....	177
<b>5.3.</b>	<b>Production de semences de courgette et données économiques .....</b>	<b>177</b>
5.3.1.	La production de semences hybrides de courgette .....	177
5.3.2.	Données économiques et utilisations de <i>Cucurbita pepo</i> dans le monde.....	179
a)	Données économiques.....	179
a)	Utilisations .....	179
<b>5.4.</b>	<b>Les principales maladies infectieuses de la courgette .....</b>	<b>181</b>
5.4.1.	Les champignons .....	181
5.4.2.	Les virus.....	183
5.4.3.	Les bactéries.....	185
	<b>OBJECTIFS ET AXES DE RECHERCHE .....</b>	<b>189</b>
	<b>CHAPITRE 2.</b>	
	<b>CARACTERISATION DES SOUCHES RESPONSABLES DE LA NERVATION BLANCHE DE LA COURGETTE</b>	
	<b>.....</b>	<b>191</b>
	<b>CHAPITRE 3.</b>	
	<b>DEVELOPPEMENT D'OUTILS POUR LA DETECTION ET L'IDENTIFICATION DES SOUCHES</b>	
	<b>RESPONSABLES DE LA NERVATION BLANCHE DE LA COURGETTE. ....</b>	<b>235</b>
	<b>CHAPITRE 4.</b>	
	<b>VOIES ET EFFICACITE DE LA TRANSMISSION PAR LES SEMENCES DES <i>P. SYRINGAE</i> DU PHYLOGROUPE</b>	
	<b>2 RESPONSABLES DE LA NERVATION BLANCHE DE LA COURGETTE. ....</b>	<b>283</b>
	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>347</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>367</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>407</b>



# Liste des figures

## Figures du Chapitre 1

<b>Figure 1.1</b>	Représentation schématique des trois types d'émergence bactérienne	40
<b>Figure 1.2</b>	Organisation génétique des loci de résistances aux métaux chez <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	42
<b>Figure 1.3</b>	Distribution d' <i>A. citrulli</i> responsable de la tache bactérienne de la pastèque dans le monde	42
<b>Figure 1.4</b>	Occurrence de <i>P. syringae</i> dans les précipitations selon l'origine des masses d'air	44
<b>Figure 1.5</b>	Schématisation des mécanismes moléculaires conduisant à l'acquisition d'ADN exogène	46
<b>Figure 1.6</b>	Les formes de sélection au sein d'une population	48
<b>Figure 1.7</b>	Vue d'ensemble des types d'interactions entre les micro-organismes et les plantes	50
<b>Figure 1.8</b>	Transmission verticale et horizontale du microbiote de la plante	52
<b>Figure 1.9</b>	Survie de <i>X. cucurbitae</i> dans des débris des fruits et feuilles de citrouille enterrés dans le sol	54
<b>Figure 1.10</b>	Principe d'un pont vert entre deux espèces de plantes	54
<b>Figure 1.11</b>	Colonies bactériennes à la surface de <i>Brickellia veronicifolia</i>	56
<b>Figure 1.12</b>	Modèle conceptuel du développement bactérien à la surface d'une feuille	58
<b>Figure 1.13</b>	Les mécanismes « swimming » et « twitching »	60
<b>Figure 1.14</b>	La formation de biofilm s'effectue en plusieurs étapes	60
<b>Figure 1.15</b>	Distribution spatiale des biofilms mixtes	62
<b>Figure 1.16</b>	Modèle de la colonisation des bactéries.	62
<b>Figure 1.17</b>	Colonisation de la surface des pores de l'hydathode de choufleur par <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	64
<b>Figure 1.18</b>	Phénomène de ooze photographié sur un kiwi infesté par <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	66
<b>Figure 1.19</b>	Modèle hypothétique selon lequel le cycle de <i>P. syringae</i> et sa dissémination seraient liés au cycle de l'eau	66
<b>Figure 1.20</b>	Les types d'interaction hôte-agent phytopathogène PTI	68
<b>Figure 1.21</b>	L'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI) versus l'immunité innée (PTI)	70
<b>Figure 1.22</b>	Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) des bactéries phytopathogènes	70
<b>Figure 1.23</b>	Schématisation de l'îlot de pathogénie canonique tri-parties (T-PAI) de <i>P. amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i>	72
<b>Figure 1.24</b>	Schématisation du modèle « en zig-zag » proposé par Jones et Dangl, 2006	74
<b>Figure 1.25</b>	Diagramme illustrant les interactions triangulaires plante-pathogène-environnement	76



<b>Figure 2.1</b>	Schéma illustrant les pièces florales par une coupe longitudinale chez la courge	78
<b>Figure 2.2</b>	Schéma illustrant les compartiments de l'ovule et du carpelle au cours de la pollinisation	78
<b>Figure 2.3</b>	Coupe transversale d'une pépionide de <i>Cucurbita pepo</i>	80
<b>Figure 2.4</b>	Diversité des graines de Cucurbitacées en termes de taille, couleur et forme.	80
<b>Figure 2.5</b>	Coupe histologique du testa d'une graine de courgette observées au microscope électronique à balayage	80
<b>Figure 2.6</b>	Schématisation d'une graine de melon présentant les différents types de tissus et la localisation du micropyle	82
<b>Figure 2.7</b>	Etapas de la germination épigée	82
<b>Figure 2.8</b>	Voies de transmission empruntées par les bactéries phytopathogènes pour contaminer les graines	84
<b>Figure 2.9</b>	Colonisation bactérienne de différents grains de pollen au microscope électronique à balayage	86
<b>Figure 2.10</b>	Transmission de <i>Paraburkholderia phytofirmans</i> (agent de bio-contrôle) par la voie florale aux graines de maïs	86
<b>Figure 2.11</b>	Adhésion de bactéries à la surface d'un fruit de concombre	88
<b>Figure 2.12</b>	La tache bactérienne causée par <i>A. citrulli</i> sur fruits de pastèque.	90
<b>Figure 2.13</b>	Colonisation vasculaire de <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> marqué avec une protéine fluorescente verte	90
<b>Figure 2.14</b>	Structure des vaisseaux du xylème.	92
<b>Figure 2.15</b>	Colonisation des graines immatures par <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i>	92
<b>Figure 2.16</b>	Immunolocalisation de cellules <i>A. citrulli</i> dans des sections de graines de inoculées	94
<b>Figure 2.17</b>	Colonisation de semences de maïs inoculées par une communauté synthétique de 12 isolats et désinfectées	98
<b>Figure 2.18</b>	Tailles de population de <i>X. citri</i> pv. <i>fuscans</i> (CFBP 4834-R) dans 21 graines inoculées	100
<b>Figure 3.1</b>	Organisation génétique du transposon de type Tn7	102
<b>Figure 3.2</b>	Estimation de la sévérité de la maladie de la tache foliaire sur betterave après inoculation de <i>B. amyloliquefaciens</i>	104
<b>Figure 3.3</b>	Plages de lyses du phage $\phi 6$ sur <i>P. syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	104
<b>Figure 3.4</b>	Exemple d'un workflow établi par l'ISTA pour la détection de <i>P. amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i> dans des semences	114
<b>Figure 3.5</b>	Schéma du principe de la PCR nichée	116
<b>Figure 3.6</b>	Comparaison de la PCR TaqMan et SYBR Green	118
<b>Figure 3.7</b>	Principe de la PCR isotherme LAMP	122





<b>Figure 4.1</b>	Arbre phylogénétique construit sur quatre gènes de ménage concaténés des lignées de <i>P. fluorescens</i>	140
<b>Figure 4.2</b>	Dendrogramme représentant le complexe d'espèces <i>P. syringae</i>	142
<b>Figure 4.3</b>	Espèces génomiques, phylogroupes et pathovars décrit dans le complexe d'espèces <i>P. syringae</i>	144
<b>Figure 4.4</b>	Arbre phylogénétique construit sur quatre gènes de ménage illustrant les 13 phylogroupes	146
<b>Figure 4.5</b>	Visualisation des évènements de recombinaison chez des souches associées aux Cucurbitacées	148
<b>Figure 4.6</b>	Reactions du melon 7jours après inoculation de souches de <i>P. syringae</i> au SST3 canonique ou atypique	150
<b>Figure 4.7</b>	Symptômes causés par <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> sur melon et betterave	152
<b>Figure 4.8</b>	Image au microscope électronique à transmission d'une cellule de la bactérie <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	154
<b>Figure 4.9</b>	Alignements MAUVE des éléments intégratifs et conjugatifs (ICE) de <i>P. syringae</i>	156
<b>Figure 4.10</b>	La phylogénie de <i>P. syringae</i> et les caractéristiques communes des phylogroupes.	158
<b>Figure 4.11</b>	Cas d'épidémies (%) sur les plantes annuelles dues au complexe d'espèces <i>Pseudomonas syringae</i>	162
<b>Figure 5.1</b>	Relations phylogénétiques des cucurbitacées estimées par Astral à l'aide de six ensembles de gènes.	164
<b>Figure 5.2</b>	Les quatre types morphologiques cultivés décrits dans <i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	166
<b>Figure 5.3</b>	Relations génétiques entre des taxons sauvages et cultivés du genre <i>Cucurbita</i>	168
<b>Figure 5.4</b>	Diagrammes de Venn illustrant l'analyse du polymorphisme nucléotidique (SNP) pour huit accessions de <i>C. pepo</i>	172
<b>Figure 5.5</b>	Viabilité du pollen (A) et réceptivité du pistil (B)	174
<b>Figure 5.6</b>	Optimum écologique de la courgette ( <i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> )	174
<b>Figure 5.7</b>	Evolution de la production mondiale de courge entre 1994 et 2019.	178
<b>Figure 5.8</b>	Répartition de la production de courge dans le monde	178
<b>Figure 5.9</b>	Symtômes sur citrouille ( <i>Cucurbita pepo</i> ) causés par divers champignons pathogènes	180
<b>Figure 5.10</b>	Symptômes sur feuilles de courgette ( <i>Cucurbita pepo</i> ) causés par différents virus	182
<b>Figure 5.11</b>	Symptômes causés par <i>Xanthomonas cucurbitae</i> sur <i>Cucurbita pepo</i>	184
<b>Figure 5.12</b>	Symptômes de flétrissement des feuilles (A) et de « oozing » des vaisseaux du xylème	184
<b>Figure 5.13</b>	Pourriture molle causée par <i>Pectobacterium brasiliensis</i> sur courgette	184
<b>Figure 5.14</b>	Symptômes causés par <i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i> sur <i>Cucurbita pepo</i>	186
<b>Figure 5.15</b>	Nécroses des feuilles causées par <i>P. syringae</i> sur jeune plante de <i>Cucurbita pepo</i>	186



## Figures du Chapitre 2

<b>Figure 1</b>	Phylogenetic relationships of VCZ strains	203
<b>Figure 2</b>	Responses of two cultivars of zucchini to seed inoculation and cotyledon rubbing	205
<b>Figure 3</b>	Host range of VCZ strains	207
<b>Figure 4</b>	HR of diverse cucurbit after infiltration of VCZ strains	209
<b>Figure 5</b>	Relationships of sequences of phylogroup 2 of <i>P. syringae</i> species complex using ANIb	211
<b>Figure 6</b>	Phylogeny of VCZ strains, host range and T3E encoding genes	213
<b>Figure 7</b>	Set of T3E of VCZ strains	215

## Figures du Chapitre 3

<b>Figure 1</b>	Phylogenetic relationships of strains isolated from seed lots between 2002 and 2014	248
<b>Figure 2</b>	Phylogenetic groups chosen for PCR design	250

## Figures du Chapitre 4

<b>Figure 1</b>	Arbre de recouvrement minimal (MST)	302
<b>Figure 2</b>	Distribution des tailles de populations (log ufc/échantillon) détectées dans les échantillons prospection	308
<b>Figure 3</b>	Arbre en maximum de vraisemblance (ML)	310
<b>Figure 4</b>	État sanitaire des lots de semences après inoculation des souches P99 R ou P66 R	312
<b>Figure 5</b>	Transmission des bactéries des graines aux plantules.	314

## Figures de la discussion générale

<b>Figure 1</b>	Les espèces et pathovars de la Genomospecies 1 du complexe d'espèces <i>P. syringae</i>	352
-----------------	---	-----



# Liste des Tableaux

## Tableaux du Chapitre 1

<b>Tableau 4.1</b>	Terminologie utilisée pour les désignations infrasubspécifiques	134
<b>Tableau 4.2</b>	ANIb sur la base d'analyses de génomes issues de souches associées aux Cucurbitacées	148
<b>Tableau 4.3</b>	Cibles des ET3 produits par le SST3 des souches du complexe d'espèces <i>P. syringae</i>	160
<b>Tableau 5.1</b>	Espèces et sous-espèces du genre <i>Cucurbita</i>	166
<b>Tableau 5.2</b>	Dissimilarités moyennes calculées sur la base de marqueurs HFO-TAG chez des Cucurbitacées	170
<b>Tableau 5.3</b>	Dissimilarités moyennes calculées sur la base de marqueurs HFO-TAG chez <i>C. pepo</i>	170
<b>Tableau 5.4</b>	Caractéristiques générales sur les fleurs mâles et femelles des courgettes	172
<b>Tableau 5.5</b>	Composition biochimique de trois espèces de <i>Cucurbita</i>	176
<b>Tableau 5.6</b>	Composition en acides gras des graines de trois espèces de <i>Cucurbita</i>	176

## Tableaux du Chapitre 2

<b>Tableau 1</b>	The 58 vein clearing of zucchini strains used in this study	199
------------------	---	-----

## Tableaux du Chapitre 3

<b>Tableau 1</b>	Phylogenetic position of bacterial strains used in this study and results of detection assays	240
<b>Tableau 2</b>	Genome sequences used in this study	244
<b>Tableau 3</b>	Pathogenicity of stains belonging to clades 2b and 2d on zucchini plantlets following seed inoculation. The results correspond to the cumulated data from two independent tests, each on five plants	252
<b>Tableau 4</b>	Primers and probes designed to detect and identify strains belonging to the species complex <i>P. syringae</i> , isolated from zucchini seeds	252
<b>Tableau 5</b>	In silico and in vitro specificity of primers and probes	254
<b>Tableau 6</b>	Efficiencies of simplex and multiplex qPCR tests on calibrated DNA extracts	256
<b>Tableau 7</b>	Sensitivity of the multiplex qPCR tests on seed extract spiked with calibrated bacterial suspensions	258
<b>Tableau 8</b>	Results of the analysis of naturally contaminated seed lots with the Multiplex qPCR test	258



## Tableaux du Chapitre 4

<b>Tableau 1</b>	Collection de souches typées en MLST	290
<b>Tableau 2</b>	Séquences génomiques utilisées pour l'analyse phylogénétique sur les gènes Psyr3208, Psyr3420 et Psyr4880	298
<b>Tableau 3</b>	Identification des souches contaminant les lots de semences produits dans différents pays entre 2018 et 2020 et déclarés positifs par le test bio-qPCR ciblant sylC	304
<b>Tableau 4</b>	Données représentant l'état sanitaire des lots parentaux de semences et des lots de graines produits en 2018 et 2019 dans les parcelles faisant l'objet d'un suivi épidémiologique	306

## Liste des annexes

<b>Annexe I</b>	Données supplémentaires sur les symptômes induits par P135 (calde 2d), P108 (Clade 2b)	409
<b>Annexe II</b>	Répertoire de d'ET3 pour 120 génomes	420
<b>Annexe III</b>	Repertoires de toxines pour 53 génomes	422





## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	(Amplified fragment-length polymorphism) Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
ANI	(Average nucleotide identity) Identité nucléotidique moyenne
A-PAI	(Atypical Single pathogenicity island) Ilôt de pathogénie atypique en une partie
ARN	Acide ribonucléique
BLAST	(basic local alignment search tool)
CEL	(Conserve effector locus) Locus effecteur conservé
DDH	(DNA-DNA Hybridation) Hybridation ADN-ADN
EEL	(Exchangeable effector locus) Locus effecteur interchangeable
EF-Tu	(elongation factor thermo unstable) Facteur d'élongation Tu
EMA	Monoazide d'éthidium
EPS	Exopolysaccharides
ET3	Effecteur de type III
ETI	(Effector triggered immunity) Immunité déclenchée par l'effecteur
ETS	(Effector-triggered susceptibility) Sensibilité déclenchée par l'effecteur
GGDC	(Genome to genome distance calculator) Calculateur de distance génome à génome
HFO-TAG	(High frequency oligonucleotides: targeting active gene) Oligonucléotides à haute fréquence ciblant des gènes actifs
HR	(Hypersensitive response) Réponse hypersensible
ICE	(Integrative conjugative elements) Élément conjugatif intégratif
INA	(Ice nucleation activity) Activité de nucléation de la glace
LIN	(Life Identification Number) numéros d'identification de la vie
MLSA	(MultiLocus Sequence Anlysis) Analyse de séquences multilocus
MLST	(MultiLocus Sequence Typing) Typage de séquences multilocus
MLVA	(Multiple Loci VNTR Analysis) Analyse de plusieurs locus VNTR
MMR	(Methyl Mismatch Repair) Réparations des mésappariements dirigés par le méthyle
NBS-LRR	(nucleotide-binding site-leucine-rich repeat) Site de liaison nucléotidiques et de répétitions riches en leucine
ORF	(Opening reading frame) Cadre de lecture ouvert
ORNQ	Organisme règlementé non de quarantaine
ORQ	Organisme règlementé de quarantaine
PAMP	(Pathogen-associated molecular pattern) Motif moléculaire associé aux pathogènes
PCR	(Polymerase Chain reaction) Réaction de polymérase en chaine
PGPR	(Plant Growth Promoting Rhizobacteria) Rhizobactérie favorisant la croissance des plantes
PMA	Propidium monoazide
PRR	(Pattern-recognition receptors) Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PTI	(PAMP-triggered immunity) Immunité déclenchée par les PAMP
RAPD	(Random amplified polymorphic dna) marqueurs d'amplification aléatoire d'ADN polymorphes



ROS	(Reactive oxygen species) Dérivé réactif de l'oxygène
SNP	(Single nucleotide polymorphism) Polymorphisme d'un seul nucléotide
SSR	(Simple sequence repeats) Marqueurs microsatellites
SST3	Système de sécrétion de type III
ST	(Sequence Type) Type de séquence
T-PAI	(Tripartite pathogenicity islands) Ilôt de pathogénie triparties
VNC	Viable mais non cultivable
VNTR	(Variable number tandem repeat) Répétition en tandem à nombre variable



## Introduction générale

La semence est le premier intrant à l'origine de la majorité de la production agricole et a par conséquent un rôle majeur dans l'économie liée à ce secteur. Elle est aussi un vecteur primaire de micro-organismes phytopathogènes qui sont portés à sa surface ou dans des localisations plus internes. Les agents phytopathogènes contaminant les semences et transmis aux plantules peuvent causer des maladies sur les plantes lorsque les conditions sont favorables à leur multiplication et à l'expression des symptômes. Les graines contaminées assurent ainsi une dispersion à grande échelle, rapide et non-contrôlée des agents phytopathogènes sur un territoire, ce qui peut conduire à des épidémies sur les plantes cultivées. Les moyens de lutte contre les bactérioses des plantes sont restreints puisque la lutte chimique est limitée à quelques composés cupriques et n'est pas durablement efficace. Les épidémies ont alors des conséquences directes sur les rendements agricoles et engendrent de lourdes pertes économiques. Elles peuvent également avoir de lourdes conséquences sociales ou patrimoniales.

La semence commerciale représente un organe de dissémination des agents phytopathogènes particulièrement importante car elle permet de les transporter sur de grandes distances géographiques. Dans certains cas, elle est à l'origine du développement de maladies émergentes dans de nouvelles zones de production. La qualité sanitaire des semences représente un enjeu particulièrement important afin d'éviter le développement d'épidémies en production. Les contrôles sanitaires effectués sur les semences permettent de vérifier que celles-ci ne sont pas contaminées par certains agents phytopathogènes responsables de maladies aux champs. Selon le risque associé à l'agent phytopathogène et à la culture, les semences peuvent être soit détruites, soit déclassées vers des zones de moindre risque épidémique ou encore décontaminées par différentes méthodes avant d'être recontrôlées et potentiellement commercialisées. Cette veille sanitaire nécessite de détecter efficacement et d'identifier précisément les agents phytopathogènes. En amont des contrôles sanitaires effectués sur les semences, l'étude de la biologie des agents phytopathogènes est nécessaire pour comprendre comment ils se transmettent aux semences. Ces connaissances biologiques et épidémiologiques sont importantes car elles servent de base à la mise en place de mesures prophylactiques adéquates pour limiter la transmission des agents phytopathogènes aux semences et les maladies qui en résultent.

La nervation blanche de la courgette est une maladie émergente transmise par la semence et qui touche les plantules. Cette maladie se développe dans des conditions fraîches et humides de culture et son incidence est particulièrement élevée dans le cas d'un semis précoce sous abri. Les plantules atteintes présentent des nécroses des cotylédons et des jeunes feuilles, un éclaircissement des nervures foliaires, des déformations et des retards de croissance pouvant aller jusqu'au blocage complet du développement. Jusqu'à ce jour aucun symptôme n'a été rapporté sur plantes adultes. Des bactéries appartenant au complexe d'espèces *P. syringae*, morphologiquement diverses sur milieux de culture, sont à l'origine de cette maladie. A ce jour, il n'existe pas de moyen de lutte curatif efficace et durable pour traiter les plantules malades. De plus, toutes les variétés de courgette sont sensibles à cette maladie.



L'une des difficultés du cycle épidémiologique de la nervation blanche de la courgette est que la plante-mère portant des semences contaminées est asymptomatique. De plus, les semences produites contaminées sont également asymptomatiques et donc non détectables visuellement. Des lots de semences produits dans différentes régions géographiques (Europe, Asie, Amériques et Afrique) peuvent être contaminés par les bactéries et transmettre la nervation blanche de la courgette. Peu/pas de connaissances sur les bactéries responsables de cette maladie sont disponibles dans la littérature scientifique. Or, une meilleure connaissance de l'épidémiologie de cette maladie, des agents responsables et de leur biologie, en particulier des mécanismes de transmission des bactéries aux semences permettrait probablement de développer de nouvelles stratégies de lutte. A la suite de cette introduction, la synthèse bibliographique vise à dresser l'état de l'art des connaissances actuelles sur (i) les maladies émergentes, la colonisation bactérienne des plantes et les interactions plantes-bactéries, (ii) la transmission des bactéries à la semence et par la semence, (iii) le contrôle des agents phytopathogènes transmis par la semence, (iv) le complexe d'espèces *P. syringae* et (v) la plante hôte qui est la courgette. La présentation des questions de recherche et des objectifs de mon travail de thèse terminera cette première partie.





# CHAPITRE 1.

## Synthèse bibliographique



# 1. L'émergence des maladies, la colonisation des plantes et les interactions plantes-bactéries

## 1.1. Emergence d'une maladie, épidémiologie et étiologie

### 1.1.1. Définitions

Une maladie émergente correspond à l'apparition nouvelle d'une maladie dans une population ou d'une maladie déjà connue dont l'incidence (nombre de cas sur une période donnée) ou la portée géographique augmente rapidement (Johnson 2014). La perturbation des écosystèmes, à travers des processus naturels ou non, est l'un des principaux facteurs de l'émergence ou de la ré-émergence des maladies infectieuses (Morens et al. 2004; Short et al. 2017). Ainsi, le changement climatique entraînant la fonte des glaces en antarctique nord pourrait conduire à la réémergence de *Bacillus anthracis* stockée sous forme de spores viables dans des animaux enterrés dans la glace à la suite d'épidémies d'anthrax dans les années 1890 (El-Sayed and Kamel 2020; Walsh et al. 2018). La réémergence de l'anthrax et d'autres zoonoses conservées dans le permafrost et libérées par la fonte des glaces a déjà un impact considérable sur la santé du bétail, des animaux sauvages et des humains en Russie (Revich et al. 2012). Pour les plantes cultivées, le changement des pratiques culturales peut également conduire à la réémergence de bactérioses. Sur pastèque, la réduction de la fumigation des sols au bromure de méthyl, le passage aux cultivars triploïdes, la diminution des cycles de rotations dans les parcelles ont conduit à la réémergence de formes virulentes du champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Everts and Himmelstein 2015). L'émergence et la diversification d'*Erwinia tracheiphila* sur cucurbitacées en Amérique du Nord est liée à l'intensification des cultures de courges et à l'introduction de variétés sensibles de concombre (Shapiro et al. 2016).

Depuis 1978, plus de 102 définitions du mot « épidémiologie » ont été proposées dans la littérature (Frérot et al. 2018). Appliquée à la santé des plantes, l'épidémiologie correspond à l'étude des facteurs qui affectent la propagation de la maladie dans le temps et dans l'espace (Forbes et al. 2009). Selon Last (2001) « C'est l'étude de la distribution et des déterminants des états ou des événements liés à la santé dans des populations spécifiques, et l'utilisation de cette connaissance pour le contrôle de la santé ». L'épidémiologie comprend aussi l'étude des causes des maladies (l'étiologie) et des facteurs influençant le développement des maladies et des méthodes de lutte (Frérot et al. 2018). Ainsi, une épidémie désigne une maladie dont l'incidence et la sévérité augmentent rapidement. Elle peut avoir pour origine la non-détection ou le non-contrôle de sa propagation. L'épidémio-surveillance permet d'anticiper, de surveiller et de suivre les épidémies par la mise en place de plans de collecte ou d'échantillonnages. Par exemple, pour suivre les épidémies du chancre du kiwi causé par *P. syringae* pv. *actinidiae*, des outils moléculaires de détection et d'identification basés sur la réaction de polymérase en chaîne (PCR) permettent la détection spécifique des bactéries responsables des chancres par rapport à celles responsables de taches foliaires dues à *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (Cunty et al. 2015b) à partir d'échantillons collectés dans les parcelles (Gallelli et al. 2014).

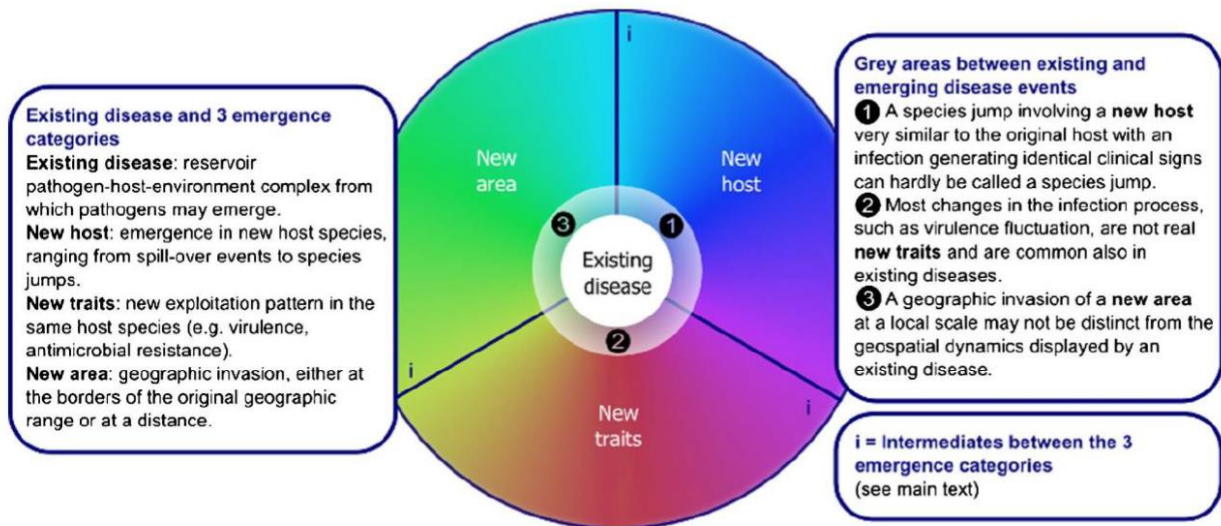


Figure 1.1 Représentation schématique des trois types d'émergence bactérienne (nouvel hôte, nouveaux traits et colonisation d'une nouvelle aire géographique). Le spectre arc-en-ciel reflète la gamme complète des scénarios d'émergences possibles comme l'émergence sur un nouvel hôte, avec acquisition de nouveaux traits ou colonisation d'une nouvelle zone. (d'après Engering et al. 2013).

### 1.1.2. L'émergence d'une maladie

Trois scénarios d'émergence ou de réémergence des maladies sont décrits : (i) l'adaptation à un nouvel hôte (ii) l'acquisition d'un nouveau trait conférant à l'agent phytopathogène la virulence ou une augmentation de l'agressivité (iii) la colonisation d'une nouvelle aire géographique (Figure 1.1) (Engering et al. 2013). Un agent phytopathogène peut utiliser un ou plusieurs de ces trois scénarios d'émergence. Ainsi, l'agent phytopathogène adapté à un nouvel hôte peut ensuite coloniser une nouvelle aire géographique. C'est par exemple le cas pour le pathovar *P. syringae* pv. *aesculi* qui cause le chancre suintant du marronnier en Europe. Ces bactéries ont été introduites en Europe à partir de leur aire d'origine probable en Inde et elles ont acquis de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la virulence et conduisant à des épidémies sévères sur marronniers européens (Green et al. 2010). La virulence est définie comme la capacité d'un micro-organisme à causer une maladie sur l'hôte (Batt 2016). Dans le cas présent, les souches Européennes ont acquis de nouveaux gènes parmi lesquels certains codant pour la synthèse d'acides gras dont les fonctions prédites impliquent la dégradation de la lignine et d'autres composés phénoliques (Green et al. 2010).

#### a) Le saut d'hôte

L'adaptation à un nouvel hôte appelé aussi « saut d'hôte » est défini par la capacité d'un agent phytopathogène à infecter un nouvel hôte qui jusqu'à présent n'était pas sensible ou connu comme tel. Pour que le saut d'hôte soit réussi, l'agent phytopathogène doit être exposé à au nouvel hôte, l'infecter, se multiplier et se transmettre à d'autres individus de la population hôte (Engering et al. 2013). Le saut d'hôte est généralement facilité par des facteurs environnementaux notamment par l'anthropisation. En effet, l'introduction de nouvelles espèces végétales dans une zone géographique par le commerce international des semences et de plants, l'intensification de l'agriculture, les pratiques culturales et les modifications des habitats favorisent le saut d'hôte. La bactérie *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, initialement pathogène de la canne à sucre, a fait très probablement un saut d'hôte sur les *Eucalyptus grandis* cultivés en Afrique du Sud dans la région de Mtunzini (Coutinho et al. 2015). Au Brésil, *Erwinia psidii* est phytopathogène du goyavier et responsable d'épidémies récentes sur des variétés hybrides d'*Eucalyptus* cultivées de façon intensive et récemment introduites dans le pays (Arriel et al. 2014; Coutinho et al. 2011). Les bactéries phytopathogènes ont tendance à infecter des plantes qui sont étroitement liées génétiquement et par conséquent, la distance phylogénétique entre deux taxons végétaux est un prédicteur important de saut d'hôte d'un agent phytopathogène (Gilbert et al. 2012). Dans l'exemple précédent, il s'avère que le goyavier et l'eucalyptus appartiennent tous les deux à la famille des *Myrtaceae*. Enfin, l'émergence réussie d'un agent phytopathogène sur une nouvelle espèce végétale peut conduire soit à l'expansion de sa gamme d'hôtes avec maintien des hôtes initiaux ou à la spécialisation sur le nouvel hôte (Bonneaud et al. 2019). Ainsi, certains clones de *Staphylococcus aureus* se sont spécialisés sur les bovins après un saut d'hôtes à partir de l'humain (Weinert et al. 2012; Matuszewska et al. 2020). Dans d'autres cas, le saut d'hôte conduit à une augmentation des gammes d'hôtes car l'agent phytopathogène conserve sa virulence sur son hôte d'origine. Par exemple, *E. psidii* a conservé sa virulence sur goyavier après un saut d'hôtes sur *Eucalyptus* (Arriel et al. 2014).

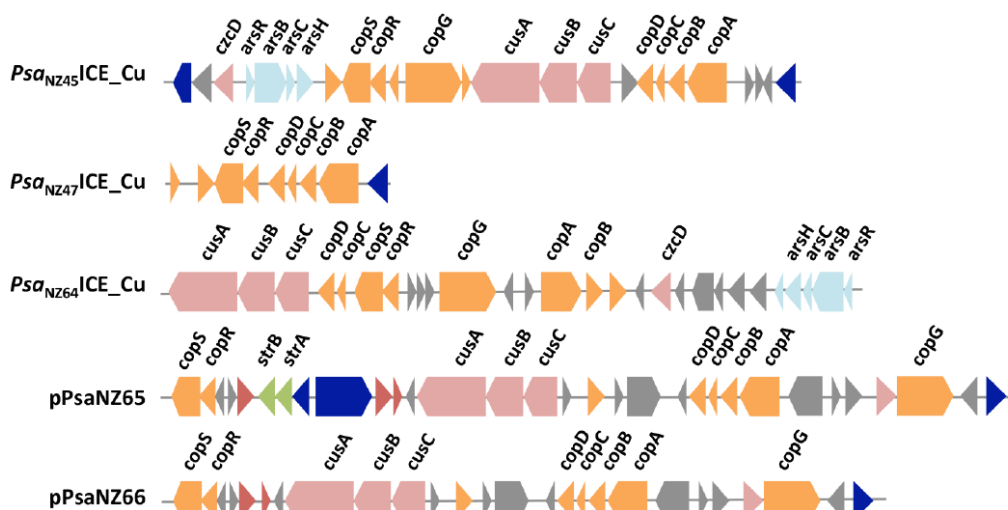


Figure 1.2. Organisation génétique des loci de résistances aux métaux chez cinq souches de *P. syringae* pv. *actinidiae* portés par des ICE ou des plasmides. Les boîtes bleues correspondent à des gènes mobiles (transposases ou recombinaisons), les boîtes orange représentent les gènes de résistance au cuivre, les boîtes cyan les gènes de résistance à l'arsenic, les boîtes roses appartiennent au système *czc/cus*, les boîtes vertes correspondent à des gènes de résistance à la streptomycine et les autres gènes sont représentés par des boîtes grises. (d'après Colombi et al. 2017)

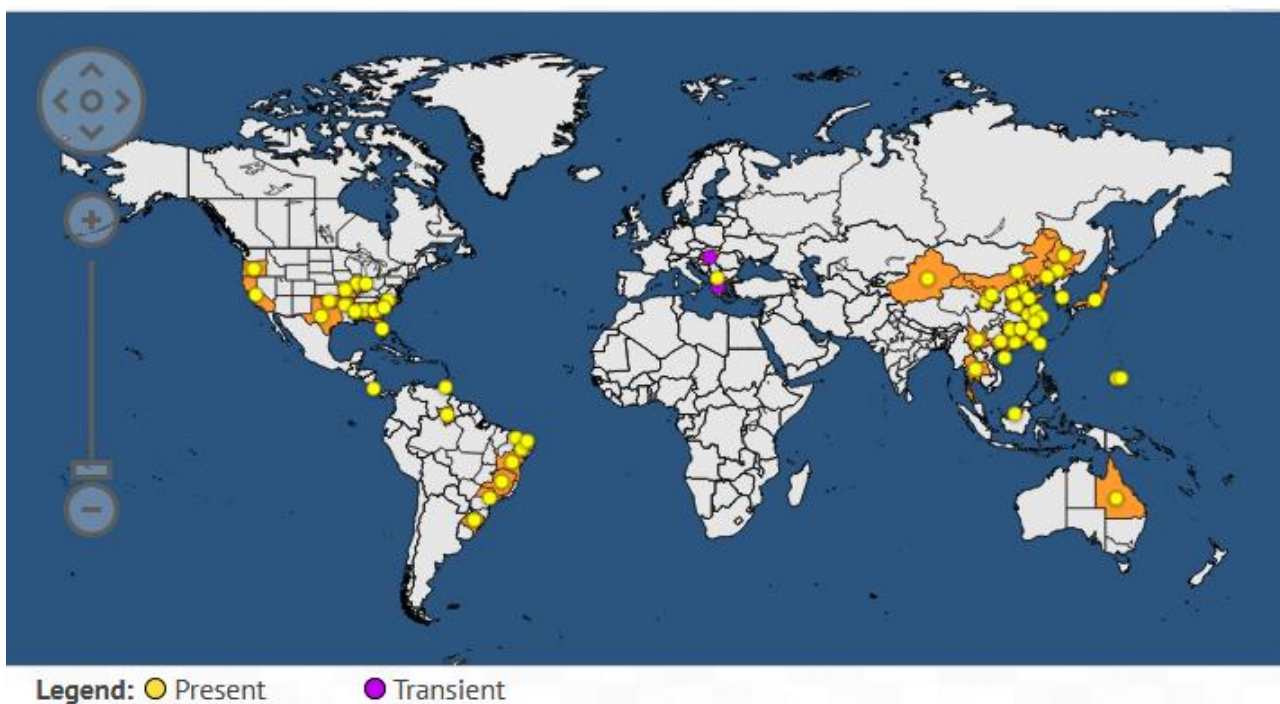


Figure 1.3. Distribution d'*A. citrulli* responsable de la tache bactérienne de la pastèque dans le monde. La semence contaminée est une source de dissémination majeure de cette bactérie.

<https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAC/distribution>

## b) L'acquisition de nouveaux traits

L'acquisition de nouveaux traits définit le potentiel d'un agent phytopathogène à augmenter sa virulence, c'est-à-dire à modifier sa gamme d'hôtes. L'augmentation de la virulence est possible suite à l'acquisition de nouveaux effecteurs permettant de contourner les défenses de la plante ou par l'acquisition d'une résistance à un composé chimique (cuivre, antibiotique) utilisé dans la lutte de l'agent phytopathogène (Engering et al. 2013). Les pratiques agricoles comme l'intensification de l'agriculture, l'utilisation de variétés génétiquement similaires, la simplification des écosystèmes et l'utilisation d'antibiotiques favorisent la sélection et l'émergence des agents phytopathogènes virulents. Par exemple, en Nouvelle-Zélande, les traitements répétés à base de cuivre des vergers de kiwis pour contrôler le chancre bactérien ont sélectionné des clones résistants de *P. syringae* pv. *actinidiae* porteurs d'éléments conjuguatifs de type ICE (integrative conjugative elements) ou de plasmides comprenant les clusters *czc/cusABC* et *copABCD* de résistance au cuivre, mais aussi des gènes codant pour la résistance à l'arsenic et au cadmium (Figure 1.2) (Colombi et al. 2017). Ces éléments conjuguatifs ont été acquis par transfert horizontal, sans doute à partir de souches appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* épiphytes des feuilles de kiwi (Colombi et al. 2017). Pour le riz, la révolution verte a conduit au remplacement des variétés de riz traditionnelles par des variétés à meilleur rendement et résistantes au flétrissement bactérien du riz causé par le pathovar *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). Ainsi, des variétés modernes de riz, résistantes à cet agent phytopathogène grâce au gène *xa4*, ont été déployées à grande échelle en Asie (Quibod et al. 2020). Par conséquent, des populations virulentes de *Xoo* contournant le gène *xa4* ont été sélectionnées par différents mécanismes génétiques de patho-adaptation. Ces travaux illustrent la façon dont les pratiques culturales peuvent façonner les populations d'agents phytopathogènes et alertent sur le risque potentiel de la sélection rapide de nouveaux variants très agressifs et adaptés aux variétés modernes.

## c) La colonisation d'une nouvelle aire géographique

L'introduction d'un agent phytopathogène dans une nouvelle aire géographique peut avoir différentes origines liées aux activités humaines ou non. L'échange de semences ou de plants à l'échelle mondiale a particulièrement conduit à la dissémination des agents phytopathogènes et à l'émergence de maladies au-delà de leurs aires d'origine. Ainsi, les premières épidémies de la tache bactérienne de la pastèque causées par *Acidovorax citrulli* ont été détectées dans les années 80 aux îles Mariannes puis l'agent phytopathogène a été introduit dans de nombreux états des Etats-Unis entre 1990 et 2000 par le biais de semences contaminées (Burdman and Walcott 2012). Aujourd'hui, la bactérie a été largement disséminée dans le monde suite à l'échange de matériel végétal contaminé (semences) et des épidémies sur Cucurbitacées ont été reportées en Amérique du Sud (Silva et al. 2016), en Asie (Islam et al. 2020), au Moyen Orient (Burdman et al. 2005) et en Australie (Martin and Horlock 2002) (Figure 1.3). D'autres bactéries phytopathogènes ont été disséminées dans de nouvelles aires géographiques comme *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Jacques et al. 2012), *Pseudomonas amygdali* pv. *glycinea* (Shepherd and Block 2017), *P. syringae* pv. *pisi* (Ali et al. 2015) par le biais de semences contaminées de tomate, soja et de pois. Outre l'échange des semences contaminées, le commerce de plantes contaminées permet également l'introduction d'agents phytopathogènes dans de nouvelles aires géographiques.



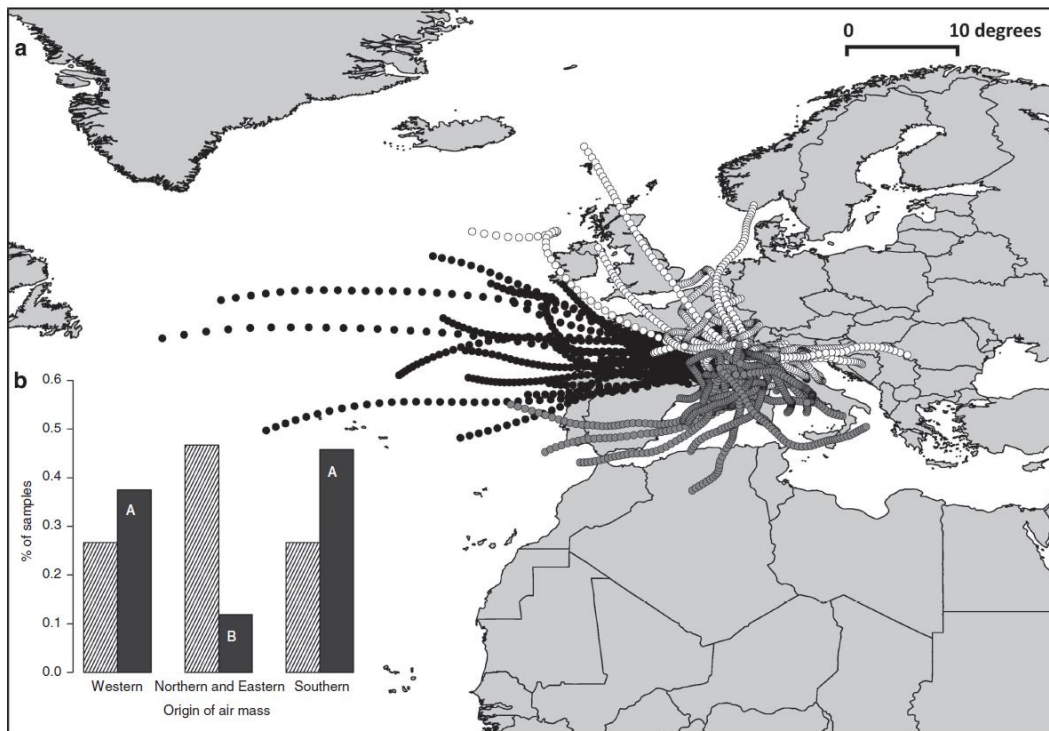


Figure 1.4. Occurrence de *P. syringae* dans les précipitations selon l'origine des masses d'air. (a) Trajectoires inverses des masses d'air (500 m au dessus du sol) sur 48h associées aux échantillons de l'étude issu de précipitations. Chaque cercle correspond à une donnée spatiale par heure. Les trois nuances de gris correspondent à un secteur géographique : sud, est et nord-est. (b) Fréquences des précipitations selon l'origine des masses d'air (barres hachurées) et fréquences des échantillons de précipitations portant *P. syringae* selon l'origine des masses d'air (barres grises). (d'après Monteil et al. 2014a)

Ainsi, la bactérie *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* a été introduite en Europe où elle a été détectée pour la 1<sup>ère</sup> fois en 2013 dans les Pouilles en Italie. Cette bactérie est la cause d'épidémies dévastatrices sur les oliviers en Italie du sud (Saponari et al. 2017). Grâce à des analyses de génomique comparative et à des connaissances des pratiques commerciales, il a été suggéré que cette bactérie aurait été introduite en Italie par l'import de caféiers infectés en provenance du Costa Rica (Cella et al. 2018; Giampetruzzi et al. 2017). Enfin, ce sont parfois des facteurs naturels qui entraînent la dissémination des agents phytopathogènes à plus ou moins grande échelle comme les masses d'air (Monteil et al. 2014a). Des bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* et le champignon *Botrytis cinerea* sont transportés par les masses d'air et peuvent voyager sur de très longues distances avant d'être déposées au sol par les précipitations (Figure 1.4). Ainsi, il a été estimé que des bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* peuvent voyager dans des masses d'air à 1000 m d'altitude sur des distances moyennes de 1500 km parcourues en 48 h avant d'être déposée par précipitations (Monteil et al. 2014a). Dans d'autres cas, les conditions météorologiques influencent le déplacement des agents phytopathogènes responsables d'épidémies à une échelle plus locale. Les vents violents blessent les végétaux et transportent des fragments de plantes contaminés par des agents phytopathogènes sur de nouvelles plantes éloignées de quelques kilomètres. Par exemple, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* qui cause le chancre asiatique des agrumes a été transporté sur plus de 50 km en Floride après le passage de nombreuses tempêtes en 2004 et a causé des épidémies dans de nouvelles zones géographiques (Irey et al. 2006).

### 1.1.3. Les mécanismes d'émergence

Les bactéries se reproduisent de façon clonale (scissiparité), ainsi une cellule mère donne deux cellules filles identiques (clones). Cependant, au cours de leur vie, les bactéries peuvent évoluer génétiquement par différents mécanismes moléculaires tels que la mutation, la recombinaison homologue et l'acquisition de gènes par transfert horizontal. Ces mécanismes induisent des modifications de l'information génétique dans la cellule et sont transmissibles à la descendance. Ces mécanismes sont, entre autres, impliqués dans l'émergence des agents phytopathogènes (Bartoli et al. 2016).

#### a) La mutation

La mutation est l'une des principales sources de modification de l'ADN sous-jacente à l'adaptation des bactéries à de nouveaux environnements (Bartoli et al. 2016). Plusieurs types de mutations existent et entraînent la modification de la séquence d'ADN : la substitution d'un nucléotide par un autre (single nucleotide polymorphism, SNP à l'origine d'allèles différents), la délétion d'un nucléotide et l'insertion d'un ou plusieurs nucléotides. Dans la plupart des cas, les mutations sont délétères et ne sont pas maintenues dans la population. Elles peuvent être neutres et sont alors dites synonymes, car elles n'induisent pas de modification de l'acide aminé ni de la protéine ou du peptide qui sera synthétisé (Loewe and Hill 2010). Par contre, les mutations non-synonymes modifient la nature de l'acide aminé qui sera traduit, donc la séquence du peptide ou de la protéine ce qui peut en affecter la structure tridimensionnelle et donc la fonction (Chu and Wei 2019). Les mutations apparaissent souvent à cause d'anomalies lors de la réplication de l'ADN. Ces anomalies peuvent être réparées post-réplication par le système

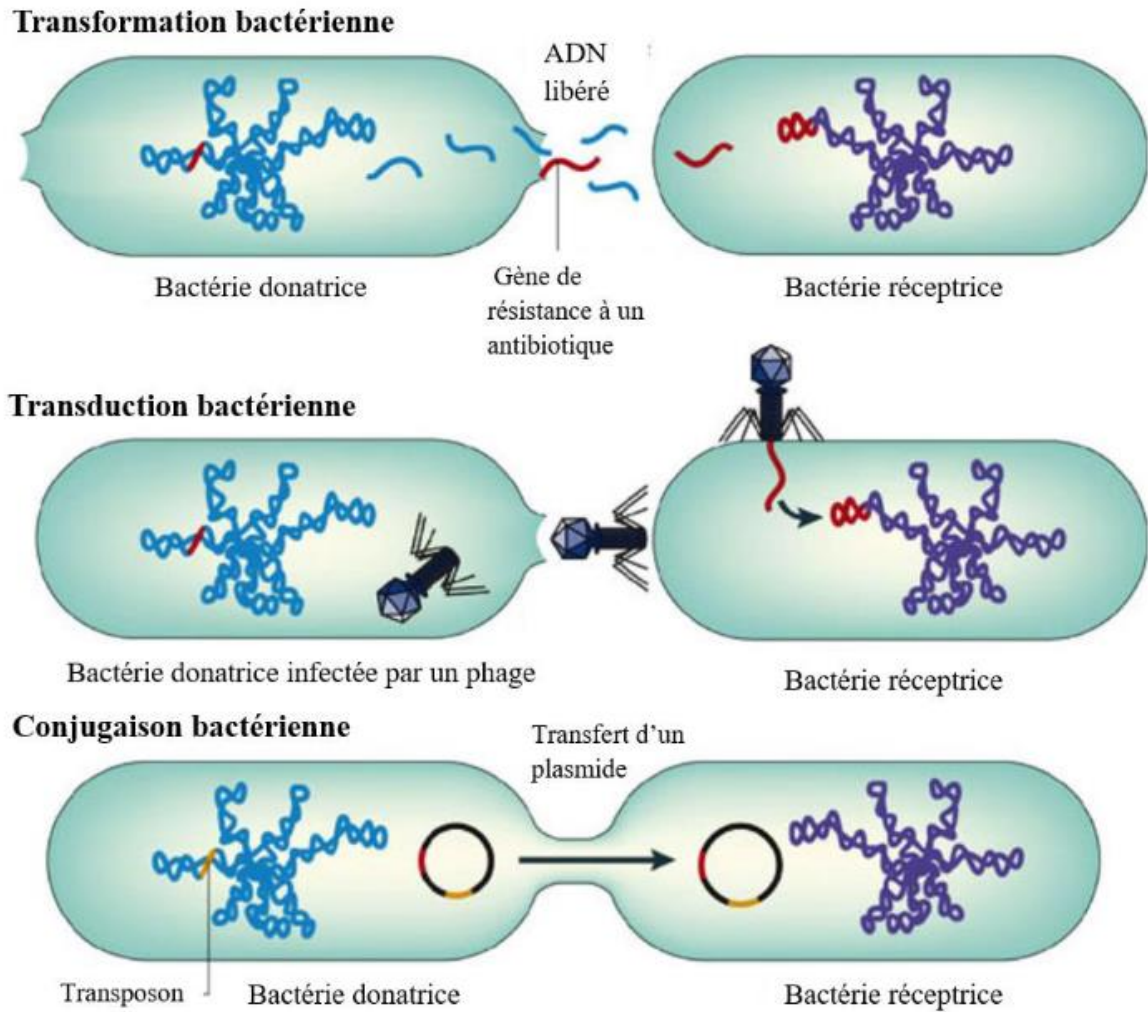


Figure 1.5. Schématisation des mécanismes moléculaires conduisant à l'acquisition d'ADN exogène. La transformation se produit lorsque l'ADN nu est libéré lors de la lyse d'un organisme et est absorbé par un autre organisme. Lors de la transduction, l'ADN exogène est transféré d'une bactérie à une autre au moyen de bactériophages et peuvent être intégrés dans le chromosome de la cellule receveuse (lysogénie). La conjugaison se produit par contact direct entre deux bactéries : les plasmides forment un pont d'accouplement à travers les bactéries et l'ADN est échangé. Les transposons sont des séquences d'ADN qui portent leurs propres enzymes de recombinaison qui permettent la transposition d'un endroit à un autre. (adapté d'après Furuya and Lowy 2006)

de réparation des mésappariements dirigés par le méthyle (MMR) mais lorsque ce système est défectueux, les mutations sont incorporées dans l'ADN de la cellule en réplication (Jun et al. 2006). Les mutations peuvent conférer directement un phénotype nouvellement phytopathogène ou renforcer l'agressivité du phénotype. Ces mutations sont le produit d'un processus évolutif appelé « mutation patho-adaptive » (Sokurenko et al. 1999). Des émergences d'agents phytopathogènes sont liées à la mutation. Par exemple, l'effecteur *avrBs2* chez *Xanthomonas vesicatoria* contient des mutations ponctuelles qui permettent d'éviter la reconnaissance spécifique par le gène *Bs2* du poivron (Wichmann et al. 2005).

### b) La recombinaison homologue

La recombinaison homologue permet le réagencement génomique (délétions, inversions et duplications) entre des séquences homologues et peuvent faire intervenir différents types d'éléments génétiques mobiles, tels que des transposons, des séquences d'insertions ou des prophages (Bartoli et al. 2016). La recombinaison homologue est à l'origine de nouveaux allèles et consiste à remplacer une séquence par un équivalent d'origine exogène ou endogène. L'intégration de la séquence d'ADN exogène peut s'effectuer par transformation (acquisition d'un ADN nu de l'environnement), transduction (transfert de matériel génétique à partir d'un phage) ou conjugaison (transfert d'ADN d'une bactérie vers une autre par l'intermédiaire de pili sexuels) (Figure 1.5). Chez les souches du complexe d'espèces *P. syringae*, le cluster de gènes codant le système de sécrétion de type III (SST3), impliqué dans la virulence, contient un locus effecteur interchangeable (EEL) qui porte de nombreux gènes d'effecteurs clés pour la pathogénie et la gamme d'hôtes ainsi que des éléments mobiles (Alfano et al. 2000). La présence de ces éléments mobiles suggère que l'EEL est une zone souvent soumise à des réarrangements génomiques qui, *in fine*, peuvent être à l'origine de l'émergence de souches phytopathogènes (Alfano et al. 2000). Sur Cucurbitacées, différentes lignées du complexe d'espèces *P. syringae* (lignées 2a et 2ba) partagent la même niche écologique et induisent des maladies sur pastèques, courges et melons (Newberry et al. 2019). Il a été prédit que les souches de la lignée 2ba contenaient environ 30 % de leur core-géome recombiné suite à 200 événements de recombinaison homologues récents. Plus de 98 % des séquences recombinées de la lignée 2ba avaient pour origine la lignée 2a (Newberry et al. 2019). Parfois, des événements de recombinaison ponctuels et localisés suffisent à la diversification et à la patho-adaptation des bactéries phytopathogènes. Par exemple, chez *X. oryzae* pv. *oryzae*, l'effecteur *avrXa7* est reconnu par le gène de résistance *Xa7* du riz. Par simple culture bactérienne *in vitro*, un nouveau variant de l'effecteur *avrXa7* issu de la recombinaison de *avrXa7* et *avrBs3* dans la région codante C-terminale a été obtenu spontanément (Yang et al. 2005). L'acquisition de ce nouvel effecteur recombiné engendre la virulence de la bactérie sur l'hôte (Yang et al. 2005).

### c) L'acquisition de gènes par transfert horizontal

Le transfert horizontal consiste en un mouvement de matériel génétique nouveau d'une cellule «donneuse» vers une cellule «receveuse», ce qui peut entraîner des différences génomiques modestes ou profondes entre des souches bactériennes étroitement apparentées (Polz et al. 2013). Le transfert horizontal est considéré comme un processus évolutif puissant car il peut changer la capacité des bactéries à coloniser de nouveaux habitats, de nouvelles niches écologiques et d'infecter de nouveaux hôtes (Bartoli et al. 2016). Les mécanismes d'acquisition

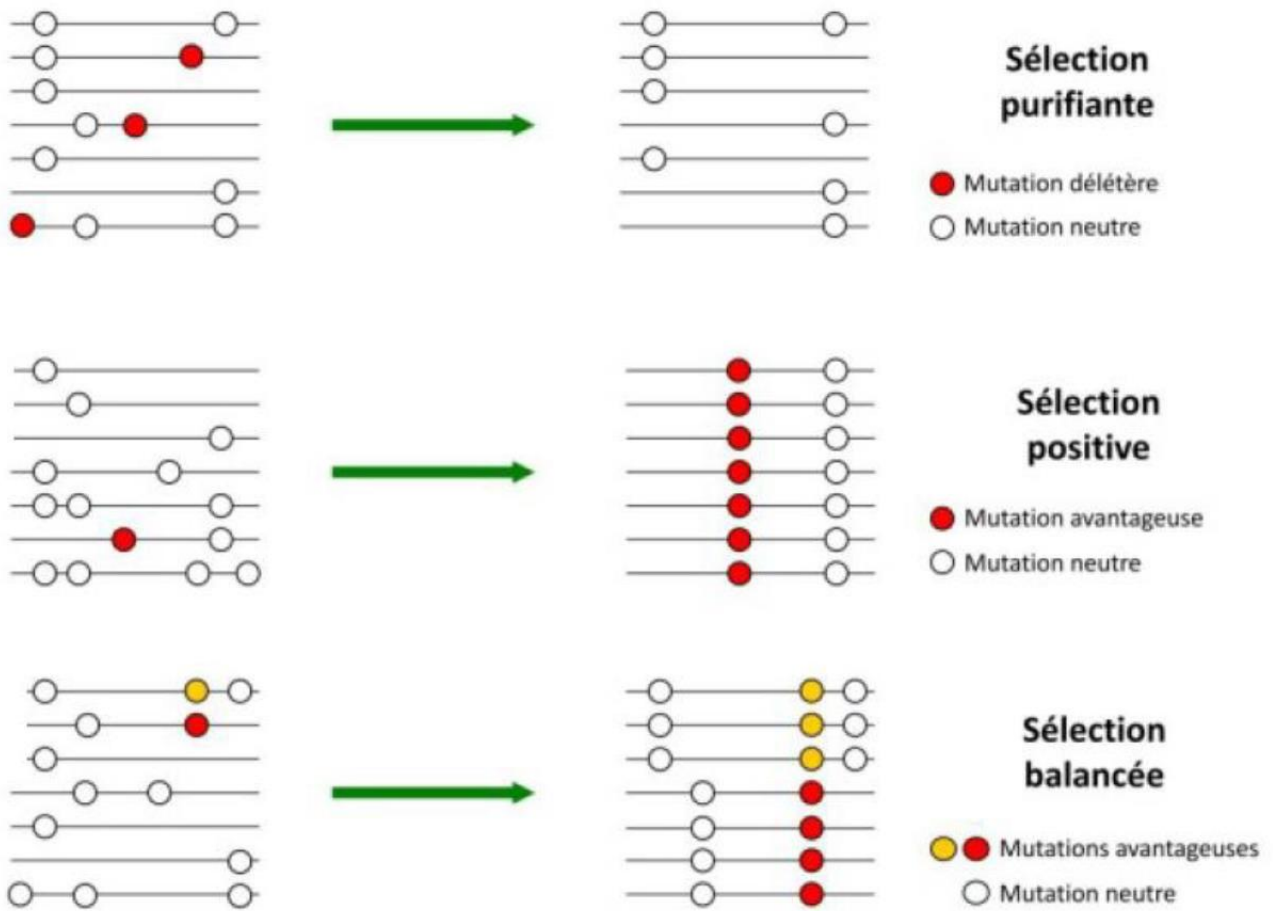


Figure 1.6. Les formes de sélection au sein d'une population. La sélection purifiante supprime les mutations délétères. La sélection positive fixe les mutations favorables. La sélection balancée maintient plusieurs mutations avantageuses en fréquence intermédiaire (adapté d'après Montaigne 2011)

de matériel génétique exogène sont ceux présentés en Figure 1.5. Le transfert horizontal peut se faire entre deux bactéries phylogénétiquement éloignées mais qui partagent une niche écologique commune (Smillie et al. 2011). Les bactéries phytopathogènes peuvent acquérir rapidement des effecteurs de virulence par le biais du transfert horizontal de gènes et de plasmides (Baltrus and Clark 2019). Ainsi, il a été montré que certaines familles d'effecteurs de types III (ET3) comme *hopZ* avaient connus jusqu'à 40 événements de transferts horizontaux au sein du complexe d'espèces *P. syringae* (Dillon et al. 2019a). Des éléments mobiles portant plusieurs gènes peuvent aussi être acquis par transfert horizontal chez les bactéries phytopathogènes. Ainsi, chez *Xanthomonas arboricola*, une lignée du pathovar *juglandis* cause la maladie du chancre suintant en France. Cette lignée renferme un ICE de 95 Kb codant des gènes impliqués dans la résistance au cuivre (Cesbron et al. 2015). L'ICE est identique à celui trouvé dans une souche de *Stenotrophomonas maltophilia* et de *Pseudomonas aeruginosa* et a probablement été acquis par transfert horizontal (Cesbron et al. 2015). Dans d'autres cas, de larges éléments génétiques impactant ou non la fitness des bactéries peuvent être acquis par transfert horizontal. Dans une souche de *P. syringae* pv. *lachrymans* isolée d'un concombre malade, un méga plasmide de 1 Mb (méga-bases) a récemment été acquis (Baltrus et al. 2017, 2011). Ce méga plasmide contient un système de sécrétion de type IV Dot/Icm similaire à ceux de *Legionella pneumophila* pathogènes de l'homme et certains protistes retrouvés dans les eaux douces. Les auteurs ne savent pas si ce système de sécrétion de type IV est fonctionnel chez la souche de *P. syringae* pv. *lachrymans* mais il est supposé que ce méga plasmide pourrait éventuellement conférer à la bactérie un gain de fitness lors de changements écologiques majeurs. Ce méga plasmide s'acquiert par transfert horizontal par le biais des pili conjugatifs et se transmet entre différentes souches du genre *Pseudomonas* en conditions artificielles (Romanchuk et al. 2014).

#### 1.1.4. Les forces évolutives

Les trois mécanismes moléculaires cités précédemment vont permettre l'apparition de nouveaux allèles au sein des populations bactériennes. Des forces évolutives comme la sélection, la dérive génétique, et la migration vont affecter les populations et diminuer, maintenir ou augmenter la fréquence de certains allèles. La sélection est une force qui va conduire à l'augmentation de la fréquence d'un allèle avantageux dans une population (sélection positive), au maintien de différents allèles (sélection balancée) ou à la diminution d'un allèle désavantageux (sélection purifiante) (McDonald and Linde 2002) (Figure 1.6). Par exemple, chez les souches du complexe d'espèces *P. syringae*, les ET3, impliqués dans la virulence et la patho-adaptation, sont dans la plupart des cas sous une forte sélection positive (Dillon et al. 2019a). Pour les autres forces évolutives, la dérive génétique est issue d'un goulot d'étranglement subi par une population (isolement géographique par exemple) et conduit à la perte ou à la fixation de certains allèles (McDonald and Linde 2002). La migration correspond à un flux de gènes entre deux populations partageant la même niche écologique. En l'absence d'autres forces évolutives, ces événements récurrents de migration conduiront à l'homogénéisation des fréquences alléliques (McDonald and Linde 2002).



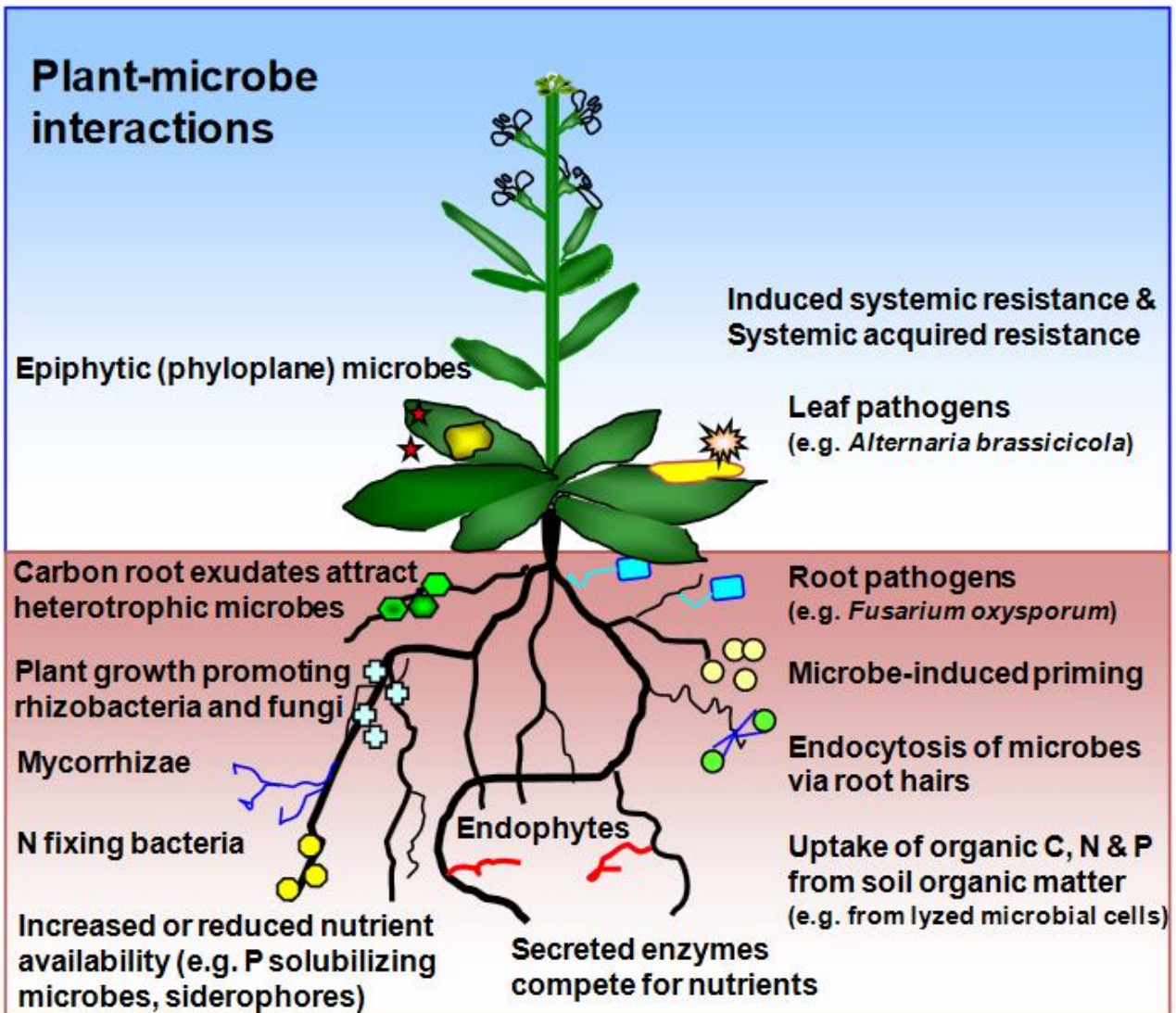


Figure 1.7. Vue d'ensemble des types d'interactions entre les micro-organismes et les plantes. (d'après Schenk et al. 2012)

### 1.1.5. Les réservoirs d'émergence d'agents phytopathogènes

Un réservoir est défini comme un environnement dans lequel des agents phytopathogènes peuvent être maintenus et à partir duquel ils peuvent être transmis à une population cible (Haydon 2002). Ces réservoirs de bactéries phytopathogènes peuvent correspondre à des plantes cultivées, des plantes sauvages, et dans certains cas, des éléments biotiques ou abiotiques variés comme la neige et autres précipitations, la litière végétale, l'eau douce, le sol, voire les insectes (Monteil et al. 2012; Morris et al. 2007, 2010, 2019). Ces réservoirs abritent une grande diversité microbienne, constituant une niche favorable à l'émergence de nouvelles souches en facilitant les échanges de matériel génétique (McCann 2020). Certaines souches du complexe d'espèces *P. syringae* isolées de l'environnement sont génétiquement proches de souches pathogènes des cultures appartenant aux pathovars *P. syringae* pv. *tomato*, *P. syringae* pv. *spinaceae* ou *P. syringae* pv. *apii* (Monteil et al. 2013). En effet, des signaux évidents de recombinaison et des répertoires d'ET3 partiellement recouvrants ont été identifiés entre souches pathogènes des cultures et souches provenant de l'environnement. Ces travaux ont suggéré une émergence de bactéries phytopathogènes spécialistes (sur tomate) très agressives à partir d'une population environnementale généraliste (Monteil et al. 2013).

## 1.2. La colonisation des plantes par les bactéries phytopathogènes

### 1.2.1. Définitions

Au sens large, le microbiote désigne l'ensemble des microorganismes d'un environnement donné (Schlaeppli and Bulgarelli 2014). Le microbiome définit la collection des génomes des microbes d'un environnement particulier (Hooper and Gordon 2001; Schwiertz 2016). Appliqué aux plantes, le microbiote comprend différents microorganismes tels que les bactéries, les archae, les champignons et les protozoaires (Compant et al. 2019 ; Vannette 2020).

Le phytobiome désigne les plantes et toutes les entités qui interagissent avec elles et influencent leur santé et productivité (Figure 1.7). Le phytobiome inclue les organismes microscopiques, macroscopiques et les facteurs environnementaux (Leach et al. 2017 ; Roossinck 2019). Les interactions biologiques entre les organismes du phytobiome sont nombreuses et englobent la compétition (exploitation de la même niche), antagonisme (opposition entre deux organismes, l'une supprimant la croissance de l'autre), le parasitisme (un seul organisme profite de l'interaction au détriment de l'autre), le mutualisme (bénéfique pour les deux organismes), le commensalisme (relation neutre entre les deux organismes, aucun des deux organismes apporte bénéfice ou préjudice à l'autre), l'amensalisme (l'interaction est négative pour l'un des organismes mais neutre pour l'autre) et la symbiose (association bénéfique pour les deux organismes et durable). Les interactions entre organismes du phytobiome sont régulées par la production et la perception de signaux physiques ou chimiques (Leach et al. 2017). Dans le cadre d'une interaction antagoniste, les bactéries vont produire certains composés qui vont être néfastes à d'autres bactéries qui se retrouvent alors inhibées. Par exemple, des bactéries du genre *Bacillus* isolées de Cucurbitacées sont capables d'inhiber la croissance de plusieurs bactéries pathogènes de Cucurbitacées par la production probable de certains de lipopeptides antimicrobiens (Glassner et al. 2015).



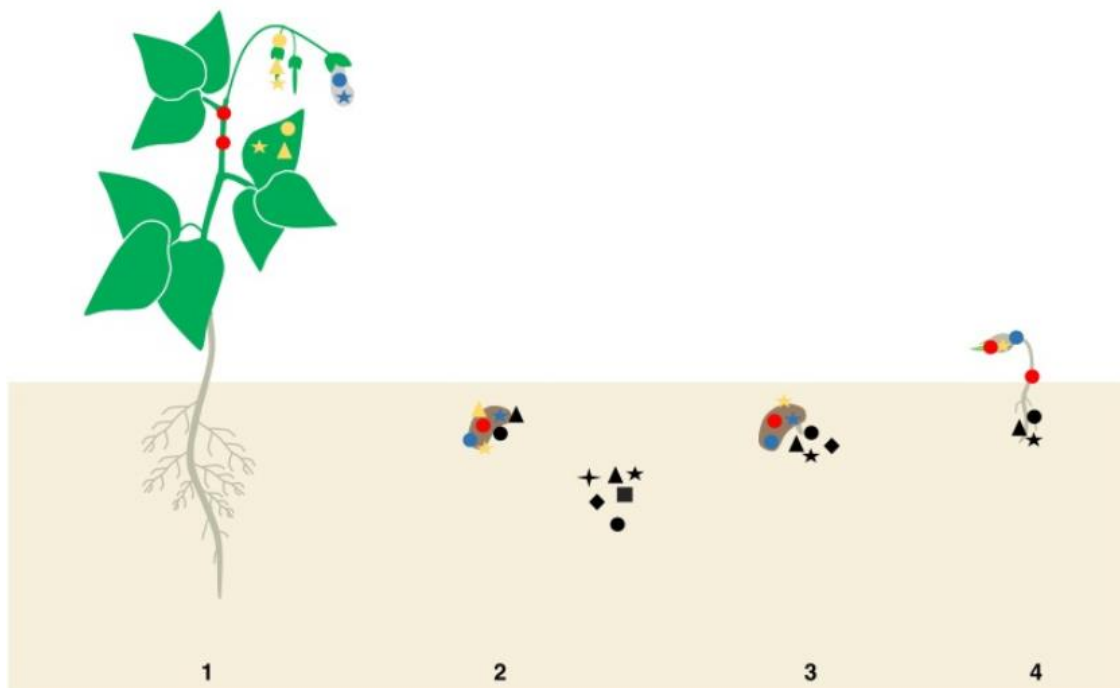


Figure 1.8. Transmission verticale et horizontale du microbiote de la plante. (1 à 2) Transmission des micro-organismes de la plante à la graine : Le microbiote transmis est constitué des populations endophytes de la mère (rouge), des micro-organismes associés aux fleurs et des micro-organismes des fruits et feuilles (jaunes). (2 à 4) Transmission d'une partie du microbiote de la graine à la plantule. (d'après Shade et al. 2017)

Dans d'autres cas, les bactéries produisent certains composés comme des hormones (acide indole acétique et acide gibbérellique) qui promeuvent la croissance plante (Rasul et al. 1998). Sur le riz, des souches de *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries de la rhizosphère favorisant la croissance des plantes (PGPR). Ces souches améliorent la croissance et la santé de leur hôte en modulant différentes voies métaboliques dont certaines impliquées dans le métabolisme primaire, dans le système de défense ou dans la tolérance au stress biotique et abiotique (Kandasamy et al. 2009).

### 1.2.2. Les étapes de la colonisation bactérienne et les mécanismes impliqués

#### a) Les sources d'inoculum des bactéries phytopathogènes et les moyens de dissémination

Pour coloniser une plante hôte sensible, les bactéries phytopathogènes proviennent de différentes sources d'inoculum que sont la semence, les résidus de culture, le sol, les plantes hôtes, l'eau d'irrigation ou les précipitations.

La semence est l'organe de dissémination du patrimoine génétique issu de la multiplication sexuée des plantes et constitue un mode de dissémination d'une partie du microbiote et est une source d'inoculum primaire pour la colonisation de la plante néoformée (Figure 1.8) (Barret et al. 2016a; Truyens et al. 2015). Elle est source de nombreuses bactéries bénéfiques ou mutualistes pour la plante, mais également de bactéries phytopathogènes. Par exemple, le microbiote des graines de courgette (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) de différentes variétés contient différents taxons bactériens dont des taxons potentiellement bénéfiques comme *Lysobacter*, *Paenibacillus* et *Lactococcus* et d'autres potentiellement phytopathogènes comme *Erwinia*, *Pseudomonas* et *Pectobacterium* (Adam et al. 2018). Plus généralement, la semence est une source d'inoculum primaire pour de nombreuses bactéries phytopathogènes appartenant aux genres *Xanthomonas* (Darrasse et al. 2018), *Pseudomonas* (Verma and Agrawal 2018), *Acidovorax* (Dutta et al. 2015), *Pantoea* (Pal et al. 2019), *Clavibacter* (Peritore-Galve et al. 2020), *Curtobacterium* (Jeger et al. 2018), *Burkholderia* (Lee et al. 2018), *Brenneria*, *Gibbsiella* (González and Ciordia 2020), *Erwinia* (Adesemoye et al. 2016; Kawaguchi et al. 2021), *Rathayibacter* (Murray et al. 2017) et *Agrobacterium* (Weller et al. 2002). Certains agents pathogènes transmis par les semences sont responsables de graves épidémies sur les plantes comme *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sur la tomate (de León et al. 2011), *X. citri* pv. *fuscans* sur le haricot (Darrasse et al. 2018), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* sur choux (Vicente and Holub 2012) ou *X. vesicatoria* sur poivron (Giovanardi et al. 2015). Sur les Cucurbitacées, la semence est une source d'inoculum primaire d'*A. citrulli* (Burdman and Walcott 2012), *P. syringae* pv. *lachrymans* (Shila et al. 2013), d'autres *P. syringae* (Newberry et al. 2016a) ou encore *Xanthomonas cucurbitae* (Zhang and Babadoost 2018).

La semence est une source d'inoculum particulièrement importante car elle est à l'origine de l'introduction d'agents pathogènes dans de nouvelles aires géographiques (voir partie 1.1.2.c) (Gitaitis and Walcott 2007a). Par exemple, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* a probablement été introduite à plusieurs reprises en Iran à partir de semis de lots de semences de tomate contaminés provenant d'autres pays (Ansari et al. 2019).

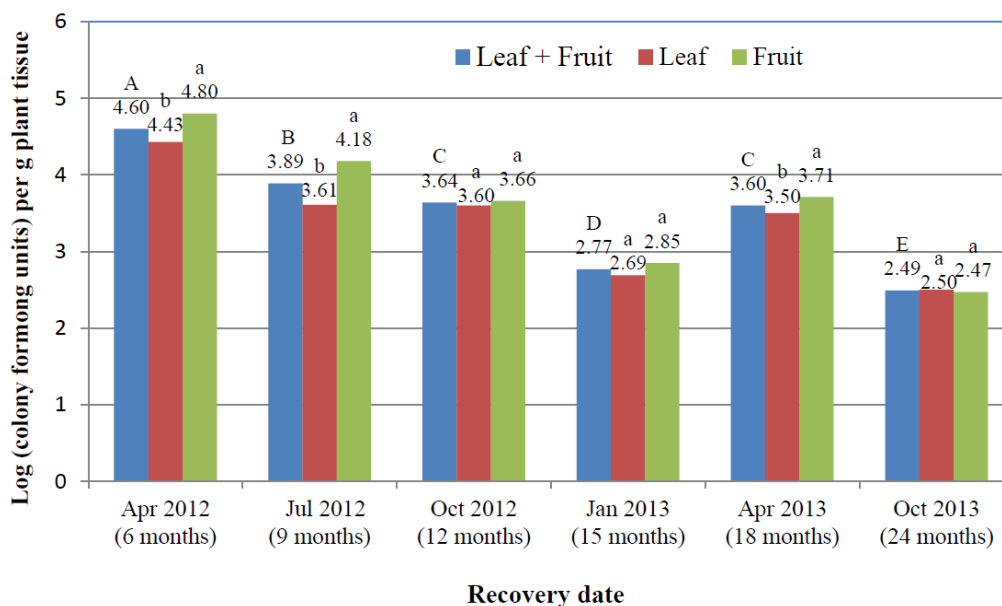


Figure 1.9. Survie de *X. cucurbitae* dans des débris des fruits et feuilles de citrouille enterrés dans le sol dans l’Illinois pendant une période de six à 24 mois. Les barres vertes correspondent à des débris de fruit, les barres rouges des débris de feuilles et les barres bleues à des débris de feuilles et fruits. Les populations bactériennes retrouvées sont exprimées en log de colonies formant une unité (cfu). Les chiffres au dessus des barres indiquent les populations bactériennes pour chaque traitement. (d’après Thapa 2014)

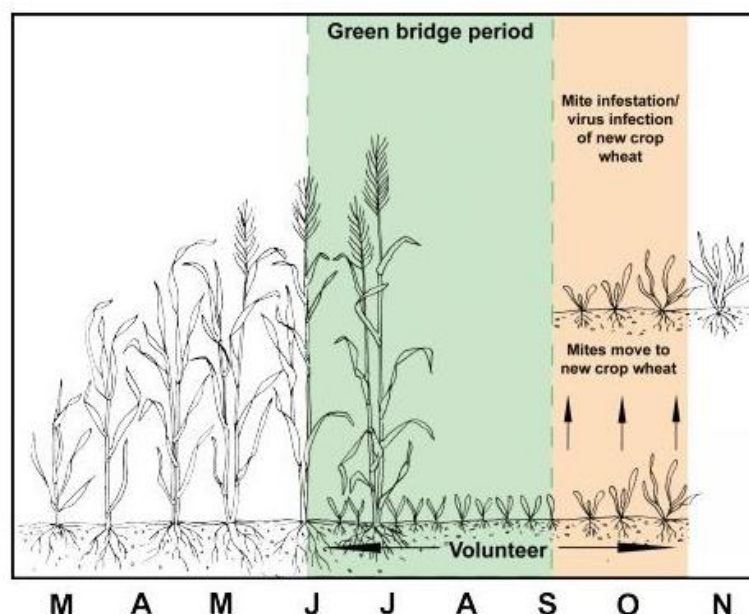


Figure 1.10. Principe d’un pont vert entre deux espèces de plantes permettant la survie des agents pathogènes entre deux cycles culturaux. Lors de la période de culture de blé l’été, les acariens et virus vont coloniser le blé mais certains vont également être mis en contact avec des adventices (hôte alternatif) de la parcelle (vent, machines agricoles, pluie...). Les acariens et virus survivent tout l’hiver par le biais de l’hôte alternatif et au printemps suivant, ils pourront à nouveau coloniser blé. (d’après Schmitz 2015)

En effet, sur la base d'analyses phylogénétiques, les souches isolées en Iran sont diverses et partagent les mêmes types de séquences que des souches originaires d'Europe de l'ouest, du nord de l'Afrique et du continent Américain (Ansari et al. 2019). L'inoculum primaire peut être disponible dans la parcelle qui sera utilisée pour la culture d'intérêt. Ainsi, lors de la culture précédente, après récolte, ou en fin de cycle de culture des espèces annuelles, l'inoculum bactérien ayant infecté la culture peut se conserver à plus ou moins long terme dans les résidus laissés sur place. La durée de survie dépend de la nature de l'agent pathogène lui-même, des pratiques agricoles (enfouissement, par exemple) et des conditions environnementales. La survie dans le sol, en l'absence de matériel végétal en décomposition, est généralement de courte durée pour les bactéries phytopathogènes qui infectent les parties aériennes des plantes, telles que les bactéries *Pseudomonas* spp. ou les bactéries *Xanthomonas* spp. En effet, la bactérie *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc), peut survivre quatre à 24 jours dans le sol sans débris selon la température, la texture du sol, la teneur matière organique et le pH du sol (Silva Júnior et al. 2020). La présence de débris végétaux augmente la durée de survie de Xcc jusqu'à 255 jours à température moyenne de 22°C et à forte humidité du sol (Silva Júnior et al. 2020). *X. cucurbitae* survit également dans les débris de citrouille enfouis dans le sol. Sa capacité de survie est liée à la profondeur d'enfouissement, le type de tissus végétal enterré et la durée d'enfouissement (Figure 1.9) (Thapa 2014). La bactérie est capable de survivre au moins 25 mois dans des débris de feuilles et de fruits contaminés enfouis à des profondeurs de 0 à 20 cm (Thapa 2014). Généralement, les souches du complexe d'espèces *P. syringae* sont aussi capables de survivre dans les débris végétaux et dans la litière végétale sur de longues périodes (Lamichhane et al. 2015; Monteil et al. 2014c). Certaines souches peuvent persister pendant un hiver entier dans des débris de plantes annuelles restées à la surface ou enfouis dans le sol. La survie de *P. syringae* pv. *lachrymans* dans les débris de concombre dépend de la période saisonnière et de la profondeur d'enfouissement des résidus de culture. Les bactéries sont en mesure de survivre jusqu'à deux ans sur des débris laissés à la surface du sol et entre huit à 90 semaines sur débris enfouis dans le sol selon les conditions de température et d'humidité (Bhat et al. 2010).

Les hôtes alternatifs, en l'absence de l'hôte primaire, permettent le maintien de l'inoculum dans l'environnement des cultures et peuvent servir de pont vert entre deux cultures de la plante hôte d'intérêt (Figure 1.10) (Boquet 2012). Ces hôtes alternatifs peuvent représenter des adventices naturellement présentes dans les parcelles agricoles et génétiquement proches ou non de la culture d'intérêt. Des bactéries phytopathogènes comme *Clavibacter nebraskensis*, pathogène du maïs peuvent se maintenir sur un couvert végétal de Graminées pendant l'hiver sur ces hôtes alternatifs présents dans les parcelles (par exemple le regrass) et induire des dégâts lors d'un semis de maïs au printemps suivant dans ces mêmes parcelles (Ikley 2019). En Australie, *Cucumis myriocarpus* est une adventice invasive des parcelles cultivées et peut servir de pont vert pour *A. citrulli* lors entre deux cultures de pastèque séparées par la période hivernale (Shaik et al. 2017). Dans ce cadre, la gestion de certains adventices devient alors un fort enjeu pour la santé des végétaux d'intérêt agronomique. Pour *P. amygdali* pv. *phaseolicola* qui cause la graisse à halo du haricot, des adventices comme *Fumaria* sp, *Mercurialis annua*, *Solanum nigrum* et *Sonchus oleraceus* peuvent être colonisées par la bactérie sans présenter de symptômes (Fernández-Sanz et al. 2016). De plus, la bactérie survit sur *S. oleraceus* pendant au moins 11 semaines après la fin de la culture du haricot, ce qui traduit un potentiel élevé de maintien de l'inoculum dans l'environnement des cultures par les adventices (Fernández-Sanz et al. 2016). En dehors des adventices, ce sont parfois d'autres plantes cultivées qui peuvent servir d'hôtes alternatifs pour les bactéries.

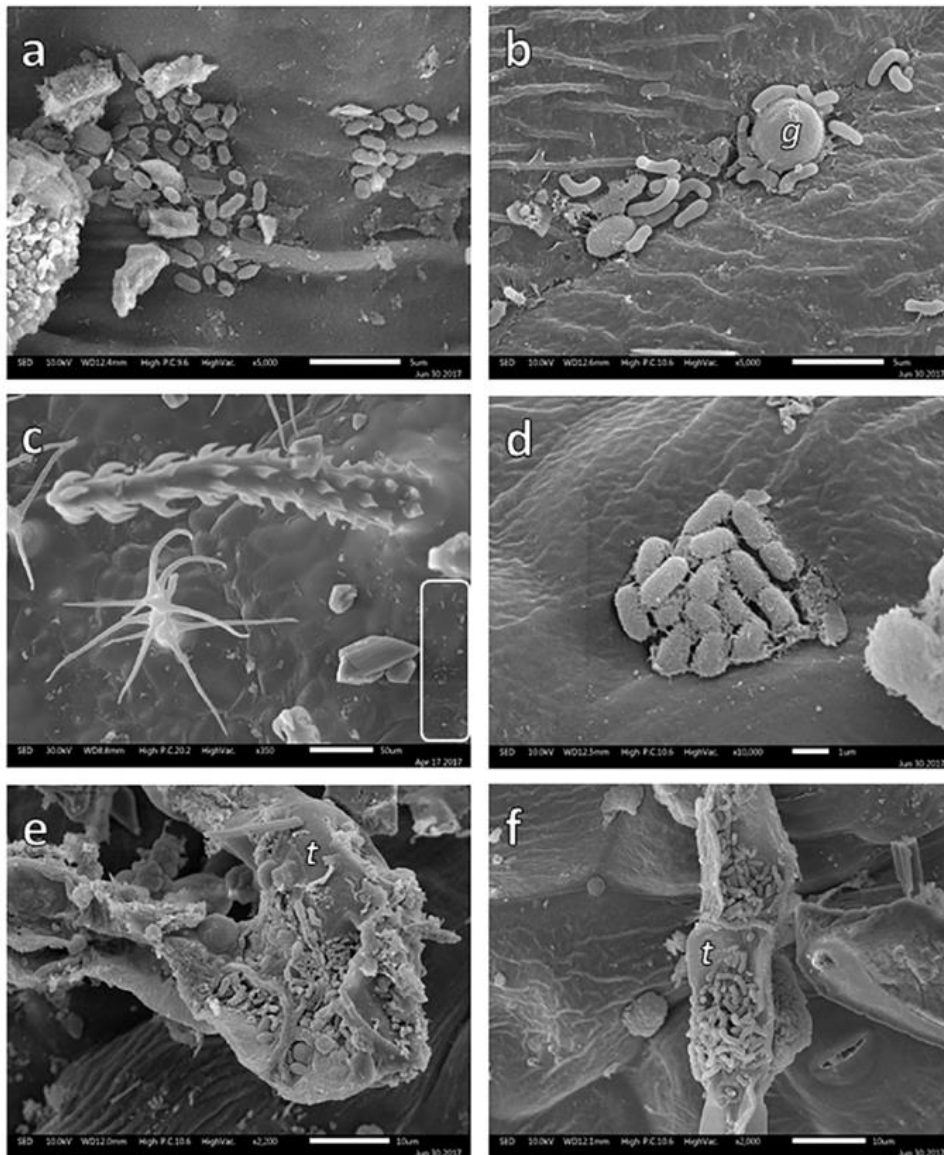


Figure 1.11. Colonies bactériennes à la surface de *Brickellia veronicifolia* observées au microscope électronique à balayage. (t) trichome (d) glandes. (d'après Sanchez et al. 2018).

Ainsi, *X. campestris* pv. *musacearum* responsable du flétrissement du bananier, est détectée sur des hôtes alternatifs divers comme des plantes cultivées en inter-cultures (maïs, millet, sorgho cultivé, taro et canne à sucre) en Afrique centrale (Ocimati et al. 2018). De plus, cette bactérie ne cause pas forcément de symptômes sur les hôtes alternatifs comme le maïs, la canne à sucre et le taro (Ocimati et al. 2018). Dans ce cadre, il est important de connaître les hôtes alternatifs des bactéries phytopathogènes afin de mettre en place des pratiques culturales pertinentes (cycles de rotation et association des cultures).

L'eau d'irrigation peut être une source d'inoculum potentielle de bactéries phytopathogènes mais à ce jour cela n'a pas été démontré. Des souches du pathovar *P. syringae* pv. *aptata* pathogènes du melon ont été isolées dans le sud de la France à partir de bassins de rétention d'eau servant à l'irrigation des cultures (Riffaud and Morris 2002). Néanmoins, la concentration de ces bactéries est basse (inférieure à 100 bactéries.L<sup>-1</sup> d'eau) et il serait nécessaire d'évaluer la capacité de ces bactéries à se transmettre et déterminer si elles seraient capables causer une maladie sur les melons après arrosage. Des bactéries de *X. campestris* pv. *vitiens* phytopathogènes de la laitue ont été isolées plusieurs fois à la surface de bassins d'eau d'irrigation à des concentrations comprises entre 46 et 180 bactéries.mL<sup>-1</sup> ce qui pourrait également constituer une source d'inoculum potentielle (Fayette et al. 2018). Enfin, les précipitations, qu'il s'agisse de la pluie ou de la neige, pourraient servir de sources d'inoculum de bactéries phytopathogènes dont des souches du complexe d'espèces *P. syringae* (Monteil et al. 2014b, 2016).

### 1.2.3. La colonisation épiphyte de la phyllosphère

La phyllosphère correspond à l'habitat aérien colonisé par les microbes épiphytes, c'est-à-dire les feuilles et l'environnement qui est soumis à leur influence (Lindow and Brandl 2003). Le terme épiphyte décrit les bactéries capables de survivre et de se multiplier dans la phyllosphère et plus particulièrement sur la surface foliaire (Hirano and Upper 2000). Les feuilles des plantes sont colonisées par de nombreuses bactéries, en moyenne 10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> cellules par cm<sup>2</sup> (Lindow and Brandl 2003). La surface des feuilles des plantes est irrégulière et contient de nombreux éléments structuraux comme des stomates, des trichomes, des dépressions dans la cuticule, des jonctions cellulaires ou des nervures (Figure 1.11) (Beattie and Lindow 1995; Esser et al. 2015). Les feuilles sont soumises à de nombreux stress environnementaux comme la sécheresse, les fortes températures, le vent et les rayonnements ultraviolets (UV) (Lindow and Brandl 2003). Face à ces stress, les bactéries développent des stratégies pour survivre et se multiplier dans la phyllosphère (Beattie and Lindow 1995). La stratégie de tolérance repose sur des mécanismes permettant de limiter leur impact en se protégeant du stress alors que la stratégie d'évitement consiste à coloniser des endroits à l'abri de ces stress (Beattie and Lindow 1999). Les souches appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* sont souvent considérées comme d'excellentes épiphytes qui mettent en place les deux stratégies pour survivre aux stress environnementaux. Par exemple, la souche B728A tolère un stress osmotique grâce à la synthèse et à l'accumulation d'osmoprotectants comme la glycine bêtaïne, la choline, le tréhalose, le glutamate et le N-acétylglutaminylglutamine amide (Freeman et al. 2013). La synthèse de polysaccharides comme l'alginate et l'induction de certains gènes du SST3 et de type IV contribuent également à la tolérance au stress osmotique pour cette souche (Freeman et al. 2013). Pour éviter un stress, les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* sont motiles (capacité à se déplacer spontanément par réaction à un stimuli) et disposent d'un flagelle pour se déplacer et explorer la feuille à la recherche d'abris (Hockett et al. 2013).



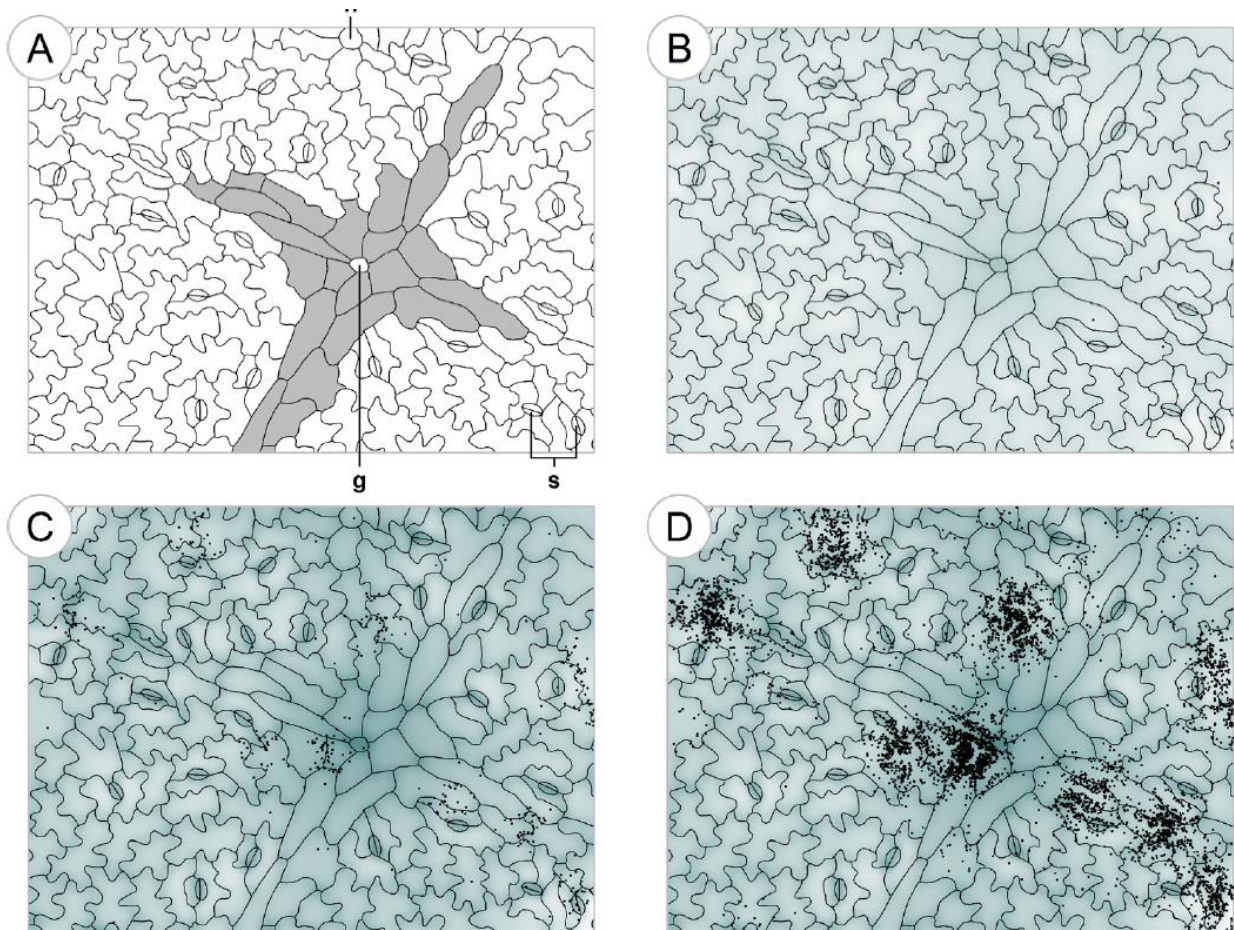


Figure 1.12. Modèle conceptuel du développement bactérien à la surface d'une feuille. (A) Le « paysage » de départ représentant la structure épidermique d'une jeune feuille de haricot. La partie grisée représente des nervures avec un trichome glandulaire au centre (g). Les nervures sont entourées de cellules épidermiques indifférenciées (en pièces de puzzle) et des stomates sont représentés (s). (B) Les ressources nutritives sont représentées par des zones ombrées, en particulier, elles sont proches des nervures, entre des cellules épidermiques et autour du trichome. (C) Au cours du temps, les bactéries qui colonisent la surface de la feuille se reproduisent avec plus de succès aux endroits riches en ressources nutritives, de plus, celles-ci ont tendance à se retrouver piégées dans les rainures par processus gravitationnel ou par augmentation de la densité bactérienne qui réduit la capacité motile. (D) Poursuite de la croissance bactérienne. Après 20 h, la croissance s'arrête. La colonisation de nouvelles régions riches en ressources permet une croissance supplémentaire de la population bactérienne. (d'après Esser et al. 2015)

En conditions de stress UV ou de sécheresse, la souche 31R1 mutante de *P. syringae* et non-motile décline rapidement contrairement la population motile (Haefele and Lindow 1987). Ainsi, la capacité à se déplacer est un élément indispensable pour échapper à un stress délétère pour les bactéries.

Les bactéries ne sont pas réparties de façon homogène sur la feuille (Beattie and Lindow 1995). Elles forment souvent des petits agrégats orientés spatialement vers les endroits riches en ressources nutritives et dans les sites à l'abri des stress environnementaux (Figure 1.12) (Esser et al. 2015 ; Beattie and Lindow 1999). Les ressources carbonées (glucides dont sucres) sont des éléments indispensables pour la survie et la multiplication bactérienne (Mercier and Lindow 2000). Par conséquent, les bactéries se reproduisent avec plus de succès dans les endroits foliaires riches en nutriments comme dans les dépressions proches des nervures, les stomates ou à proximité des trichomes glandulaires (Ramey et al. 2004; Esser et al. 2015 ; Kim 2019). La souche B728A de *P. syringae* pv. *syringae* colonise préférentiellement les espaces proches des trichomes et des nervures car ces zones sont riches en ressources nutritives carbonées (Monier and Lindow 2004 ; Esser et al. 2015). Les trichomes sont des structures importantes pour certaines espèces végétales et possèdent différentes fonctions dont des rôles impliqués dans la défense physique contre les insectes, la régulation de la température de la plante, l'attraction des pollinisateurs, la défense contre les micro-organismes ou encore un rôle de rétention en eau (Wagner et al. 2004). La courgette (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) possède trois types de trichomes glandulaires qui produisent diverses substances chimiques à la surface de la feuille comme des lipides, des flavones et des terpènes (Kolb and Müller 2004). Chez la tomate, une analyse des trichomes glandulaires a mis en évidence la présence de différents profils de métabolites entre les différentes cellules composant la structure du trichome (Nakashima et al. 2016). Des acides aminés, des carbohydrates, des acides organiques et des flavonoïdes ont été détectés dans la tige du trichome glandulaire (Nakashima et al. 2016). Ces différents composés associés aux trichomes des plantes pourraient être des ressources nutritionnelles recherchées par les bactéries de la phyllosphère.

#### 1.2.4. Les mécanismes impliqués la colonisation épiphyte

Les bactéries pathogènes des plantes, dont les souches du complexe d'espèces *P. syringae* établissent de grandes populations épiphytes, généralement agrégées sous forme de biofilms, à la surface des feuilles (Helmann et al. 2019). De nombreux mécanismes interviennent dans la colonisation épiphyte par les souches du complexe d'espèces *P. syringae*.

Dans une première phase, les bactéries se déplacent vers des sites cibles. Le chimiotactisme bactérien est la polarisation d'un mouvement vers un environnement contenant des produits chimiques attractifs ou l'évitement d'un environnement toxique (Wadhams and Armitage 2004). La réponse chimiotactique fait appel à des chémorécepteurs (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins) qui perçoivent les stimuli environnementaux et transmettent l'information par un changement de conformation d'un transmetteur, CheY, à l'origine d'une cascade de transduction de signal affectant le sens de rotation du flagelle (Salah Ud-Din and Roujeinikova 2017).



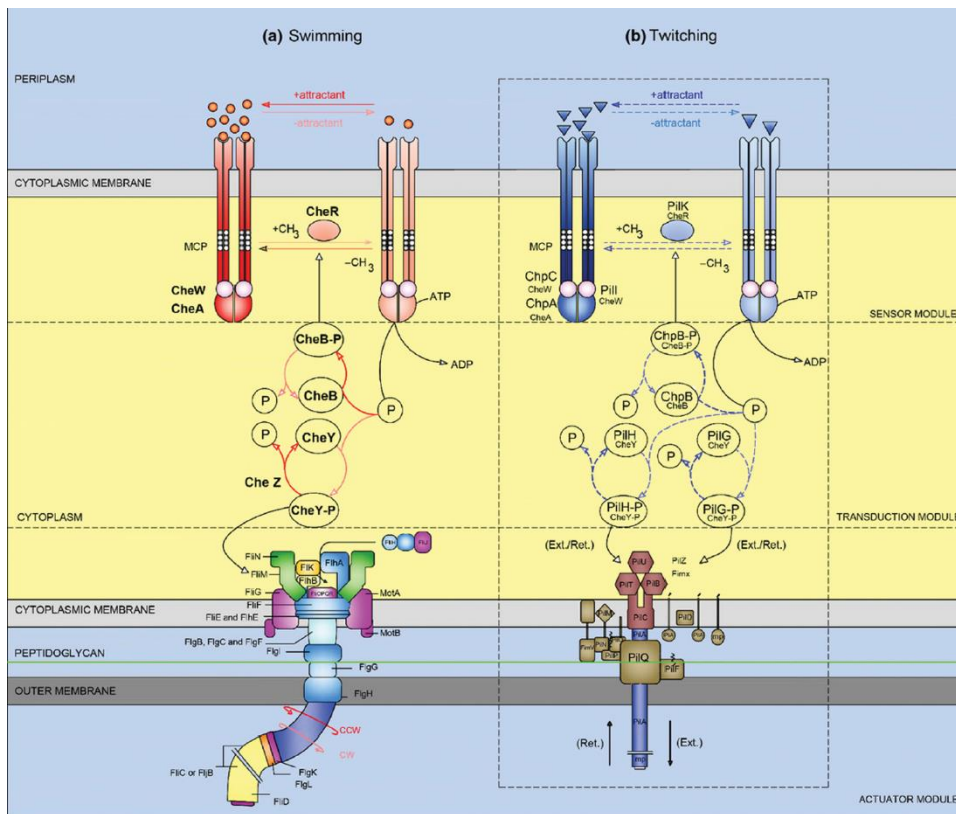


Figure 1.13. Les mécanismes « swimming » et « twitching ». (d'après Sampedro et al. 2015)

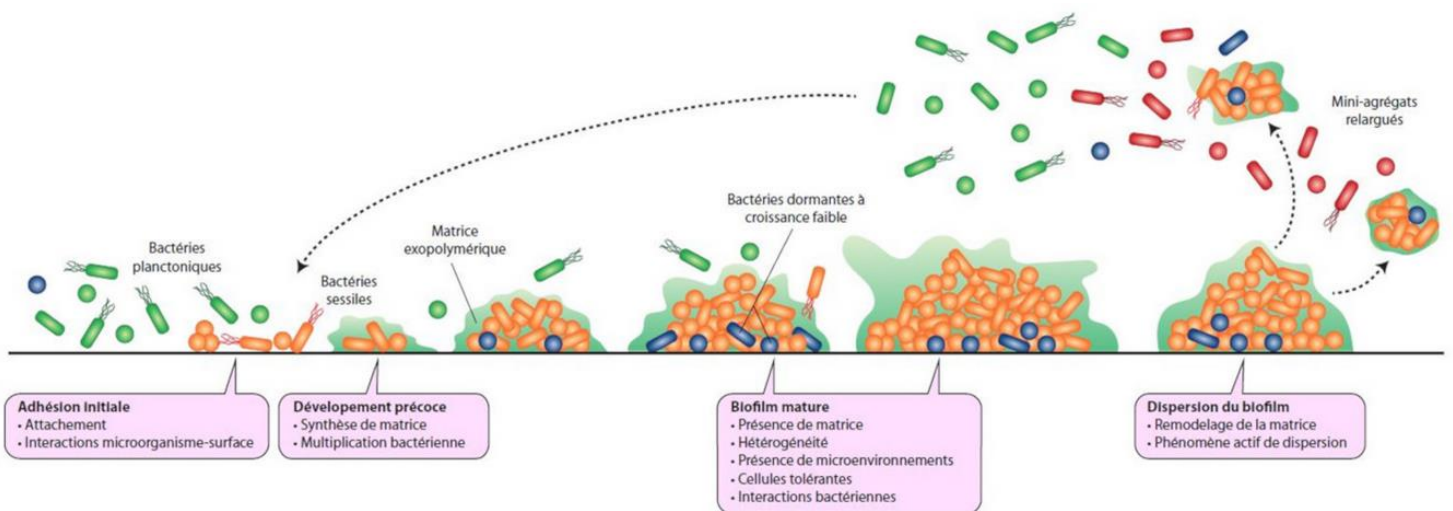


Figure 1.14. La formation de biofilm s'effectue en plusieurs étapes : adhésion initiale, phase de développement précoce puis phase de maturation aboutissant à une phase dite de dispersion, avec détachement d'un certain nombre de bactéries du biofilm sous forme isolée ou de microagrégats, susceptibles de coloniser d'autres surfaces. (d'après Aumeran et al. 2020 ; consulté en ligne le 03/03/2021)

<https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/>

Chez les bactéries du genre *Pseudomonas*, plusieurs composés sont chémoattractifs et induisent la motilité comme des acides aminés, des composés aromatiques, des acides organiques, des phosphates, des composés chlorés et des sucres (Sampedro et al. 2015). Par exemple, le chémorécepteur *PscA* de *P. syringae* pv. *tomato*, pathogène de la tomate, reconnaît spécifiquement L-Asp, I-Glu et d-Asp qui sont des acides aminés présents dans l'apoplasme de la tomate (Cerna-Vargas et al. 2019). Une mutation du gène *pscA* réduit le chimiotactisme mais également la capacité à former des agrégats et la motilité (Cerna-Vargas et al. 2019). Ainsi, cette bactérie mutante ne sera pas en mesure de s'orienter et rejoindre les sites d'infection.

Chez *P. aeruginosa*, la réponse comportementale au chimiotactisme est médiée par trois voies : deux par des flagelles (*Che* et *Che2*) et une par un système de pili putatif (Figure 1.13) (Sampedro et al. 2015). Le mode de déplacement dépendant du flagelle est appelé « swimming ». Les pili de type IV permettent aux bactéries de se mouvoir par des mouvements d'extension – rétractation successifs (Sampedro et al. 2015). Ce mode de déplacement est appelé « twitching ». Dans d'autres cas particuliers, les bactéries peuvent se déplacer en glissant « sliding » sur les surfaces, notamment grâce à la production de surfactants (Bais et al. 2004). Par exemple, *P. syringae* pv. *tomato* utilise la syringafactine, qui est un surfactant, pour se déplacer sur des surface semi-solides indépendamment du flagelle (Nogales et al. 2015). Par ailleurs la production de syringafactine est un trait important chez la souche B728A de *P. syringae* pour la colonisation épiphytisque et la motilité (Hernandez and Lindow 2019). La syringafactine est un tensioactif produit par les gènes *syfA* et *syfB* de la souche B728A et permet de réduire l'effet de tension des surfaces et de faciliter la motilité des bactéries (Burch et al. 2012; Kearns and Losick 2003).

### 1.2.5. La formation de biofilms bactériens

Dans une seconde phase, les bactéries vont se fixer et se multiplier au niveau de sites intéressants (sources de nutriments, abris ...). La formation de biofilm est un mécanisme important pour cette phase. Un biofilm bactérien est un agrégat structuré de cellules bactériennes adhérentes entre elles et à une surface, englobées dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS) produites par les bactéries elles-mêmes (Figure 1.14). Les bactéries sont attachées les unes aux autres et à une surface biotique ou inerte (Costerton et al. 1994; Jamal et al. 2018). Typiquement, 5 à 35 % du biofilm est composé de bactéries d'une ou plusieurs espèces et le volume restant correspond à la matrice extracellulaire (Jamal et al. 2018). Cette matrice est majoritairement composée d'eau (97%), de protéines (> 2%), de polysaccharides (1 – 2 %), de molécules d'ADN et d'ARN (< 1%) et d'ions liés ou libres. Cette matrice sert à piéger des nutriments et minéraux importants (Jamal et al. 2018). Chez les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae*, la cellulose, le levane et l'alginate sont des composés importants pour la composition de la matrice d'EPS (Heredia-Ponce et al. 2020). Le biofilm est hydrodynamique ce qui permet le flux de nutriments à l'intérieur grâce à l'eau (Costerton et al. 1994). Le biofilm permet aussi de protéger les bactéries contre divers stress et composés toxiques. Par exemple, le pathovar *P. syringae* pv. *theae* possède une résistance à la kasugamycine lorsque les bactéries forment des biofilms (Tomihama et al. 2007). En cas de stress hydrique, les populations de la souche B728A de *P. syringae*, formant de larges biofilms sur les feuilles, survivent mieux que les populations bactériennes formant de petits agrégats (Monier and Lindow 2004).

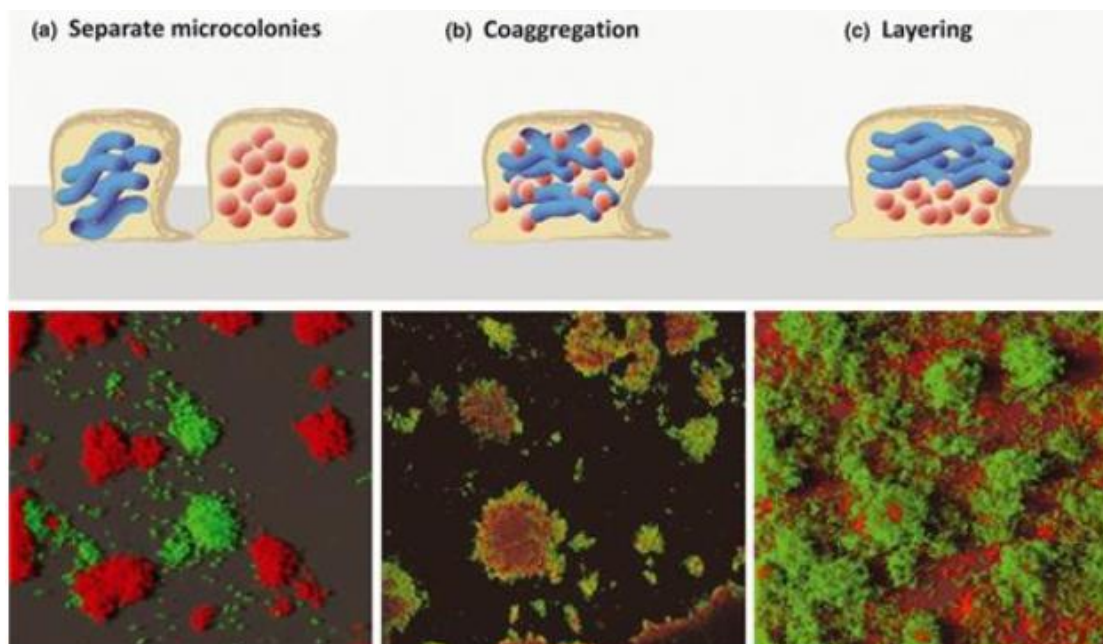


Figure 1.15. Distribution spatiale des biofilms mixtes. Un biofilm mixte peut être organisé en différentes façons (a) micro-colonies séparées (b) co-aggrégation (c) agencement en couches (d'après Elias and Banin 2012)

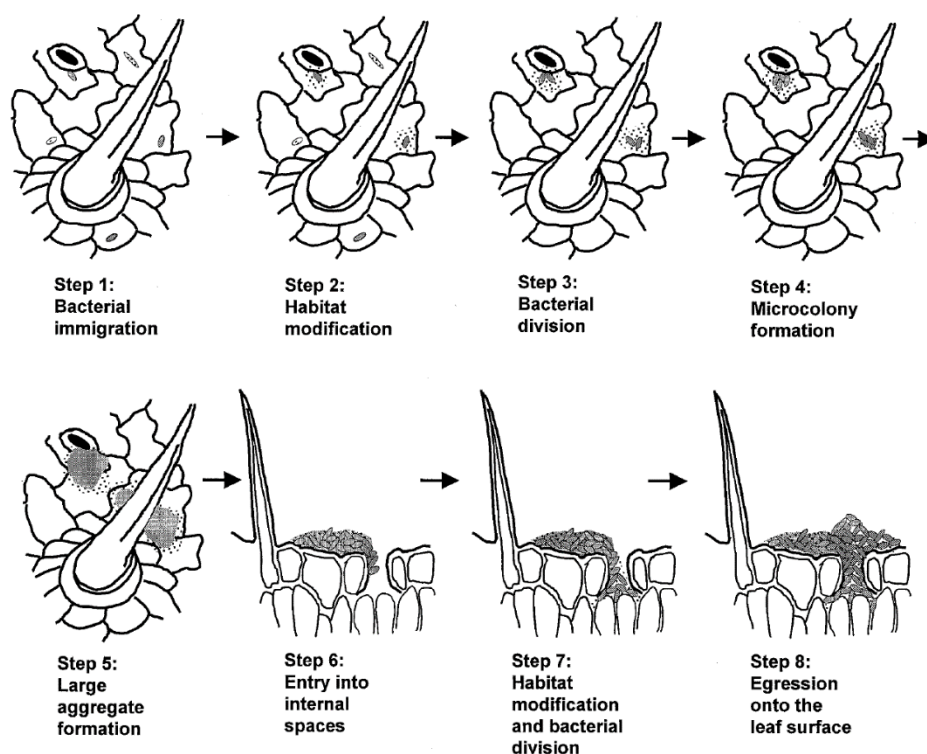


Figure 1.16. Modèle de la colonisation des bactéries. (1) Arrivée des bactéries sur la feuille (2) Certaines bactéries peuvent directement pénétrer dans les stomates mais la majorité restent en surface et modifient l'environnement foliaire pour accéder aux nutriments et produisent des EPS (3) Multiplication bactérienne et poursuite de la modification de l'environnement (4) Formation de microcolonies (5) Formation d'aggrégats (6) Pénétration des espaces inter-celulaires facilitée par la formation d'aggrégats (7) Multiplication bactérienne dans les espaces intercelulaires et modification de l'habitat (8) Egression des bactéries à la surface médiée par une imbibition d'eau, un chancre ou la formation d'une lésion. (d'après Beattie and Lindow 1995)

Chez le haricot, les populations de *X. citri* pv. *fuscans* agencées en biofilm résistent mieux au stress hydrique que les populations solitaires et pourraient servir de réservoir pour essaimer de nouvelles populations solitaires quand les conditions environnementales redeviennent plus favorables à la multiplication bactérienne (Jacques et al. 2005).

Un biofilm est souvent constitué de plusieurs micro-communautés bactériennes qui se coordonnent les unes avec les autres (Jamal et al. 2018). Il s'agit dans ce cas d'un biofilm mixte (Figure 1.15). Cette coordination est essentielle pour l'échange de substrats et la distribution des métabolites lorsque plusieurs espèces bactériennes sont associées dans le biofilm. Ainsi, quand ils sont au sein d'un même biofilm, *Pseudomonas putida* et *Actinobacter* coopèrent pour l'exploitation des ressources (Christensen et al. 2002). Il s'avère que ces deux bactéries utilisent l'alcool benzylique comme source de carbone. Au sein d'un biofilm, plutôt que de rentrer en compétition pour cette unique ressource, *Actinobacter* métabolise l'alcool benzylique et produit du benzoate qui est ensuite métabolisé par *P. putida* (Christensen et al. 2002). Les deux types de bactéries s'agencent en couche, *Actinobacter* au-dessus et capte les nutriments de la matrice, et *P. putida* en dessous pour accéder au benzoate. Chez les plantes, les biofilms sont souvent mixtes, composés de bactéries en mélange, de champignons filamenteux et de levures (Morris et al. 1997).

#### 1.2.6. Le détachement du biofilm

Lors de la dernière phase, les cellules bactériennes se multiplient rapidement et se dispersent pour passer de la forme sessile à la forme motile (Figure 1.14). Les communautés bactériennes produisent différentes enzymes pour permettre le détachement des bactéries et la colonisation d'une nouvelle zone (Kaplan et al. 2004). Ainsi, les bactéries *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* produisent de l'alginate lyase pour la lyse de la matrice d'EPS ce qui permet le détachement (Sutherland 2001). Lors de cette phase, il y a une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des flagelles permettant aux bactéries de retrouver leur mobilité pour atteindre de nouveaux sites. Chez d'autres bactéries comme *X. campestris*, les gènes du cluster *rpf* régulent l'enzyme endo- $\beta$ -1,4-mannanase, qui est impliquée dans la dispersion bien que celle-ci n'ait pas de rôle clair dans la dégradation de la matrice EPS (Dow et al. 2003). Le passage du mode de vie biofilm à la dispersion des bactéries est sous le contrôle de petites molécules diffusibles (DSF) synthétisées par *RpFF* (Dow et al. 2003).

#### 1.2.7. La colonisation endophyte

Après une colonisation épiphyte et la multiplication bactérienne, la pénétration des bactéries par des entrées naturelles ou des blessures permet l'infection de l'apoplasme (Figure 1.16) (Kumar et al. 2021). Le pathovar *P. syringae* pv. *lachrymans* colonise l'apoplasme des plants de concombre suite à son entrée par les stomates, les hydathodes, les lenticelles et les blessures (Akbaba and Ozaktan 2018). En colonisant les espaces intercellulaires (apoplasme) des parenchymes la bactérie devient endophyte. L'entrée par les ouvertures naturelles et la colonisation endophyte peut dépendre de nombreux facteurs comme le type de tissus de la plante (fleur, feuilles, tiges etc.), le génotype de la plante et les conditions environnementales (Hardoim et al. 2015). Pour la souche B728A de *P. syringae*, la colonisation endophyte du haricot par le biais des stomates est facilitée par une humidité relative importante (Sabaratnam and Beattie 2003).



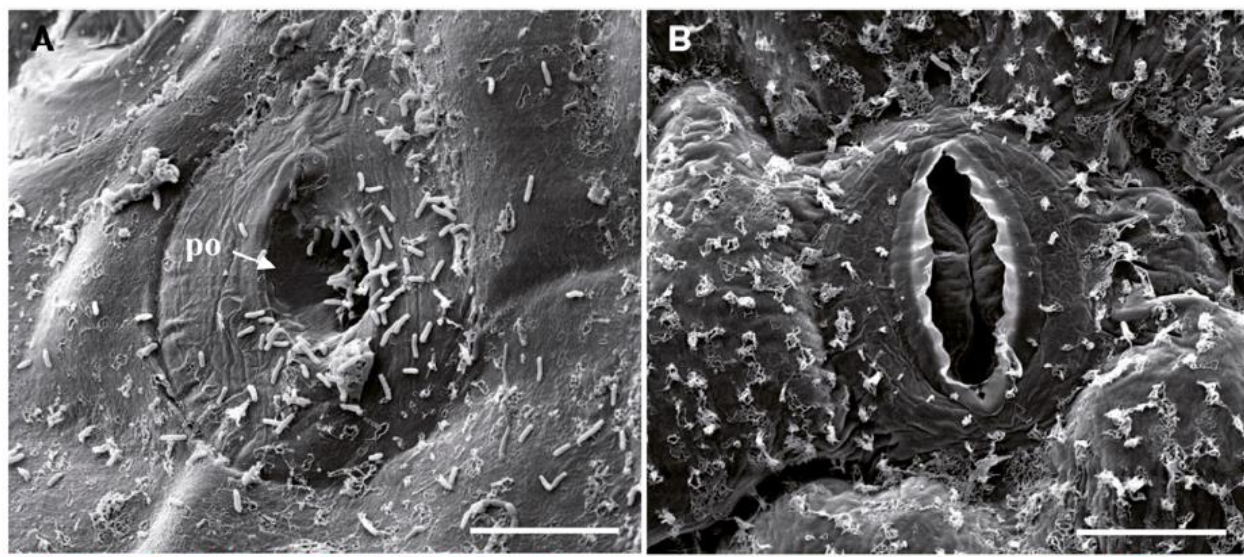


Figure 1.17. Colonisation de la surface des pores de l'hydathode de choufleur par *X. campestris* pv. *campestris* (souche CFBP8004 gus-gfp). (d'après Cerutti et al. 2017)

Les hydathodes peuvent aussi servir de voie de pénétration comme cela a été montré pour la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (Yu et al. 2013). D'autres bactéries, comme celles du pathovar *X. campestris* pv. *campestris*, pénètrent par les hydathodes du chou et atteignent des tailles de population importantes très rapidement dans cette structure de la plante qui est riche en eau et en nutriments, puis ensuite colonisent le xylème sous-jacent à l'hydathode (Figure 1.17) (Cerutti et al. 2017). La fleur fournit aussi des portes d'entrée aux bactéries phytopathogènes comme *E. amylovora* via les nectarthodes (structure du nectaire exsudant le nectar) de la fleur de pommier (Bae et al. 2015 ; Bubán and Orosz-Kovács 2003). Après infection du nectarthode, *E. amylovora* parvient à traverser les tissus de l'épiderme, les tissus glandulaires et les parenchymes du nectaire pour ensuite coloniser le xylème du pommier (Bae et al. 2015).

Dans certains cas, les bactéries synthétisent des métabolites secondaires pour pénétrer de façon plus active dans l'apoplasme des plantes. Certaines souches du complexe d'espèces *P. syringae* peuvent pénétrer dans l'apoplasme des plantes grâce à leur pouvoir glaçogène. Le pouvoir glaçogène (codé par le gène *INA*) confère aux bactéries la capacité d'induire la nucléation des cristaux de glace à des températures comprises entre -2°C et -5°C, ce qui va causer des blessures liées au gel à la surface des feuilles et permettre la colonisation apoplastique (Lindow 1982; Xin et al. 2018). Ainsi, le pouvoir glaçogène est un facteur de virulence important pour ces bactéries sous les climats tempérés où des températures fraîches peuvent survenir. C'est pourquoi sur les abricotiers, les chancre causés par les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* se développent sur arbres dans les conditions printanières fraîches (Parisi et al. 2019). Les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* peuvent produire d'autres métabolites secondaires comme des toxines pour faciliter leur pénétration dans l'apoplasme. Ainsi, certaines souches de *P. syringae* sécrètent de la coronatine ou de la syringoline A qui induisent la réouverture des stomates dont la fermeture a été induite par le système de défense basale de la plante (Melotto et al. 2006, 2017). De plus, la sécrétion de certaines protéines de virulence, dont les ET3, permet aussi l'ouverture des stomates. Par exemple chez la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato*, l'ET3 *avrB* module la phosphorylation de la protéine RPM1-interacting 4 (RIN4) et l'activité ATP-ase de la membrane, ce qui conduit à l'ouverture des stomates (Xin et al. 2018; Zhou et al. 2015).

Une fois à l'intérieur des tissus de la plante, les bactéries vont se multiplier et coloniser les espaces inter-cellulaires. Les sources nutritives disponibles dans l'apoplasme ont un rôle particulièrement important pour la multiplication bactérienne. La souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* exploite les ressources disponibles dans le fluide autour des cellules comme le GABA, l'aspartate, le glutamate, le fructose, le glucose, le citrate, le succinate, le malate, et le malonate mais aussi des métabolites utiles à sa multiplication comme le turanose et le trehalose (Rico and Preston 2008). Certains déterminants moléculaires sont importants pour la fitness des bactéries dans l'apoplasme. La souche de B728A de *P. syringae* a besoin d'une toxine, la syringomycine, pour une colonisation efficace de l'endoplasme puisque les souches mutantes (*syrP* et *syrD*) ont une fitness altérée dans l'apoplasme (Helmann et al. 2019). En plus des enzymes et des toxines, la synthèse de certains polysaccharides spécifiques est indispensable pour la colonisation apoplastique de *P. syringae*. Par exemple, les mutants de la régulation de l'alginate (*algU*) de la souche B728A sont fortement impactés dans la colonisation endophyte (Helmann et al. 2019).



Figure 1.18. Phénomène de ooze photographié sur un kiwi infesté par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Bugiani, <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMAK/photos>)

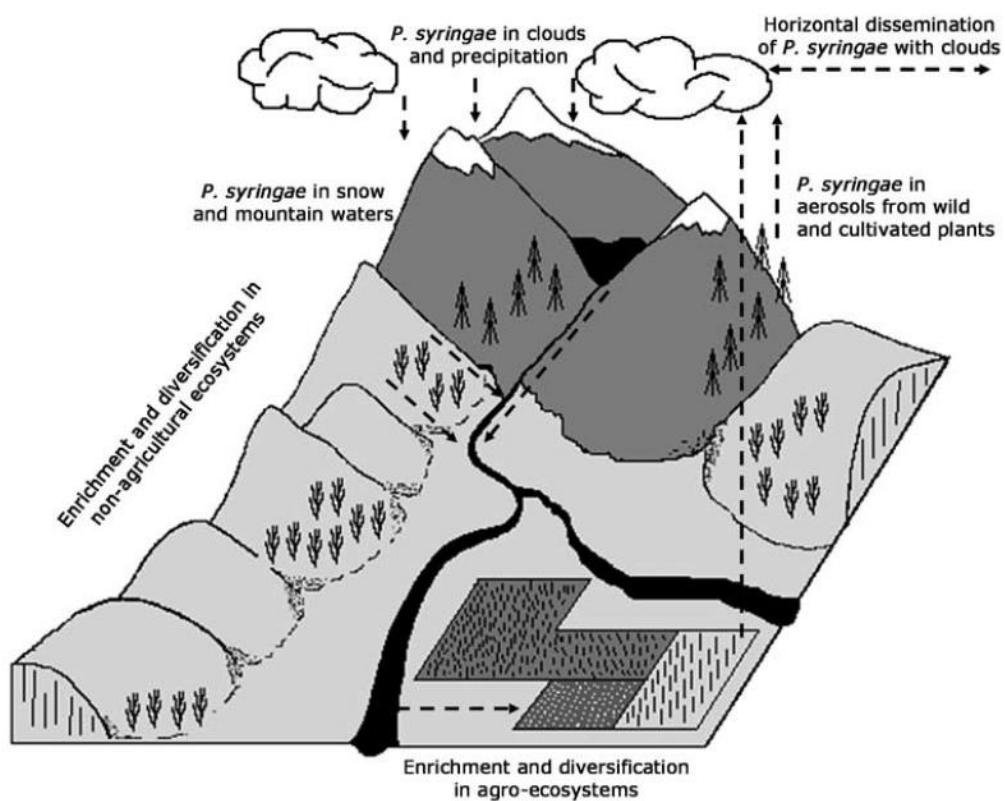


Figure 1.19. Modèle hypothétique selon lequel le cycle de *P. syringae* et sa dissémination seraient liés au cycle de l'eau. (d'après Morris et al. 2008)

En outre, les ET3 sont essentiels pour la colonisation endophyte par les bactéries phytopathogènes car ils suppriment les défenses des plantes et permettent la multiplication apoplastique (Macho et Zipfel 2015; Rufián et al. 2016). Ainsi, chez la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato*, la colonisation endophyte et la multiplication bactérienne est impactée négativement dès 48 h chez le mutant *hrpA* qui est un composant du SST3 (Boureau et al. 2002).

### 1.2.8. La dispersion

Après une multiplication abondante dans l'apoplasme, les bactéries se dispersent à nouveau. Le phénomène d'oozing illustre bien cette situation où des gouttelettes suintantes et très chargées en inoculum bactérien sont exsudées par les plantes infestées ce qui constitue une source d'inoculum importante. Ce phénomène est particulièrement courant chez certaines bactéries phytopathogènes des arbres comme *E. amylovora* ou *P. syringae* pv. *actinidiae* (Figure 1.18) (Chiriac et al. 2015). Toutefois, ce genre de phénomène est également observé sur des plantes annuelles comme le concombre infesté par *P. syringae* pv. *lachrymans* (Lamey 1991) ou sur le haricot infesté par *P. amygdali* pv. *phaseolicola* (Bozkurt and Soyly 2011). Les gouttelettes d'oozing sont constituées d'une masse de bactéries atteignant des tailles de population énormes comprises entre  $10^6$  et  $10^8$  ufc/ $\mu$ L et entourées EPS (amylovoran) (Slack et al. 2017). Néanmoins, à la différence d'un biofilm bactérien, les cellules dans une gouttelette d'ooze ne sont pas attachées à une surface ce qui permet une dissémination libre (Slack et al. 2017).

Certains facteurs biotiques et abiotiques permettent la propagation à courte ou longue distance des bactéries phytopathogènes (Lamichhane et al. 2015). Par exemple, le vent, les aérosols et l'eau transportent ces agents phytopathogènes sur des distances plus ou moins importantes (Monteil et al. 2014c; Morris et al. 2013). Pour les souches du complexe d'espèces *P. syringae*, il est suggéré que le cycle de l'eau soit impliqué dans la dissémination des bactéries à l'échelle d'un bassin versant (Figure 1.19) (Morris et al. 2008). Les insectes comme les pucerons peuvent aussi disperser les bactéries phytopathogènes. Par exemple, les pucerons sont capables d'acquérir les bactéries de la souche B728A de *P. syringae* en se nourrissant sur le pois, puis les bactéries colonisent le tube digestif de l'insecte, se multiplient et sont excrétées par le miellat ce qui entraînent une inoculation de la phyllosphère jusqu'à  $10^7$  bactéries par  $\text{cm}^2$  (Stavrínides et al. 2009). Les humains et les animaux dispersent également les bactéries phytopathogènes lors de leurs déplacements dans les parcelles (Lamichhane et al. 2015 ; Bashan 1986). Les outils agricoles et les engins agricoles contaminés sont aussi à l'origine de dispersion de souches phytopathogènes dans les parcelles (Lamichhane et al. 2015 ; Bashan 1986). En conséquence, certaines mesures préventives peuvent être mises en place pour limiter la dispersion des bactéries comme la désinfection des outils agricoles.



Type d'interaction	NON-HÔTE	HÔTE	
		INCOMPATIBLE	COMPATIBLE
Plante	Immunisée	Résistante	Sensible
Pathogène	Avirulent	Avirulent	Virulent
Défense de la plante	Barrières de défenses constitutives Défenses basales : PTI	Défenses basales : PTI Protéines de résistance activant une réponse de défense spécifique : ETI	Défenses basales : PTI
Mécanisme d'interaction associé	Barrières physique et biochimique MAMP détectés	Effecteurs avirulents reconnus : relation gène pour gène	Interactions spécifiques entre effecteurs / toxines et leurs cibles hôtes
Conséquence	Pas de maladie	Pas de maladie ou fortement réduite	Maladie : multiplication et dissémination de l'agent pathogène

Figure 1.20. Les types d'interactions hôte-agent phytopathogène. PTI : PAMP-Triggered Immunity, MAMP : Microbe-Associated Molecular Pattern, ETI : Effector-Triggered Immunity. (D'après Ruh 2017)

## 1.3. Les interactions entre les plantes les bactéries phytopathogènes

### 1.3.1. Les mécanismes impliqués dans les interactions plantes-bactéries

#### a) Les types d'interactions plantes-bactéries

Les bactéries phytopathogènes colonisent les plantes et engagent un dialogue moléculaire avec elles. Dans certains cas, la colonisation d'une plante par une bactérie phytopathogène va entraîner une maladie et dans d'autres cas, il n'y aura pas de développement de maladie. Il existe trois types d'interactions entre un hôte et un agent-pathogène définis selon l'issue de l'infection : (i) l'interaction non-hôte, (ii) l'interaction hôte incompatible et (iii) l'interaction hôte compatible (Figure 1.20) (Hammond-Kosack and Jones 1997; Ayliffe and Sørensen 2019). L'interaction non-hôte correspond à une interaction où dans n'importe quelle situation, un agent phytopathogène donné est incapable d'infecter une espèce végétale donnée. On parle aussi de résistance non-hôte, celle-ci permet de définir la gamme d'hôte des agents phytopathogènes. Ce type d'interaction est le plus fréquemment rencontré dans la nature. L'interaction hôte incompatible correspond à une interaction où une plante est résistante car elle est capable de reconnaître l'agent phytopathogène et de lui résister spécifiquement. On parle également de résistance spécifique et l'agent phytopathogène est avirulent. Cette interaction repose sur une relation gène pour gène par le biais d'un gène d'avirulence (*avr*) reconnu par un gène de résistance (R) correspondant (Hammond-Kosack and Jones 1997). L'interaction hôte compatible correspond à une interaction où une plante est sensible soit parce qu'elle ne parvient pas à reconnaître l'agent phytopathogène, soit parce que, bien que la plante reconnaisse l'agent phytopathogène, ce dernier parvient à contourner les défenses de la plante. Lors d'une interaction compatible, l'agent phytopathogène va pouvoir coloniser, se multiplier dans la plante hôte et induire des symptômes plus ou moins marqués. Une maladie peut alors se développer sur la plante, et dans ce cas, l'agent phytopathogène est considéré comme virulent et la plante comme sensible. L'intensité des symptômes est alors dépendante de caractéristiques physiologiques de la plante hôte sensible et de facteurs de l'agent phytopathogène (répertoires de toxines, d'enzymes de dégradation des parois, ET3, et autres protéines), nommés « facteurs de virulence ». Cet aspect quantitatif du pouvoir pathogène est décrit dans l'agressivité des agents pathogènes (Vanderplank 1978).

#### b) Les mécanismes de défense basale des plantes

Lors d'un premier niveau de défense (défense basale), les plantes reconnaissent les bactéries dans leurs tissus en détectant les molécules qui peuvent être des composants externes, telles que la flagelline, les peptidoglycanes et les lipopolysaccharides des parois cellulaires bactériennes (Harris et al. 2020). D'autres composés tels que les ARN bactériens et certains facteurs d'élongation comme le facteur Tu (EF-Tu) sont reconnus par les plantes (Schoonbeek et al. 2015; Padmanabhan et al. 2009). Ces molécules reconnues par les plantes constituent des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) (Figure 1.21). La reconnaissance des PAMP par les récepteurs végétaux (ou pattern-recognition receptors, PRR) active l'immunité innée ou PAMP triggered immunity (PTI). De nombreux PAMP sont reconnus par différents PRR au niveau de la membrane plasmique de la cellule végétale. Par exemple, la flagelline Flg22 de *P. syringae* est reconnue par le récepteur kinase FLS2 chez *Arabidopsis thaliana* (Zeng and He 2010). Chez *Agrobacterium*, EF-Tu est une protéine d'élongation procaryote qui est reconnue par le récepteur EFR de la plante (Zipfel et al. 2006).

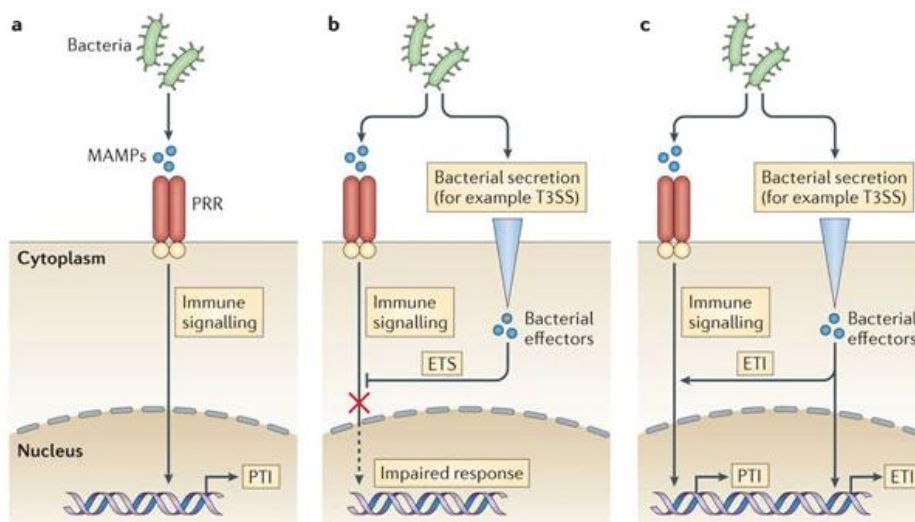


Figure 1.21. L'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI) versus l'immunité innée (PTI). (a) Au cours d'une infection bactérienne, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP ou MAMP) sont reconnus par les récepteurs végétaux (PRR) ce qui induit la réponse immunitaire innée (PTI). (b) Les protéines effectrices sécrétées par les bactéries suppriment la réponse immunitaire induite par les PRR pour favoriser l'infection. C'est ce qu'on appelle la sensibilité déclenchée par l'effecteur (ETS) (c) Les hôtes résistants peuvent détecter la présence d'effecteurs bactériens et activer l'immunité déclenchée par les effecteurs (ETI). L'ETI peut se produire indépendamment des voies de signalisation immunitaires primaires ou en amplifiant la réponse PTI en cours. (adapté d'après Stuart et al. 2013).

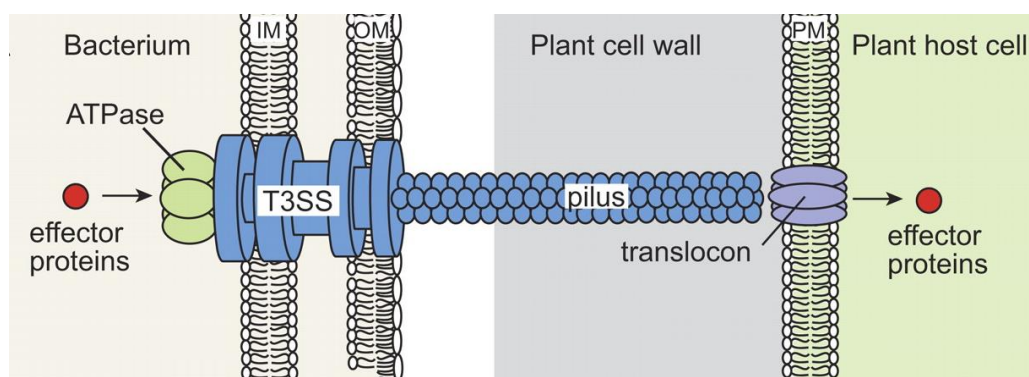


Figure 1.22. Représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) des bactéries phytopathogènes. L'appareil de sécrétion s'étend sur deux membranes bactériennes et est associé à une ATPase cytoplasmique. Le T3SS des bactéries phytopathogènes est connecté à un pilus extracellulaire qui traverse vraisemblablement la paroi cellulaire végétale. Le pilus est lié au translocon, qui forme un canal protéinique dans la membrane plasmique de l'hôte et qui permet le transport des protéines effectrices dans le cytosol de la cellule hôte. (adapté d'après Büttner and He 2009)

La reconnaissance des PAMP déclenche les défenses basales de la plante caractérisées par l'activation rapide des mécanismes de défense de la plante comme la fermeture des stomates, la libération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), le renforcement des parois cellulaires par dépôt de callose et l'induction de nombreux gènes de résistance (Zipfel et al. 2006). Ce premier niveau de réponse de la plante n'est pas spécifique et généralement peu intense (Jones and Dangl 2006). Néanmoins, les défenses basales de la plante vont permettre de mettre fin à l'invasion d'une bactérie dans le cas d'une interaction non-hôte.

### c) Les mécanismes impliqués dans la réponse spécifique

Lors des interactions hôte-compatible et hôte incompatible, les bactéries phytopathogènes vont contourner ou supprimer les défenses basales des plantes par l'injection d'effecteurs dans les cellules végétales (Figure 1.22, Figure 1.23) (Jones and Dangl 2006). Les effecteurs interfèrent avec la PTI conduisant à la sensibilité ou à l'immunité déclenchée par les effecteurs (respectivement ETS pour Effector-triggered susceptibility et ETI pour Effector-triggered immunity) et peuvent également détourner le métabolisme de la plante (Jones and Dangl 2006).

Les gènes de résistance codent des récepteurs protéiques intracellulaires de résistance appelés protéines NBS-LRR (nucleotide-binding site-leucine-rich repeat). Ces protéines des plantes partagent des propriétés structurales avec la présence d'un site de liaison nucléotidique (NB) suivi d'un nombre variable de répétitions riches en leucine (LRR) (Dangl and Jones 2001). La majorité des dicotylédones et monocotylédones possède des protéines de résistance NBS-LRR (Baggs et al. 2020). Par exemple, le génome d'*A. thaliana* contient environ 125 protéines NBS-LRR (Dangl and Jones 2001) alors que d'autres espèces végétales comme le blé peuvent en contenir plus de mille (IWGSC et al. 2018). La courgette contient 64 protéines de résistance NBS-LRR (Andolfo et al. 2017). La plupart des protéines de résistance NBS-LRR sont présentes dans le cytoplasme de la cellule végétale sous forme inactive (Harris et al. 2020). La reconnaissance directe ou indirecte d'un effecteur spécifique injecté par un agent phytopathogène engendre une multitude de réactions et de processus conduisant à l'ETI (Harris et al. 2020). L'ETI déclenche une réponse immunitaire plus intense de la part de la plante hôte (Araújo et al. 2019 ; Jones and Dangl 2006). L'ETI implique différentes voies métaboliques comme la signalisation par l'ion calcium, la production de ROS, l'accumulation de protéines liées à la pathogénie, la synthèse de composés anti-microbiens et des changements hormonaux dans les voies de synthèse de l'acide salicylique et de l'acide jasmonique (Araújo et al. 2019). De plus, l'ETI déclenche une réponse hypersensible (HR) conduisant à une mort cellulaire rapide et localisée au point de contact avec l'agent phytopathogène (Balint-Kurti 2019).

La sélection naturelle permet aux agents phytopathogènes d'éviter l'ETI soit en diversifiant le gène effecteur reconnu, soit en acquérant des effecteurs supplémentaires qui suppriment l'ETI (Jones and Dangl 2006). Dans cas, l'agent phytopathogène contourne la résistance de la plante et il s'agit de l'interaction hôte-compatible. La sélection conduit également à l'acquisition de nouveaux allèles chez la plante afin de reconnaître les nouveaux effecteurs acquis par les agents phytopathogènes et permet à nouveau déclencher l'ETI (Jones and Dangl 2006).

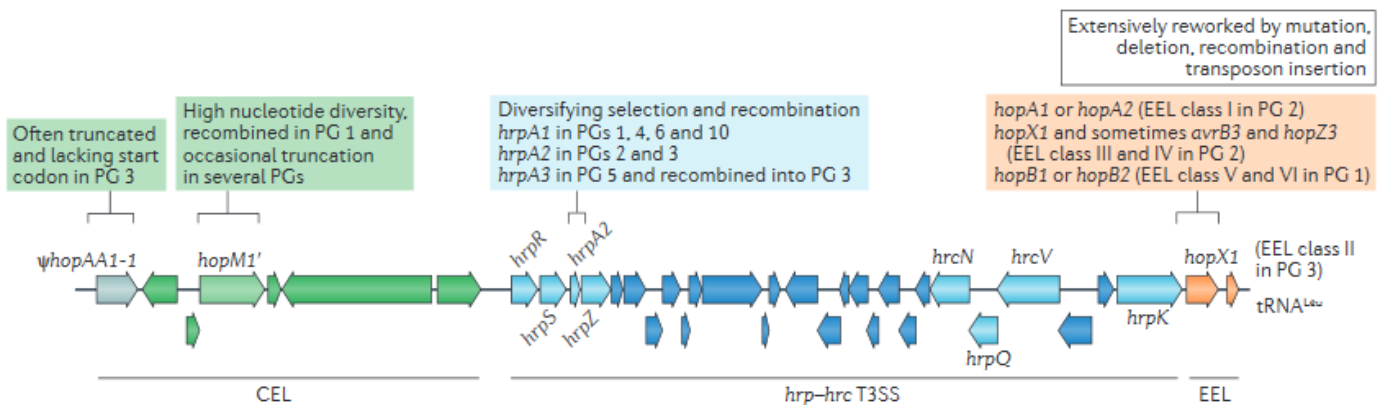


Figure 1.23. Schématisation de l'îlot de pathogénicité canonique tri-parties (T-PAI) de *P. amygdali* pv. *phaseolicola* (souche 1448A). Le T-PAI contient les gènes *hrp* et *hrc* pour l'assemblage et la régulation du système de sécrétion de type III (T3SS). Le cluster de gènes *hrp* - *hrc* T3SS code tous les gènes structuraux nécessaires à l'assemblage du T3SS. Il code également les régulateurs en amont *HrpR* et *HrpS*, qui sont des protéines activatrices paralogues et qui sont nécessaires pour induire l'expression de des fonctions extracytoplasmiques (ECF) de la famille du facteur- $\sigma$  *HrpL*. Ce facteur est le régulateur principal de l'expression de tous les gènes structuraux du T3SS et des gènes codant pour les effecteurs de type III (T3E). Adjacent au cluster *hrp* - *hrc* se trouve le locus effecteur conservé (CEL), qui code trois effecteurs hautement conservés : *hopAA1-1*, *hopM1* et *avrE*. Le gène *hopAA1-1*. Le cluster *hrp* - *hrc* est flanqué d'un deuxième locus : le locus effecteur échangeable (EEL). La structure de l'EEL et la teneur en effecteurs varie considérablement entre les souches et les phylogroupes du complexe d'espèces *P. syringae*. La région EEL a été largement retravaillée par mutation, délétion, recombinaison et insertion de transposon et contient généralement zéro à trois T3E. (D'après Xin et al. 2018)

### 1.3.2. L'arsenal bactérien pour contourner les défenses de la plante

#### a) Les effecteurs de type III (ET3)

Les effecteurs bactériens sont des protéines qui contribuent à la virulence en imitant ou en inhibant les fonctions cellulaires des eucaryotes (Grant et al. 2006). Les effecteurs bactériens interfèrent avec les déterminants du système de défense de la plante dont la PTI, l'ETI et les voies sous contrôle hormonal (Khan et al. 2018). Collectivement, les effecteurs manipulent l'hôte pour optimiser l'environnement inter et intra cellulaire afin de favoriser leur croissance et leur dissémination (Grant et al. 2006).

De nombreux effecteurs sont sécrétés par des bactéries phytopathogènes grâce au SST3. Ces effecteurs sont ainsi appelés T3E. Le SST3 est présent chez la majorité des bactéries gram-négatives pathogènes des plantes comme *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp., *Erwinia* spp. et *Ralstonia* spp. (Büttner and He 2009). Le SST3 permet à l'agent phytopathogène de sécréter et d'injecter les ET3 directement dans le cytosol des cellules eucaryotes *via* un pilus (Figure 1.22) (Büttner and He 2009; Li et al. 2007). Le SST3 est codé par des gènes *hrp* (hypersensitive reaction and pathogenicity) et *hrc* (*hrp*-conserved) (Xin et al. 2018). Les mutants des gènes *hrc* n'ont plus de SST3 fonctionnel et sont incapables d'induire la réaction hypersensible sur les plantes hôtes-incompatibles ou la maladie sur les plantes hôtes-compatibles (Lindgren et al. 1986). Chez les souches phytopathogènes du complexe d'espèces *P. syringae*, les gènes *hrp* et *hrc* sont organisés en un cluster sur une même région chromosomique dans un îlot de pathogénie en trois parties (T-Pai) (Figure 1.22) (Xin et al. 2018). En effet, les gènes *hrp* et *hrc* sont flanqués par un cluster d'effecteurs conservés (CEL) et par un cluster EEL qui varient selon les souches et les pathovars (Xin et al. 2018). Les effecteurs codés par le CEL sont en général conservés et portent les ET3 suivants : *hopAA1-1*, *hopM1* et *avrR* (Xin et al. 2018).

Les ET3 directement injectés dans les cellules de la plante ont des activités variées et permettent très souvent un gain de virulence ou la suppression de l'immunité de l'hôte (Dillon et al. 2019a). Au sein de la cellule végétale, les ET3 peuvent cibler différents compartiments de la cellule végétale (Cannonne et Rivas 2012). Chez *P. syringae*, 52 % des effecteurs ciblent des protéines de la membrane de la cellule végétale, 25 % ciblent le noyau et 19 % ciblent le cytoplasme (Khan et al. 2018). Bien que moins fréquents, d'autres compartiments peuvent être ciblés comme les chloroplastes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Khan et al. 2018). Les protéines ciblées par les effecteurs des souches du complexe d'espèces *P. syringae* ont diverses fonctions biologiques et moléculaires. Les protéines ciblées sont majoritairement impliquées dans des voies de signalisation et de transcription. Les cibles moléculaires sont principalement des kinases comme par exemple les MAP kinases ciblées par les effecteurs *avrB* et *hopZ3* (Khan et al. 2018).

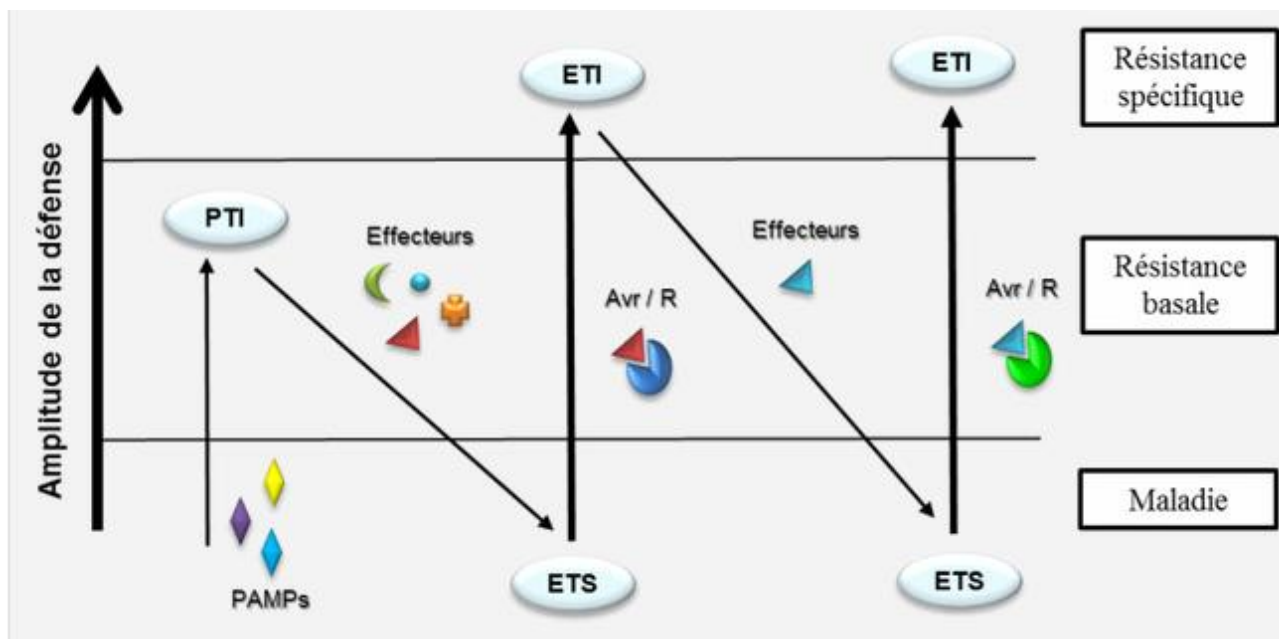


Figure 1.24. Schématisation du modèle « en zig-zag » proposé par Jones et Dangl, 2006. Lors de la première phase, la plante détecte les PAMP par les NBS-LRR et déclenche l'immunité innée. En réponse, l'agent phytopathogène injecte des effecteurs de type III (ET3) et entraîne la sensibilité de la plante (ETS). L'ETI est déclenchée si l'un des T3E est reconnu par un gène de résistance (R) de la plante. Lors de la dernière phase, les agents phytopathogènes diversifient leurs répertoires d'ET3 (pertes ou gain) pour à nouveau déclencher l'ETS. La co-évolution favorise l'apparition de nouveaux allèles R chez la plante pour déclencher à nouveau l'ETI en réponse. Il s'agit ainsi d'une véritable course à l'armement. (adapté d'après Jones et Dangl 2006, illustration capturée sur le site : <https://blog.vegenov.com/2014/01/plantes-defense-zig-zag/> consulté le 10/03/2021)



### 1.3.3. La course à l'armement

L'interaction entre les agents phytopathogènes et le système immunitaire des plantes conduit à une course à l'armement où les T3E sont particulièrement stratégiques. Les répertoires d'ET3 (ensemble des T3 sécrétés par une souche) des agents phytopathogènes évoluent pour éviter qu'ils ne soient détectés par la plante et ainsi conserver leur virulence. Cette idée de co-évolution entre les agents phytopathogènes et les plantes a été formalisée sous forme de modèle dit « en zig-zag » (Figure 1.24).

Le transfert horizontal, la mutation et la recombinaison sont les moteurs dans la diversification et l'agencement des répertoires d'ET3 des souches du complexe d'espèces *P. syringae*. Le transfert horizontal est notamment très dynamique pour ce groupe de bactéries et permet la patho-adaptation (Dillon et al. 2019a). Ainsi, beaucoup d'effecteurs sont gagnés ou perdus par transfert horizontal. Plus de 50 événements de pertes par transfert horizontal ont été estimés pour les familles d'effecteurs *HopAT/HopAV* et *HopAZ* par l'analyse de 494 génomes complets de souches du complexe d'espèces *P. syringae* (Dillon et al. 2019a). Ces pertes d'effecteurs par transfert horizontal pourraient permettre un gain de virulence sur un nouvel hôte dans le cas où l'effecteur perdu était impliqué dans le déclenchement de l'ETI sur l'hôte en question (Dillon et al. 2019a). Chez les bactéries du genre *Xanthomonas* responsables de la graisse commune du haricot, au moins 115 événements de transferts horizontaux successifs entre lignées phylogénétiquement distantes ont été identifiés et pourraient être responsables de la convergence pathologique sur le haricot (Chen et al. 2018). Plusieurs gènes codants des ET3, tels que *avrBs2*, *hrpF*, *xopA* et *xopAD*, ont ainsi été transférés entre lignées et pourraient être impliqués dans la spécificité d'hôte (Chen et al. 2018).

### 1.3.4. Les autres facteurs de virulence interférant avec les défenses de la plante

D'autres effecteurs sont impliqués dans la virulence des bactéries phytopathogènes et le contournement des défenses de l'hôte dont les phytotoxines, les enzymes de dégradation des parois, les hormones et les facteurs de transcription (Khan et al. 2018). La sécrétion de phytotoxines est particulièrement importante pour les souches du complexe d'espèces *P. syringae* phytopathogènes puisque certaines d'entre elles interfèrent directement avec le système de défense de la plante. La syringoline A et la coronatine sont des toxines qui induisent l'ouverture des stomates et facilitent la pénétration de la bactérie dans l'apoplasme (Schellenberg et al. 2010; Zheng et al. 2012). De plus, la syringoline A produite par certaines souches du complexe d'espèces *P. syringae* inhibe les activités du protéasome de la cellule eucaryote (Dudnik et al. 2014). L'inhibition du protéasome chez les plantes supprime ensuite l'action de différentes hormones impliquées dans le système de défense comme l'acide jasmonique et l'acide salicylique, ce qui contribue donc à l'agressivité de la bactérie phytopathogène (Dudnik et al. 2014).



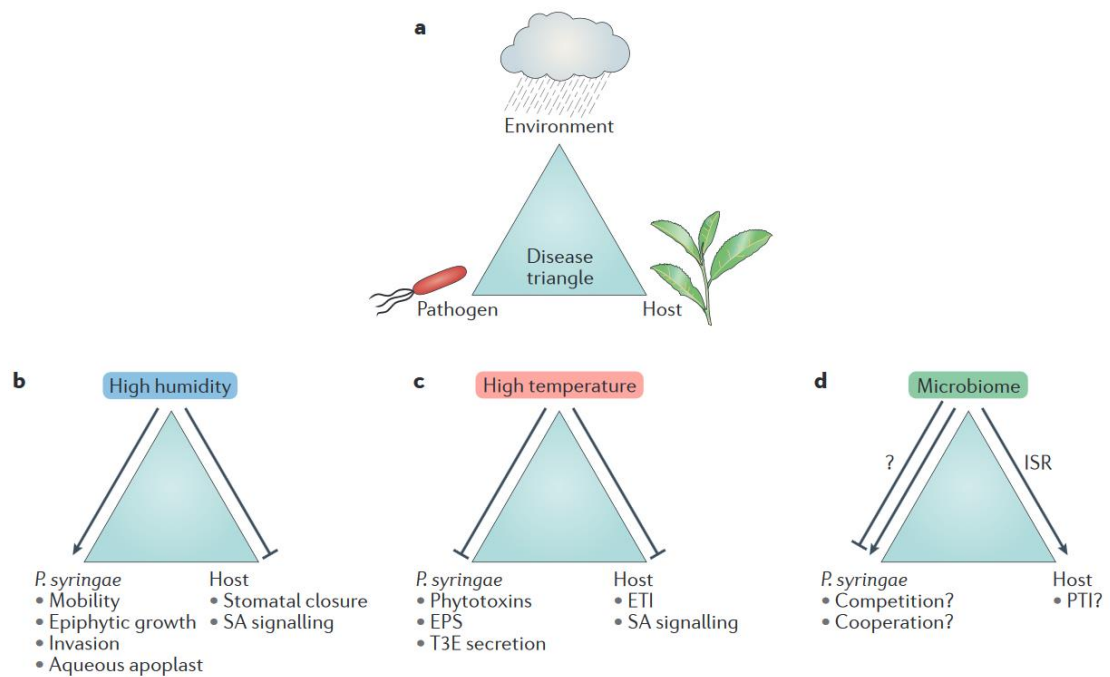


Figure 1.25. (a) Diagramme illustrant les interactions triangulaires plante-pathogène-environnement, connues sous le nom de « triangle de la maladie ». (b) Effets de l'humidité, (c) de la température et (d) du microbiome sur *P. syringae*, la plante et l'issue de la maladie. Les flèches normales indiquent des effets positifs et les flèches de blocage indiquent des effets négatifs. (d'après Xin et al. 2018)

### 1.3.5. Influence des conditions biotiques et abiotiques sur les maladies causées par les bactéries

En 1960, Stevens a formulé le concept du « triangle de maladie » en pathologie végétale. En plus d'un agent phytopathogène et d'un hôte sensible, des conditions environnementales favorables sont nécessaires pour conduire à une maladie (Figure 1.25). Trois paramètres environnementaux influencent particulièrement le développement des maladies bactériennes dont l'humidité, la température et la composition des communautés microbiennes associées à la plante (Xin et al. 2018).

Une humidité élevée est souvent un facteur corrélé avec les infections causées par les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* dans les parcelles agricoles (Hirano and Upper 2000; Xin et al. 2018). Ainsi, des conditions météorologiques telles que la rosée, le brouillard et la pluie favorisent la multiplication bactérienne et la colonisation épiphyte et endophyte de souches du complexe d'espèces *P. syringae* (Xin et al. 2018; Lamichhane et al. 2015). Une humidité relative de 95 % (après une averse pluvieuse) augmente la multiplication de la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (Xin et al. 2016). La pluie, lorsqu'elle est associée à d'autres facteurs comme le vent augmente également très fortement le nombre de lésions causées par *P. syringae* pv. *pisi* sur pois (Roberts 1997). Sur le plan physiologique des bactéries, une humidité relative élevée influence certains traits comme la formation d'agrégats bactériens sur les feuilles (Monier and Lindow 2004), la taille des cellules bactériennes et le transfert de gènes par conjugaison (Björklöf et al. 2000). Du côté de la plante, une humidité élevée supprime la fermeture des stomates induite par les bactéries (PTI) ce qui augmente la sensibilité d'*A. thaliana* à la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* (Xin et al. 2018; Panchal et al. 2016).

La température est un autre élément important pour le succès des infections causées par les souches du complexe d'espèces *P. syringae* car elle a un effet sur la synthèse des facteurs de virulence (Xin et al. 2018). Bien que les températures avoisinant les 28°C soient considérées comme optimales pour la croissance de nombreuses souches du complexe d'espèces *P. syringae in vitro*, ces températures ont un effet négatif sur la production des facteurs de virulence comme les phytotoxines, les sécrétions d'EPS et d'ET3 (Xin et al. 2018). Ainsi, une température de 28 à 30 °C supprime la production de certaines phytotoxines comme la coronatine par les pathovars *P. syringae* pv. *glycinea* et *P. syringae* pv. *tomato* (Weingart et al. 2004). La coronatine induit des chloroses sur de nombreuses plantes quand elle est pulvérisée et la température idéale pour sa production est de 18 °C (Gnanamanickam et al. 2011; Weingart et al. 2004). Cette température basse est également requise pour la production de la phaseolotoxine produite par les souches du pathovar *P. amygdali* pv. *phaseolicola* (Nüske and Fritsche 1989). Les températures élevées réduisent aussi l'expression de certains gènes comme ceux liés à la biosynthèse d'EPS comme l'alginate et le lévane (Hockett et al. 2013; Li et al. 2006). D'autre part, les températures trop chaudes impactent l'immunité des plantes (Xin et al. 2018; Huot et al. 2017). Ainsi, une température de 30 °C impacte négativement des voies de signalisation comme celle de l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène et l'acide abscissique chez *Arabidopsis* (Huot et al. 2017). Les voies de la PTI et de l'ETI répondent aussi différemment lors de variations de températures (Cheng et al. 2013). Ainsi les plantes activent préférentiellement l'ETI à des températures fraîches (10 à 23 °C) (Cheng et al. 2013).

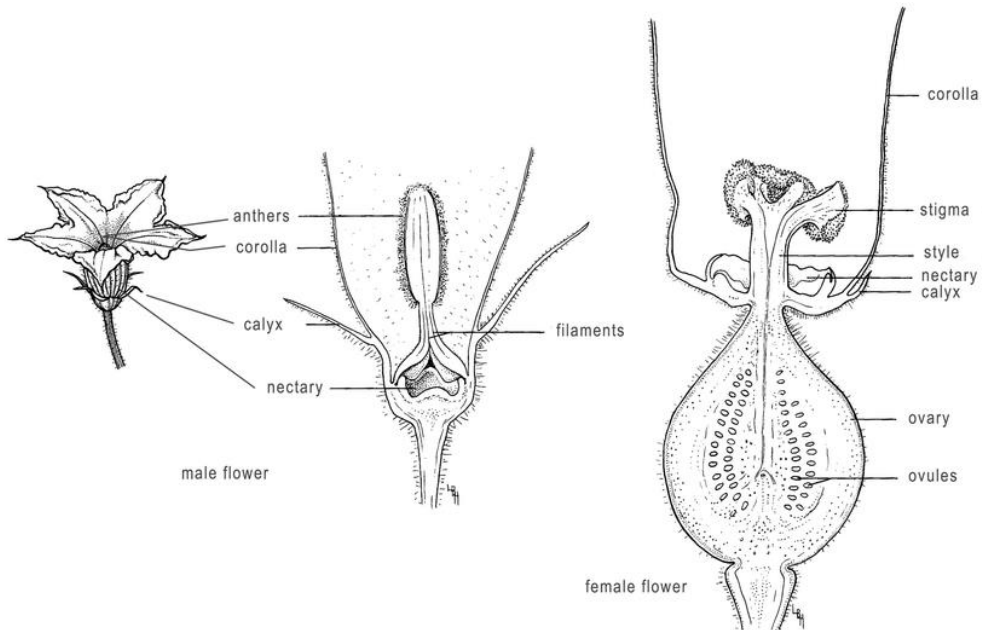


Figure 2.1. Schéma illustrant les pièces florales par une coupe longitudinale chez la courge. La fleur mâle est présentée à gauche et la fleur femelle à droite. (d'après McCormack 2010)

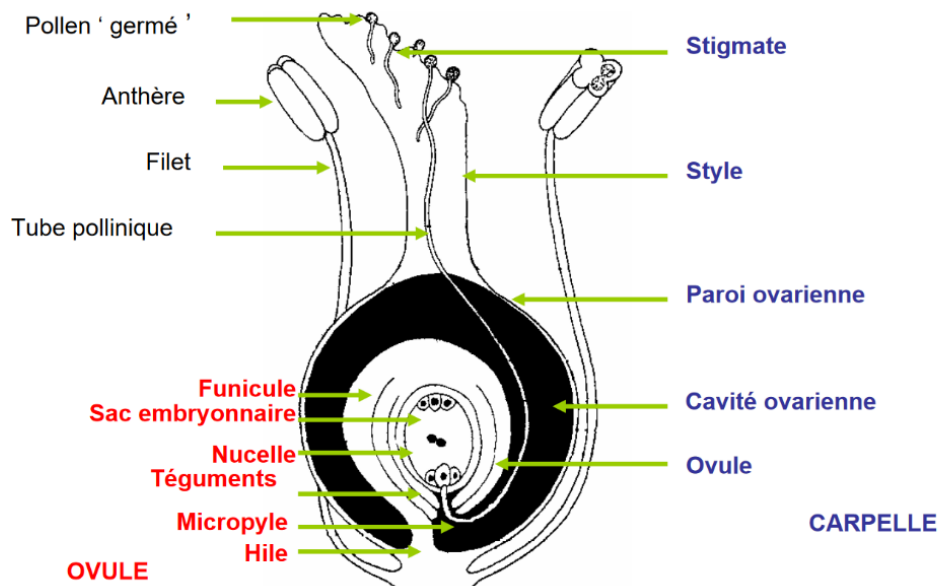


Figure 2.2. Schéma illustrant les compartiments de l'ovule et du carpelle au cours de la pollinisation. (d'après Douzet 2007)

Les bactéries phytopathogènes coexistent avec d'autres micro-organismes au sein du microbiote associé aux plantes. La présence de micro-organismes peut réduire ou inhiber l'agressivité d'un agent phytopathogène et/ou l'amplitude des réponses immunitaires des plantes, conduisant à des interactions différentes et à des issues de maladies différentes (Xin et al. 2018; Hacquard et al. 2017). Ainsi, certains micro-organismes inhibent le développement de souches pathogènes de *P. syringae* et par conséquent, ils empêchent ou réduisent l'incidence des maladies. Par exemple, certaines souches de *Pantoea agglomerans* empêchent le développement de la brûlure de l'épi d'orge causé par *P. syringae* pv. *syringae* dans les parcelles (Braun-Kiewnick et al. 2000). D'autres micro-organismes comme *P. putida*, *P. agglomerans* et *Erwinia persicina* sont capables de protéger les plantes des infections causées par la souche B728A de *P. syringae* en inhibant leur quorum-sensing (Dulla et al. 2010).

## 2. La transmission des bactéries à la semence et par la semence

### 2.1. La formation et la structure d'une graine

#### 2.1.1. La reproduction sexuée chez les angiospermes

Les plantes à fleurs, ou spermatophytes (spermato = semence, graine ; -phyte = plante), sont caractérisées, comme leur nom l'indique, par la formation de graines à l'issue de la reproduction sexuée. On les divise en deux catégories : les gymnospermes et angiospermes. Les angiospermes (angio = capsule ; sperme = semence, graine) sont les plantes à fleurs proprement dites et sont caractérisées par leurs ovules enclos dans un ovaire (Campbell 1995). À la suite de la fécondation, les ovules se transforment en graines qui sont enfermées dans un fruit résultant de la transformation de l'ovaire. La graine est le produit final de la reproduction sexuée chez les angiospermes.

A l'intérieur de la fleur se trouvent les organes reproducteurs : les étamines et les carpelles (Figure 2.1) (Campbell 1995). Une étamine est l'unité de l'appareil reproducteur mâle (androcée) se composant d'un filet et d'une anthère qui produit le pollen (Figure 2.2). Les gamétophytes mâles immatures correspondent aux grains de pollen en développement dans les anthères. Le carpelle est l'unité de l'appareil reproducteur femelle (gynécée) et contient trois parties : le stigmate, le style et l'ovaire. Les gamétophytes femelles correspondent au sac embryonnaire formé au sein du nucelle au cours de la maturation de l'ovule. La plupart des Angiospermes, dont certaines Cucurbitacées produisent des fleurs hermaphrodites mais la courgette (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) est une plante monoïque qui produit des fleurs femelles et fleurs mâles sur un même pied. La fleur femelle contient trois carpelles partiellement fusionnés à leur base et contenus dans un seul ovaire (Caracuel et al. 2012). La fleur mâle contient trois étamines qui sont soudées au niveau du filet et de l'anthère (Caracuel et al. 2012).

Lors de la pollinisation, le grain de pollen se colle sur le stigmate, s'hydrate et germe (Campbell 1995). Un tube pollinique est projeté et descend le long du carpelle pour rejoindre l'ovaire (Figure 2.2). A ce moment, le tube pollinique pénètre dans les téguments de l'ovule par le micropyle et dépose deux spermatozoïdes dans le sac embryonnaire (double fécondation).

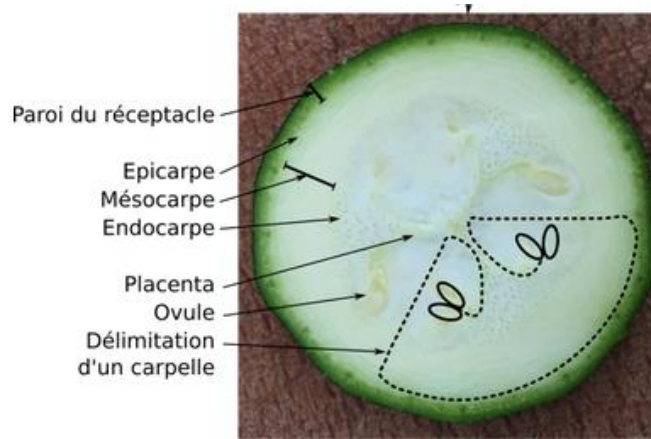


Figure 2.3. Coupe transversale d'une pépoune de *Cucurbita pepo*. (d'après <http://josephnicolassvt.fr/dissections-vegetales-en-lien-avec-la-reproduction/> consulté le 18/01/2021)



Figure 2.4. Diversité des graines de Cucurbitacées en termes de taille, couleur et forme. (d'après Adeyo et al. 2019)

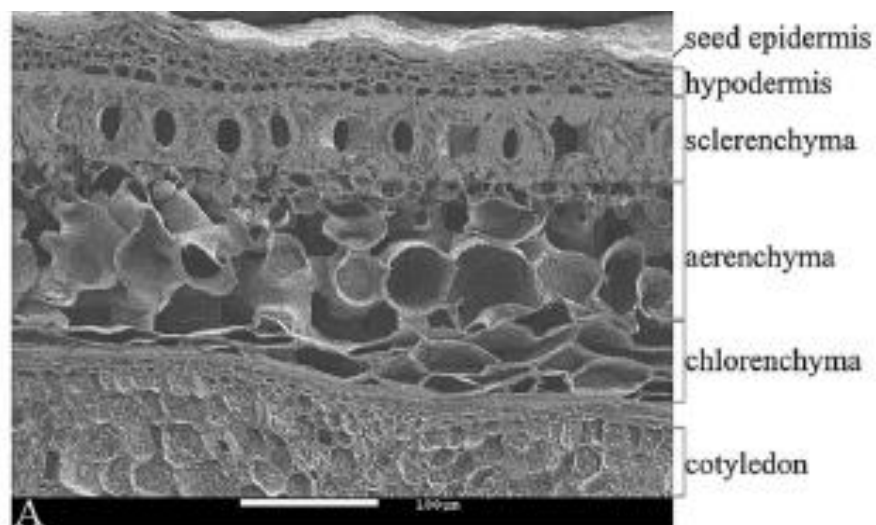


Figure 2.5. Coupe histologique du testa d'une graine de courgette observée au microscope électronique à balayage. (d'après Murovec et al. 2012)



### 2.1.2. La formation des graines dans le fruit

Après fécondation, le carpelle se transforme et devient un fruit qui protège les graines (Douzet 2007). Les Cucurbitacées produisent des fruits charnus de type baie. Le fruit de la plupart des Cucurbitacées est appelé péponide et il est composée de différentes couches cellulaires parenchymateuses dont un épicarpe, un mésocarpe et un endocarpe. Les ovules fécondés sont englobés dans le placenta du fruit (Figure 2.3) (Douzet 2007).

L'ovule fécondé devient une graine constituée d'un embryon, d'un albumen et d'un testa. Le zygote donne un à deux cotylédons et un embryon ( $2n$ ) composé d'une tigelle et d'une radicule (Campbell 1995). Le noyau triploïde au centre du sac embryonnaire se divise plusieurs fois pour former l'albumen ( $3n$ ) constituant un organe de réserve. Le tégument refermant l'ovule forme une enveloppe protectrice de l'embryon appelé spermoderme ou testa. Chez la courgette, le testa de la graine se développe uniquement à partir du tégument externe de l'ovule tandis que le tégument interne dégénère rapidement après pollinisation (Teppner 2004). Lors du développement de la graine, les téguments sont vascularisés et accumulent les éléments nutritifs nécessaires à l'embryon (Van Dongen et al. 2003). Le funicule rattache la graine au placenta de la plante-mère et transmet les éléments nutritifs. Le hile de la graine correspondra à la cicatrice de cette zone d'insertion.

Lors des derniers stades de maturation, la plupart des graines se déshydratent jusqu'à une teneur en eau de 5 à 15 % de leur masse. Ces graines sont appelées orthodoxes et sont tolérantes à la dessiccation (Finkelstein et al. 2008). Les graines de Cucurbitacées sont orthodoxes et elles ont la particularité de se développer en milieu humide jusqu'à atteindre leur maturité (Nerson 2007). Ainsi, la dessiccation n'est pas une nécessité stricte pour permettre la germination de ces graines. Lors de la récolte des graines de citrouille, celle-ci ont une teneur en eau comprise entre 30 et 35 % (Kocabiyik et al. 2009). Pour être commercialisées, les graines de courges sont séchées et leur teneur en eau est de 5 à 6 % (Kocabiyik et al. 2009).

### 2.1.3. Structure de la graine mature de Cucurbitacées

Les graines de Cucurbitacées sont morphologiquement très diverses en termes de taille, de forme et de couleur (Figure 2.4) (Adeyemo et al. 2019 ; Heneidak and Khalik 2015). Les critères morphologiques des graines peuvent notamment être utilisés pour différencier les taxons des Cucurbitacées (Heneidak and Khalik 2015). Les graines de courgette (*C. pepo* subsp. *pepo*) mesurent entre 8 et 26 mm de long et sont blanchâtres, plates et de forme ovale. Elles présentent un renflement marginal plus ou moins prononcé (Murovec et al. 2012).

Les Cucurbitacées produisent des graines à périspermes contenant un embryon, deux cotylédons et entourés par un testa (Maynard 2007). A maturité, les cotylédons des graines de Cucurbitacées sont riches en lipides et en protéines (Kreft et al. 2009; Jacks et al. 1972). Le testa de la courgette est composé de cinq couches caractéristiques : l'épiderme, l'hypoderme, le sclérenchyme, l'aérenchyme et le chlorenchyme (Figure 2.5) (Teppner 2004, Murovec et al. 2012). L'épiderme se compose de cellules radialement allongées en forme de bâtonnets épaissis riches en callose (Teppner 2004). L'hypoderme est constitué de petites cellules compactes et denses. Le sclérenchyme présente un à deux étages de cellules isodiamétriques imbriquées les unes dans les autres (Teppner 2004).

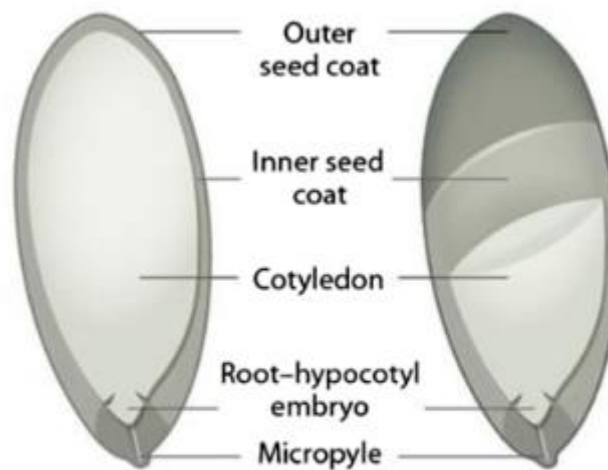


Figure 2.6. Schématisation d'une graine de melon présentant les différents types de tissus et la localisation du micropyle. (adapté d'après Glassner et al. 2018)

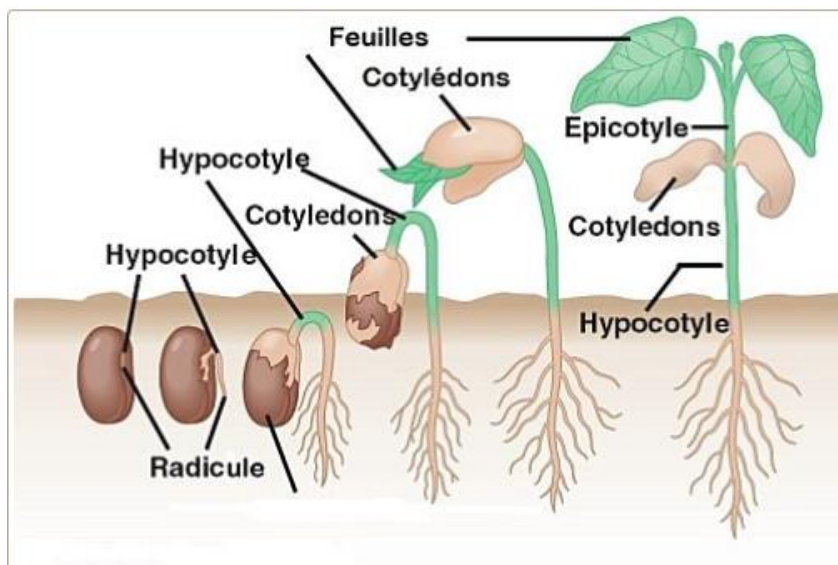


Figure 2.7. Étapes de la germination épigée (adapté d'après Judd et al. 2011)

L'hypoderme, le sclérenchyme et l'aérenchyme sont des tissus lignifiés chez les Cucurbitacées (Lelley et al. 2009; Kreft et al. 2009). Le sclérenchyme contient une à trois couches de cellules aux parois épaisses avec des grands espaces intercellulaires. Ces cellules du sclérenchyme sont appelées astérosclérides et elles sont ramifiées (Murovec et al. 2012). Le chlorenchyme est la couche la plus interne de l'enveloppe de la graine et il est constitué de nombreux espaces intercellulaires (Teppner 2004).

#### 2.1.4. Sortie de la dormance et germination de la graine

Le terme dormance fait référence à un état d'une plante entière ou d'un organe végétal généralement caractérisé par un arrêt temporaire de la croissance et du développement (Hilhorst 2018). La dormance augmente les chances que la germination de la graine se produise à un moment et dans un endroit favorable au développement de la plantule et elle est sous contrôle de signaux génétiques et environnementaux (Skubacz and Daszkowska-Golec 2017; Vleeshouwers et al. 1995). La période de dormance des graines peut varier de quelques jours à plusieurs dizaines d'années suivant l'espèce végétale et les conditions extérieures. Chez le melon par exemple, la durée et l'intensité de la dormance dépend des cultivars et des conditions environnementales qui ont eu lieu lors du développement des graines dans la plante-mère (Nerson 2007).

La germination de la graine orthodoxe marque la reprise de la croissance et du développement interrompus par la dormance. Selon les espèces végétales, différents paramètres ou processus sont nécessaires pour lever la dormance et induire la germination, tels que l'humidité, la température ou la luminosité. *Cucumis melo* var. *agretis* est une Cucurbitacée invasive en Asie provenant d'Afrique qui se différencie du melon cultivé par la petite taille des plantes et des fruits. Pour cette variété, les graines sont peu sensibles aux températures et à la luminosité mais elles sont très sensibles au potentiel osmotique du sol (Xu et al. 2017). Pour d'autres espèces de Cucurbitacées, la température est un facteur clé pour la germination, ainsi le concombre et la pastèque ne germent pas en dessous de 17 à 19°C (Wilcox and Pfeiffer 1990). La germination débute généralement par l'imbibition de la graine et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire (Bentsink and Koornneef 2008 ; Bewley and Black 1994). Trois étapes vont se dérouler successivement. Lors de l'imbibition, l'eau pénètre dans les tissus du parenchyme du testa à la périphérie des cotylédons (Bewley and Black 1994; Kestring et al. 2009). Les voies d'entrée de l'eau dans la graine ont longtemps été débattues et sont variables selon les espèces végétales (Smýkal et al. 2014). Les ouvertures présentes sur le testa servent de points d'entrée pour l'eau et correspondent souvent à des entrées naturelles créées lors du développement de la graine comme le hile ou le micropyle (Figure 2.6) (Smýkal et al. 2014). Chez les Cucurbitacées, les deux types de germination épigée et hypogée sont rencontrés mais la germination épigée est la plus commune (Figure 2.7) (Maynard 2007; Schaefer and Renner 2010). La germination épigée se caractérise par un hypocotyle qui s'incurve et croît hors du sol. L'épicotyle s'allonge ensuite lorsque l'hypocotyle se sera redressé. Lors de la germination épigée, les cotylédons et l'enveloppe de la graine sont rapidement poussés hors du sol. Par conséquent, les cotylédons ne sont pas en contact prolongé avec les micro-organismes du sol qui sont des colonisateurs potentiels.



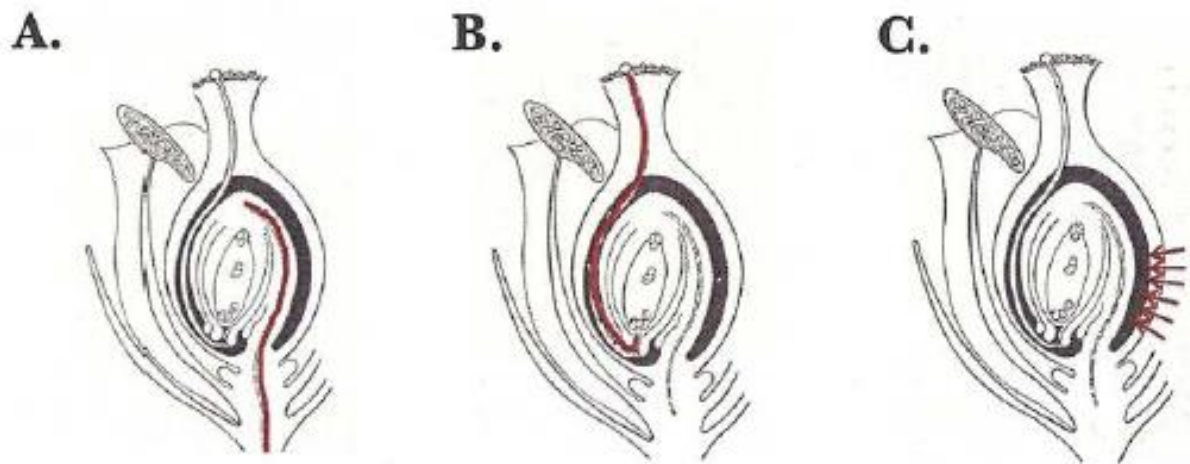


Figure 2.8. Voies de transmission empruntées par les bactéries phytopathogènes pour contaminer les graines (A) voie vasculaire (B) voie florale (C) voie par contact. (D'après Maude 1996)

## 2.2. Les voies de transmission des bactéries aux graines

La graine est un moyen de dissémination majeur des agents phytopathogènes. Trois voies de transmission des bactéries aux graines ont été décrites: la voie florale, la voie vasculaire et la voie par contact (Figure 2.8) (Maude 1996). La contamination des graines peut survenir très précocement lors de sa formation (voie florale et vasculaire) ou parfois plus tardivement (voie par contact).

### 2.2.1. La voie florale

#### a) L'anthosphère

L'anthosphère désigne la fleur et l'environnement soumis à son influence, ce qui constitue un habitat pour de nombreux micro-organismes (Arunkumar et al. 2019). Les fleurs sont composées de nombreux micro-habitats comme les pétales, les sépales, les carpelles, le nectar, le pistil et le pollen. Une grande diversité de microbes colonise les fleurs dont certains sont spécifiques à certains micro-habitats et d'autres sont très communs (Alvarez-Pérez et al. 2012; Arunkumar et al. 2019). Les genres *Pseudomonas* et *Acinetobacter* sont communément détectés sur les fleurs (Alekklett et al. 2014; Morris et al. 2020). Pour le genre *Pseudomonas*, des bactéries phytopathogènes comme *P. syringae* pv. *actinidiae*, *P. viridiflava*, *P. syringae* pv. *syringae* sont associées aux fleurs de kiwi (Purahong et al. 2018; Stefani and Giovanrdi 2011). Toutefois, d'autres bactéries associées aux fleurs et appartenant au genre *Pseudomonas* ne sont pas pathogènes. Sur pommier et poirier, *P. fluorescens* colonise efficacement les fleurs et peut servir d'agent de bio contrôle contre *E. amylovora* (Lindow and Suslow 2003). Sur citrouille, des souches du complexe d'espèces *P. syringae* et *P. viridiflava* sont associées aux fleurs (Fürnkranz et al. 2012).

La fleur est un environnement nutritionnel riche pour les microbes, ce qui leur facilite la colonisation de cet habitat. Le stigmate, le nectar, le pollen et le style des fleurs exsudent une diversité de composés comme des polysaccharides, des protéines et des lipides. Chez la pastèque, les exsudats du stigmate contiennent des polysaccharides, des sucres (fructose, glucose et saccharose), et des acides gras (Wijesinghe et al. 2020). Le pollen est riche en glucides, en protéines, en enzymes, en acides gras, en minéraux et en vitamines (Campos et al. 1997). Enfin, le style de la fleur contient une matrice extracellulaire dans laquelle progresse le tube pollinique, qui contient de nombreux nutriments dont des sucres libres (mono ou disaccharides), des polysaccharides, des acides aminés, des protéines, des glycoprotéines, des protéoglycanes utiles à la germination du pollen, sa reconnaissance et son orientation (Sanchez 2004). Les différentes sources nutritionnelles disponibles dans les fleurs fournissent l'énergie pour la croissance et la multiplication de bactéries comme *P. syringae* pv. *actinidiae* ou *E. amylovora* (Donati et al. 2020; Klee et al. 2019).

Une fleur venant de s'ouvrir n'est pas stérile et plusieurs types de micro-organismes peuvent être présents sur certains organes (pétales, pollen, nectar, sépales et stigmate) comme des bactéries et des champignons (Vannette 2020). Ces micro-organismes peuvent être trouvés avant l'anthèse sur le bourgeon floral ou dans le nectar (Shade et al. 2013; von Arx et al. 2019). Par exemple des bactéries des genres *Micrococcus* et *Enterobacter* colonisent le nectar de fleurs de Fuchsia lorsque les fleurs sont ensachées (Morris et al. 2020).

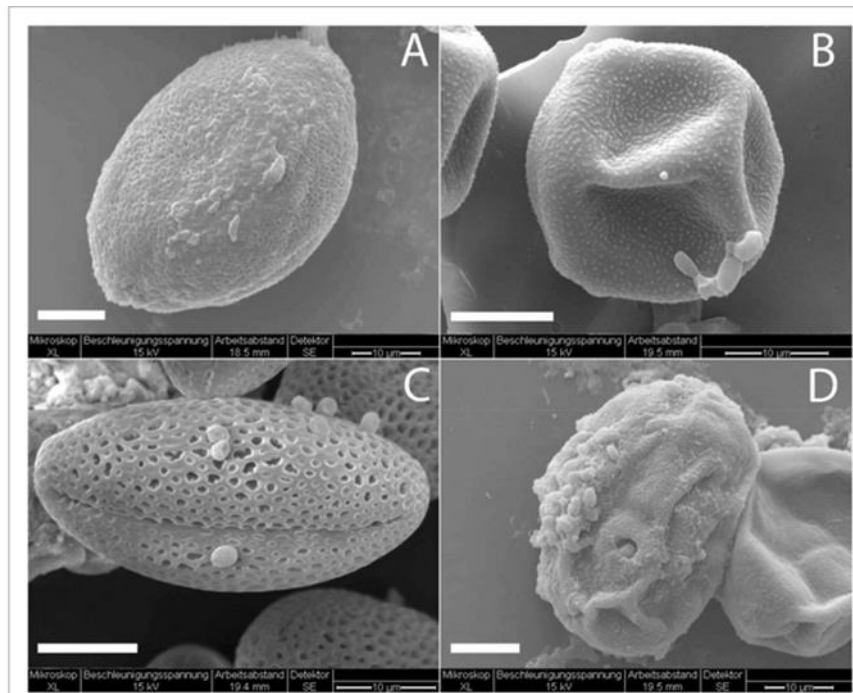


Figure 2.9 Colonisation bactérienne de différents grains de pollen au microscope électronique à balayage (A) Crocus d'automne, (B) Bouleau, (C) colza, (D) seigle. (d'après Manirajan et al. 2016)

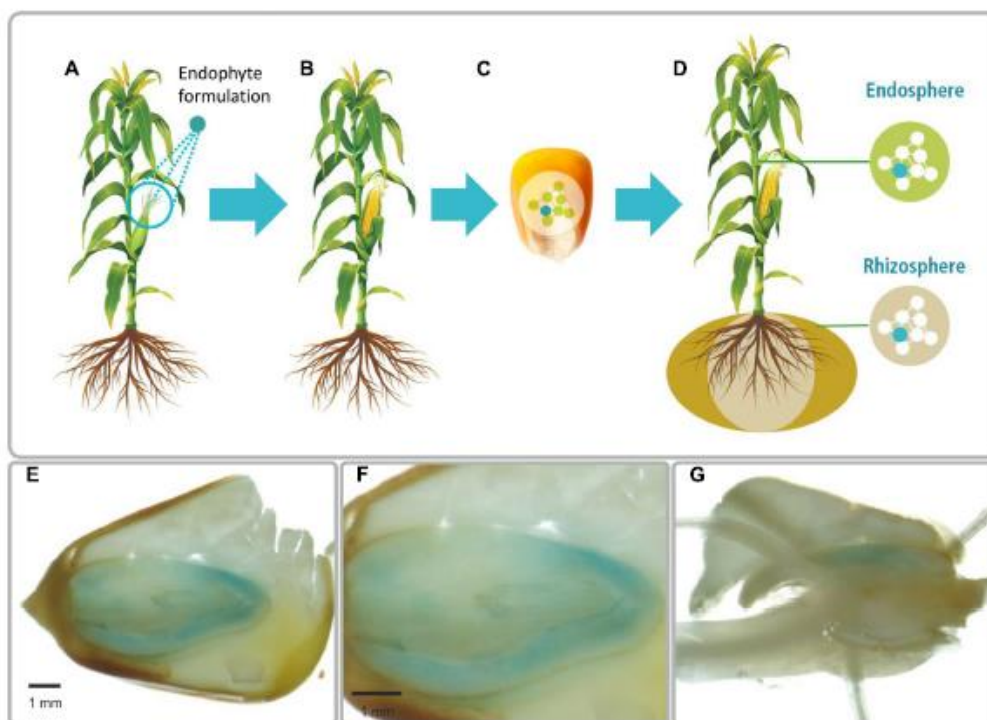


Figure 2.10. Transmission de *Paraburkholderia phytofirmans* (agent de bio-contrôle) par la voie florale aux graines de maïs (souche PsJN::GusA). (A) Les fleurs des plantes sont pulvérisées avec une suspension bactérienne. (B) Les bactéries bactériennes et les graines en développement. (C) Les graines à maturité sont collectées (D) Les bactéries endophytes prolifèrent pendant la germination et colonisent les plantules. (E et F) Colonisation de PsJN::GusA (en bleu) dans l'embryon de la graine. (G) Colonisation de PsJN::GusA lors de la germination. (d'après Mitter et al. 2017)

Ces microbes proviennent souvent de l'environnement autour de la fleur comme l'air, le sol, l'eau ou des tissus végétatifs proches (Vannette 2020). Les visiteurs des fleurs comme les insectes pollinisateurs ou florivores contribuent également à l'apport de microbes sur les fleurs (Alekklett et al. 2014). Il a été montré qu'un insecte (dont les abeilles) abritait en moyenne  $10^5$  cellules bactériennes à sa surface. Ces bactéries sont susceptibles d'être déposées sur les fleurs lorsque les insectes les visitent (Prado et al. 2020; Ushio et al. 2015). Les abeilles sont des vecteurs de certaines bactéries phytopathogènes comme des bactéries du pathovar *P. syringae* pv. *syringae*. Il a également été montré que ces bactéries peuvent survivre jusqu'à neuf jours sur les abeilles et jusqu'à 14 jours dans les ruches (Pattemore et al. 2014). Le pollen peut contenir différents microbes en surface et ceux-ci peuvent être acheminés sur des plantes de la même espèce ou non (Figure 2.7) (Fürnkranz et al. 2012; Manirajan et al. 2016). Le pollen est un moyen de dissémination de bactéries phytopathogènes présentes à sa surface. Par exemple, le pollen de kiwi peut contenir et disséminer la bactérie *P. syringae* pv. *actinidiae* responsable du chancre du kiwi (Donati et al. 2018 ; Stefani and Giovanardi 2011). Le pollen est également impliqué dans la dissémination d'autres bactéries phytopathogènes comme *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Giovanardi et al. 2016) et *E. amylovora* (Cellini et al. 2019)

### b) La transmission aux graines par la voie florale

A partir de l'infection des pièces florales, les bactéries peuvent utiliser la voie florale pour se transmettre aux graines (Maude 1996) (figure 2.8.b). Le style est une ouverture naturelle par laquelle les bactéries pénètrent pour atteindre l'ovaire à partir du stigmate (Ngugi and Scherm 2006; Truyens et al. 2015). *A. citrulli* est un exemple de bactérie phytopathogène qui se transmet aux graines de pastèque par cette voie. La bactérie progresse dans le style à la périphérie du tube pollinique et dans les espaces intercellulaires du style sans causer de symptômes et parvient à s'introduire dans les graines en formation (Dutta et al. 2015). D'autres exemples de bactéries phytopathogènes se transmettent aux graines par la voie florale comme *X. citri* pv. *fuscans* chez le haricot (Darrasse et al. 2018; Darsonval et al. 2008, 2009), *X. campestris* pv. *campestris* chez le chou (Van Der Wolf et al. 2008) ou *Pseudomonas corrugata* sur la tomate (Cirvilleri et al. 2008).

La voie florale est considérée comme une voie permissive car elle permet la transmission de nombreux microbes phytopathogènes, bénéfiques ou d'agents de biocontrôle (Figure 2.10) (Barret et al. 2016a; Dutta et al. 2015; Fessehaie and Walcott 2005; Mitter et al. 2017). Chez le radis 36 % des taxons bactériens détectés dans les graines étaient aussi associés aux bourgeons, aux fleurs et aux fruits suggérant que ces divers taxons ont été transmis aux graines par la voie florale (Chesneau et al. 2020). D'autres travaux supportent cette idée et démontrent la transmission d'agents phytopathogènes en situation incompatible par la voie florale (Darsonval et al. 2008; Darrasse et al. 2010; Dutta et al. 2014a). Ainsi, il a été montré que *X. campestris* pv. *campestris*, pathogène des Brassicacées, peut se transmettre aux graines de haricot et de *Medicago* en situation incompatible sans développement de symptômes (Darrasse et al. 2010; Terrasson et al. 2015). Des travaux similaires ont été conduits sur tomate, poivron, soja et pastèque et montrent la transmission aux semences en situation incompatible de cinq bactéries phytopathogènes (Dutta et al. 2014a). Par exemple, sur pastèque, les bactéries phytopathogènes non-compatibles *X. euvesicatoria*, *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* et *P. syringae* pv. *glycinea* sont retrouvées dans les lots de semences produits et sont en mesure de coloniser les plantules de façon épiphyte (Dutta et al. 2014a).



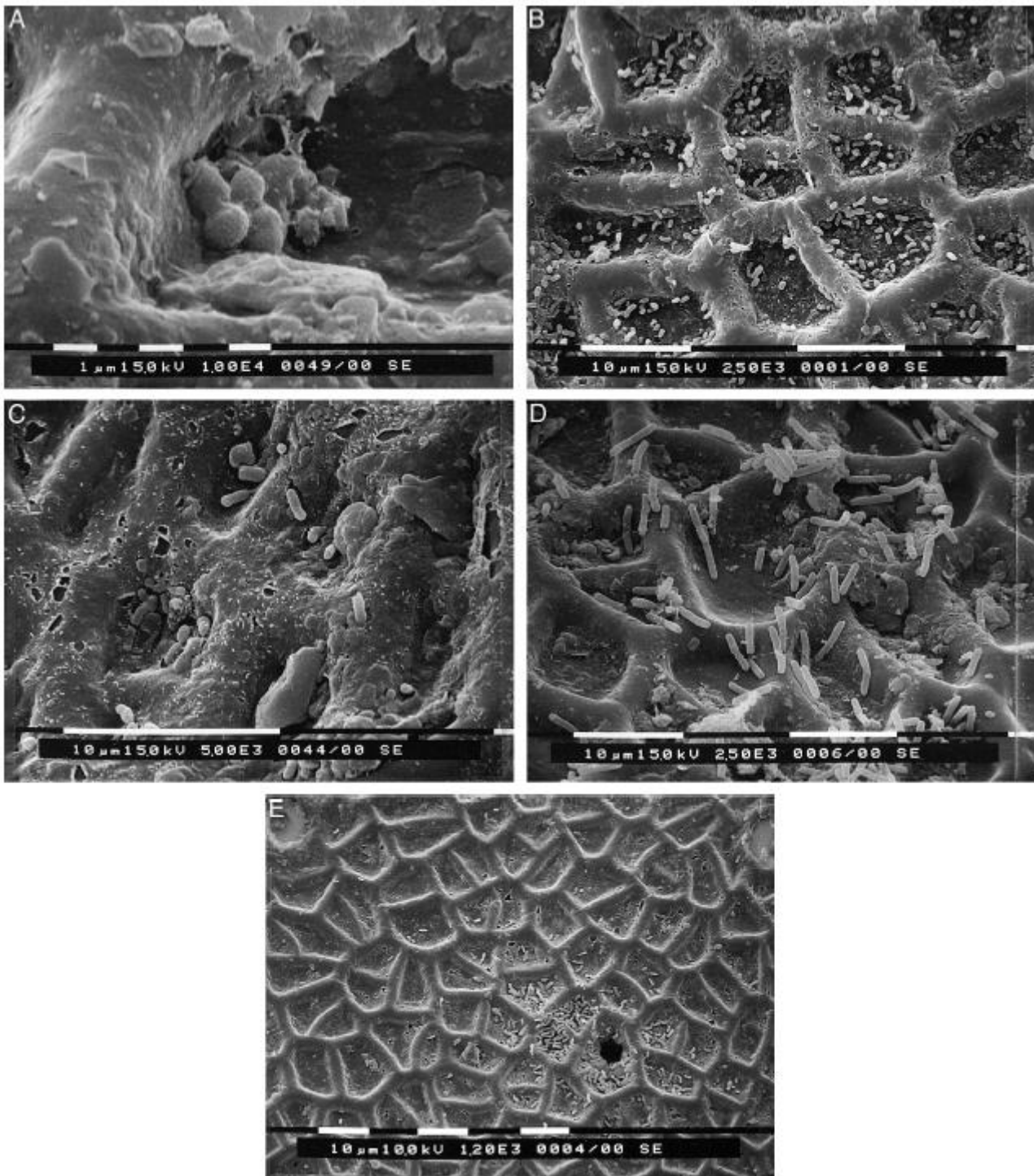


Figure 2.11. Adhésion de bactéries à la surface d'un fruit de concombre. (A) *Staphylococcus aureus* (B) *Lactobacillus plantarum* (C) *Listeria monocytogenes* (D) *Salmonella* Typhimurium. (E) *Enterobacter aerogenes*. Barre = 10  $\mu$ m. (d'après Reina et al. 2002)

Certains mécanismes moléculaires sont décrits pour les agents phytopathogènes transmis par la voie florale, notamment l'implication du SST3. Sur le haricot, la souche CFBP4834-R (*X. citri* pv. *fuscans*) se transmet aux graines à une forte fréquence (0.9) tandis que des souches mutantes dans le gène de régulation *hrp* et dans les structuraux *hrp* se transmettent aux graines à faible fréquence (de 0,04 à 0,2 selon le type de mutation) (Darsonval et al. 2008).

## 2.2.2. La voie par contact

### a) La carposphère

La carposphère désigne le fruit et l'environnement soumis à son influence, ce qui constitue un habitat pour de nombreux microorganismes (Heywood 1969). Les tissus externes et internes du fruit peuvent être colonisés par de nombreux taxons microbiens qui peuvent différer selon les tissus observés. Sur la tomate, le péricarpe est majoritairement colonisé par des Enterobactéries, le placenta par des Actinobactéries et des *Weissella* sont retrouvées dans les parenchymes du tissu loculaire (Dong et al. 2019). A la surface des fruits, les communautés bactériennes diffèrent selon les variétés de fruits et de légumes (Leff and Fierer 2013). Ainsi, les tomates et les concombres contiennent beaucoup de *Pseudomonaceae* à leur surface alors que les fraises n'en contiennent pratiquement pas (Allard et al. 2020 ; Leff et Fierer 2013). Des bactéries phytopathogènes colonisent la surface des fruits. Par exemple, *P. syringae* pv. *tomato* colonise la surface de l'ovaire notamment au niveau des trichomes glandulaires et non-glandulaires (Getz et al. 1983). Après l'anthèse, les trichomes de la tomate cassent à leur base et ce qui crée des voies d'entrée pour la bactérie (Getz et al. 1983).

Des bactéries peuvent coloniser et adhérer la surface des fruits. L'adhésion des bactéries (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* et *Listeria monocytogens*) à la surface du concombre dépend de la température, de l'espèce, de la surface plus ou moins cireuse du concombre et du temps d'exposition (Figure 2.11) (Reina et al. 2002). La capacité d'attache des bactéries aux fruits est liée à différents facteurs comme l'hydrophobicité, la production de surfactant et à la sécrétion d'EPS (Fernandes et al. 2014; Reina et al. 2002; Rossez et al. 2014). Certaines bactéries phytopathogènes sont capables de se multiplier et d'induire des symptômes sur les fruits. *A. citrulli* cause des taches bactériennes sur pastèque, *P. syringae* pv. *tomato* cause des taches bactériennes sur la tomate et *P. amygdali* pv. *phaseolicola* cause des lésions grasses sur gousses de haricot (Burdman and Walcott 2012; Preston 2000; Taylor et al. 1979a). Pour ces bactéries, la colonisation du fruit et la capacité à induire des symptômes sur fruits dépend de facteurs de virulence des bactéries phytopathogènes. Par exemple, pour *A. citrulli* plusieurs facteurs de virulence sont impliqués dans la colonisation et la pathogénicité de cette bactérie dont le SST3, 11 ET3 putatifs, les enzymes dégradant les parois cellulaires sécrétées par le système de sécrétion de type II (endoglucanase, xylanase et pectate lyase), les pili de type IV, le flagelle et le quorum-sensing (Burdman and Walcott 2012).

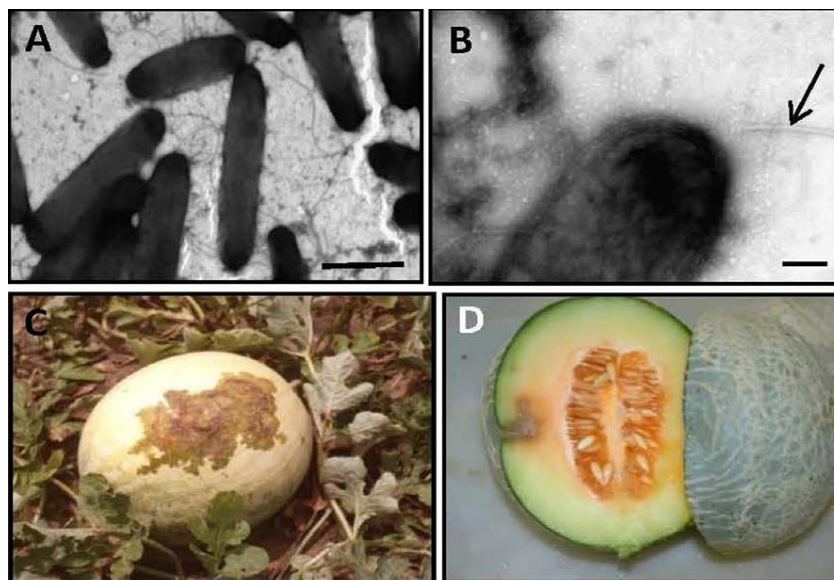


Figure 2.12. La tache bactérienne causée par *A. citrulli* sur fruits de pastèque. (A) Cellules d'*A. citrulli* au microscope électronique (B) La flèche indique un flagelle polaire de la bactérie (C et D) Symptômes typiques de la maladie sur fruit. Sur la photo (D), il est remarquable d'observer la progression de la lésion dans le fruit jusqu'aux graines. (adapté d'après Burdman and Walcott 2012)

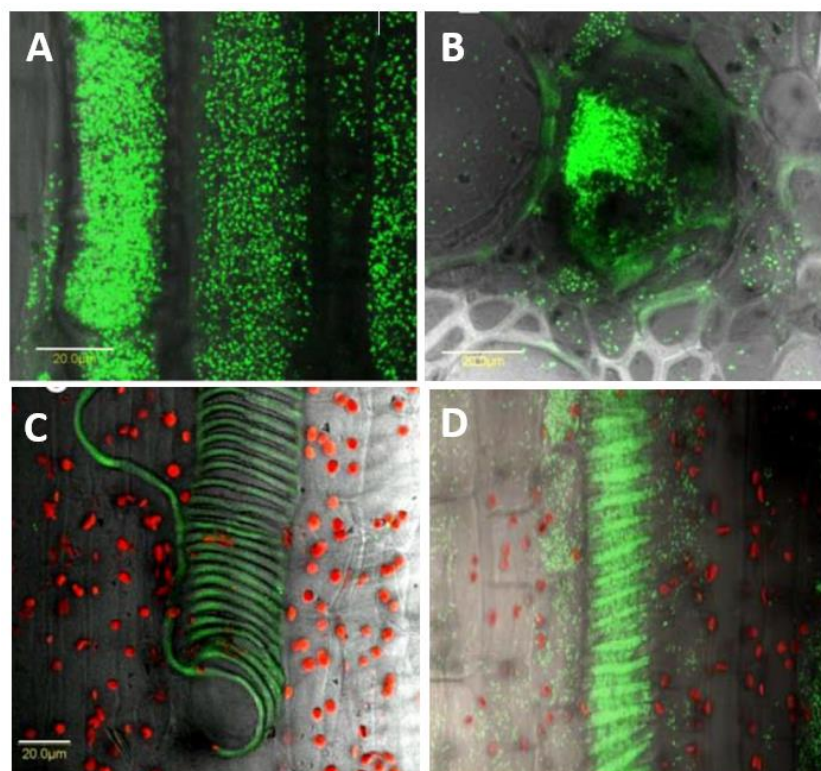


Figure 2.13. Colonisation vasculaire de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* marqué avec une protéine fluorescente verte (GFP). (A) Invasion bactérienne du lumen des vaisseaux vasculaires (B) Observation d'un biofilm bactérien attaché à la paroi du xylème (C) Dégradation d'un vaisseau (D) colonisation des tissus parenchymateux adjacent au xylème par les bactéries. (d'après Chalupowicz et al. 2011)



## b) La transmission aux graines par la voie par contact

La voie par contact permet une contamination des graines à partir d'un inoculum présent sur un fruit symptomatique (Maude 1996) (figure 2.8.c). La voie de contamination par contact est courante pour les bactéries phytopathogènes à partir de symptômes sur fruits. Les bactéries *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sur le haricot, *P. syringae* pv. *tomato* sur tomate et *P. amygdali* pv. *phaseolicola* sur haricot peuvent se transmettre aux graines par cette voie (Akhavan et al. 2013; Preston 2000; Taylor et al. 1979a). Chez les Cucurbitacées, *A. citrullii* contamine les graines de pastèques par cette voie à partir de symptômes (Figure 2.12) (Dutta et al. 2012a; Frankle et al. 1993). Cette bactérie pénètre le péricarpe du fruit *via* les stomates jusqu'à deux ou trois semaines après l'anthèse (Frankle et al. 1993). Après cette période, les stomates présents à la surface de la pastèque sont couverts d'une couche cireuse et les bactéries n'arrivent plus à emprunter ces ouvertures naturelles (Frankle et al. 1993).

La voie par contact comprend également la transmission des bactéries aux graines après récolte suite à la mise en contact des graines avec des débris contaminés comme par exemple au moment du battage. Chez la pastèque, les étapes d'extraction, de fermentation et de séchage des graines peuvent favoriser les contaminations par *A. citrullii* (Lovic and Hopkins 2003). Chez le haricot, les travaux de Taylor montrent une contamination superficielle des par *P. amygdali* pv. *phaseolicola* suite au battage avec des pailles contaminées (Taylor et al. 1979a).

### 2.2.3. La voie vasculaire

#### a) La colonisation vasculaire

Certaines bactéries, dont des agents phytopathogènes, peuvent coloniser le xylème, s'y multiplier et se propager ainsi dans toute la plante (Figure 2.13) (Afzal et al. 2019; Green et al. 2010; Senthil-Kumar and Mysore 2013; Singh and Mathur 2004). Les agents phytopathogènes vasculaires peuvent pénétrer dans le xylème par différents moyens. Par exemple *X. fastidiosa* est directement injectée par un insecte vecteur piqueur-suceur de sève dans les vaisseaux conducteurs de la plante lorsqu'il se nourrit (Chatterjee et al. 2008). *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* est également transmise par un insecte vecteur dans le xylème ou dans l'apoplasme du maïs (Duong et al. 2018 ; Roper 2011). Cette bactérie colonise activement le xylème grâce à des enzymes (endoglucanase et xylanase) qui dégradent les polysaccharides au niveau des membranes des ponctuations (pit) des cellules afin de se propager dans différents vaisseaux du xylème communiquant (Figure 2.14) (Mohammadi et al. 2012). Cette bactérie forme aussi de nombreux biofilms qui pourraient rompre les membranes cellulaires à proximité des vaisseaux conducteurs et ainsi permettre la colonisation du xylème (Duong et al. 2018 ; Roper 2011). Chez la bactérie *X. fastidiosa*, les enzymes dégradant les membranes des ponctuations des vaisseaux ont également été mises en évidence et correspondent à des polygalacturonases, des endoglucanases, des xylanases et des xylosidases (Roper et al. 2007). D'autres bactéries comme *X. campestris* pv. *campestris* peuvent accéder au xylème du chou facilement après une colonisation des hydathodes (Cerutti et al. 2017). En effet, les hydathodes forment des cavités avec en dessous un épithème composé de parenchymes très vascularisés et offrant une connexion directe aux vaisseaux du xylème (Cerutti et al. 2017).



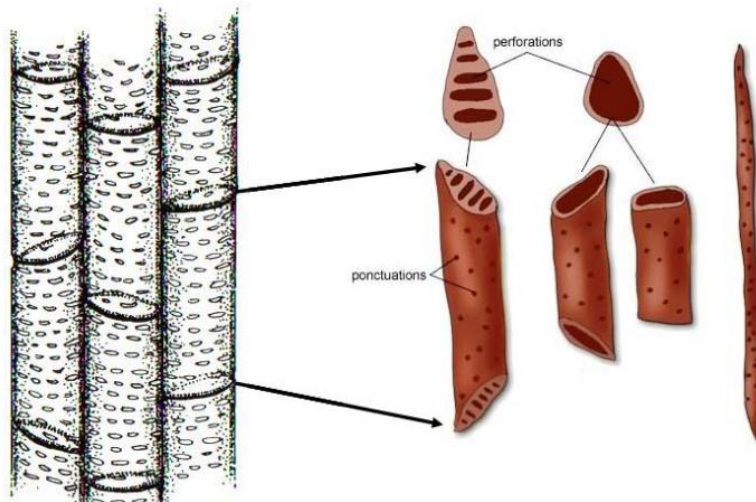


Figure 2.14. Structure des vaisseaux du xylème. Les vaisseaux (à gauche) sont constitués par des éléments des vaisseaux (à droite) communiquant entre eux par des perforations. Les vaisseaux entre eux par les ponctuations. (d'après Awad 2011)

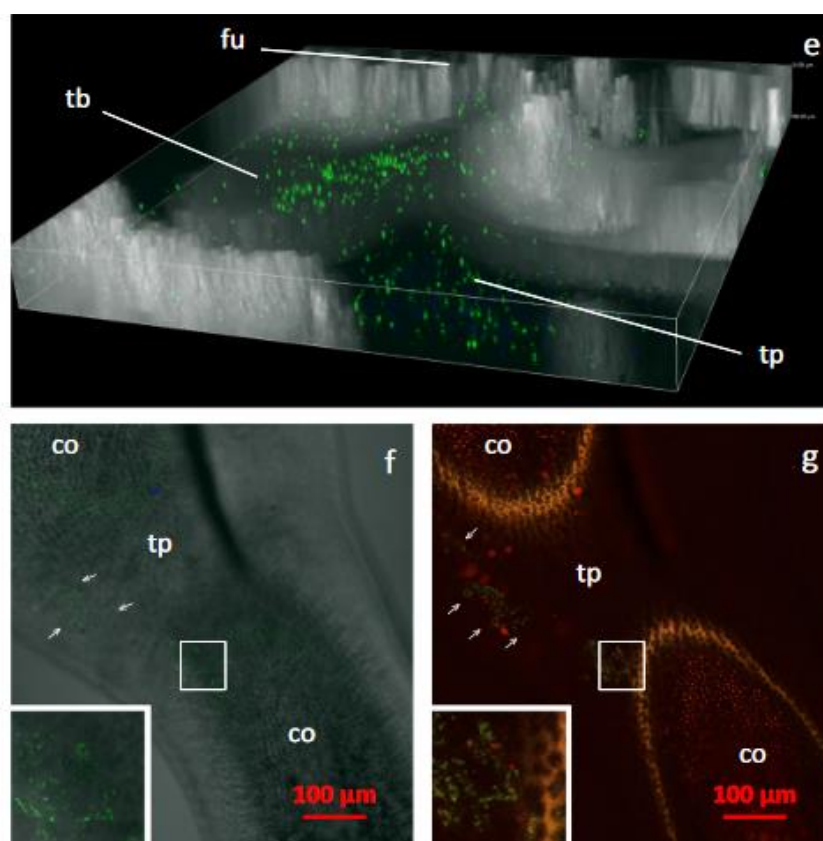


Figure 2.15. Colonisation des graines immatures par *X. citri* pv. *fuscans* marqué avec une protéine fluorescente verte (GFP). (A) Image 3D reconstituée indiquant la présence des bactéries dans le funicule. (B et C) Présence des bactéries dans les parenchymes à la périphérie de l'embryon. Tp = parenchyme du testa, fu = funicule, tb = barre trachéide, co = cotylédons. (d'après Darrasse et al. 2018)

Le xylème est un environnement assez pauvre en nutriments mais il contient certains minéraux, sucres et acides aminés qui sont essentiels pour les bactéries colonisant le xylème (Fatima et Senthil-Kumar 2015). Certaines bactéries sont spécialistes du xylème comme *X. fastidiosa*, mais d'autres bactéries (*Erwinia* spp., *Pseudomonas* spp., et *Xanthomonas* spp.) colonisent le xylème en plus d'autres compartiments de la plante pour se nourrir (Fatima and Senthil-Kumar 2015). A ce jour, peu d'informations sont disponibles sur la nutrition des souches du complexe d'espèces *P. syringae* dans le xylème des plantes. La sève du xylème du concombre et des courges contient des protéines telles que des chitinases, des protéines riches en glycine, des peroxydases et des subtilases (Buhtz et al. 2004). De plus la sève du xylème des courges contient des sucres libres comme du galactose, du glucose et de l'acide galacturonique, des oligosaccharides et de pectines (Iwai et al. 2003). Ces composés pourraient constituer une source nutritive pour certaines bactéries colonisant le xylème des Cucurbitacées.

### b) La transmission par la voie vasculaire

La transmission des bactéries vascularisées dans le xylème peut s'effectuer à partir de la plante mère aux graines par les connexions vasculaires à l'albumen (Figure 2.8.a) (Frank et al. 2017). Chez le haricot, Darrasse et ses collaborateurs ont étudié la transmission systémique de *X. citri* pv. *fuscans* par microscopie (Darrasse et al. 2018). Les tissus vasculaires maternels connectés aux graines étaient infestés par les bactéries. Des bactéries entrant par le funicule dans le sillon du hile ont été observées dans les graines en développement. Les bactéries observées étaient particulièrement abondantes dans les parenchymes internes de la graine autour de l'embryon (Figure 2.15) (Darrasse et al. 2018). La transmission systémique de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* aux graines de tomate a également été observée en microscopie (Tancos et al. 2013). Après inoculation des pédicelles chez la tomate, les bactéries ont été retrouvées dans le xylème et dans le funicule d'une graine en développement (Tancos et al. 2013).

Plusieurs mécanismes moléculaires sont impliqués pour la transmission des bactéries par la voie vasculaire. La capacité à dégrader les membranes cellulaires par des enzymes, la mobilité et la capacité d'agrégation sont notamment des traits importants pour les bactéries colonisant le xylème des plantes. La bactérie phytopathogène *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* est un exemple de bactérie vascularisée dans le xylème. Cette bactérie engendre le flétrissement et le chancre de la tomate. Pendant l'infection des populations denses forment des agrégats et des biofilms qui adhèrent aux vaisseaux du xylème grâce à des polysaccharides, des pili de type IV et des fimbriae. Les agrégats bactériens détériorent les parois des vaisseaux du xylème ce qui permet aux bactéries de migrer dans les cellules parenchymateuses adjacentes, grâce à la sécrétion de nombreuses enzymes (dont des serine-protéases codées par des gènes *chp*) dégradant les parois cellulaires et facilitant la colonisation (Gartemann et al. 2003; Eichenlaub and Gartemann 2011). Chez d'autres bactéries vasculaires comme *X. campestris* pv. *campestris*, le SST3 est particulièrement impliqué dans la capacité de colonisation du xylème par ces bactéries puisque les mutants *hrcC* ne parviennent pas à survivre dans le xylème au-delà de quelques jours (Akimoto-Tomiyama et al. 2014). La souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato* est vasculaire et utilise les vaisseaux du xylème pour se déplacer dans différents organes la plantes. Son déplacement est actif et nécessite le flagelle et les pili de type IV (Misas-Villamil et al. 2011). Chez le melon, *A. citrulli* forme également des agrégats dans les vaisseaux du xylème grâce au système de sécrétion de type IV (Bahar et al. 2009a).

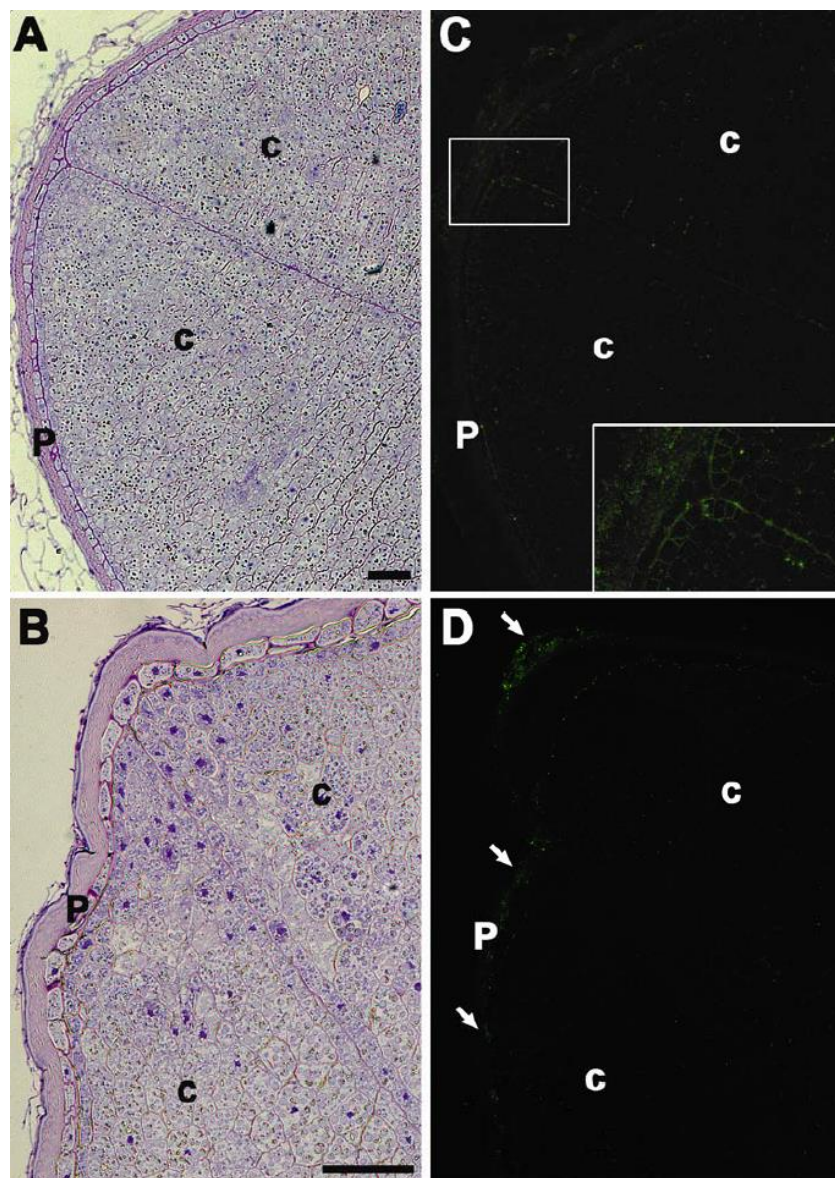


Figure 2.16. Immunolocalisation de cellules *A. citrulli* dans des sections de graines de pastèque inoculées par (A, C) voie florale et (B, D) voie par contact. (A et B) Coupes transversales colorées au bleu de toluidine des graines de pastèque mettant en évidence le péricarpe (PE), l'enveloppe (P) et les cotylédons (c). (C et D) Immunolocalisation de cellules d'*A. citrulli* dans des graines infestées. Dans l'image (C) les bactéries sont localisées dans la couche (PE) et dans les espaces inter-cellulaires dans la couche du cotylédon (c), le carré en bas à droite montre une partie zoomée. Dans l'image (D), les bactéries sont identifiées dans la couche (PE). Barre = 100  $\mu$ m. (d'après Dutta et al. 2012)

Pour assurer leur transmission aux graines, certaines bactéries comme *X. citri* pv. *fuscans* nécessitent le SST3 et des adhésines. Ces déterminants sont essentiels d'une part à la colonisation du xylème et d'autre part à la transmission aux graines qui en résulte. Ainsi, les mutants de *X. citri* pv. *fuscans* dans des gènes de certaines adhésines (*XadA* et *FhaB*) sont affectés dans leur capacité à se transmettre aux graines par la voie vasculaire (Darsonval et al. 2009). De plus les mutants *pilA* du système de sécrétion de type IV sont également affectés dans leur capacité à se transmettre aux graines (Darsonval et al. 2009). Les gènes *hrp* de *X. citri* pv. *fuscans*, codant le SST3 sont également indispensables à la colonisation systémique et la transmission aux graines par la voie vasculaire (Darsonval et al. 2008). Aucun des mutants *hrp* (particulièrement mutants *hrpG*, *hrcT* et *hrcV*) n'ont été capables de se transmettre aux graines de haricot (Darsonval et al. 2008).

#### 2.2.4. La localisation et la survie dans la graine

##### a) La localisation

La localisation des micro-organismes dans les graines est dépendante de la voie de transmission qu'ils ont empruntée (Figure 2.16) (Shade et al. 2017). Bien souvent, les voies florale et vasculaire permettent la colonisation externe et interne des graines par les micro-organismes, alors que la voie par contact permet une colonisation externe (Barret et al. 2016). Les micro-organismes peuvent ainsi être localisés dans différents compartiments de la graine comme la surface de l'embryon (axe embryonnaire et cotylédons), les tissus de stockage (albumen et périsperme) et l'enveloppe de la graine selon la voie de colonisation empruntée (Shade et al. 2017). Ces différents compartiments de la graine peuvent être considérés comme des micro-habitats.

Une transmission par la voie florale conduit généralement à une colonisation interne et externe des micro-organismes. *P. phytofirmans* est une bactérie bénéfique à large gamme d'hôtes et promeut la croissance des plantes (Figure 2.10) (Mitter et al. 2017). Après inoculation par pulvérisation des fleurs de maïs, soja et poivron, *P. phytofirmans* est retrouvée dans les tissus l'embryon des graines matures après récolte. Chez la pastèque, la localisation d'*A. citrulli* dans les graines après une transmission artificielle par la voie florale a également été étudiée. La grande majorité des bactéries est retrouvée dans l'embryon des graines de pastèque (Dutta et al. 2012). Dans les graines de haricot matures provenant de gousses symptomatiques, *X. citri* pv. *fuscans* inoculée par la voie florale a été retrouvée à la surface du testa symptomatique endommagé par les lésions et les bactéries ont également été observées dans les espaces intercellulaires du testa (parenchymes), entre le testa et les cotylédons et à l'intérieur de l'embryon (Darrasse et al. 2018). Cependant ces graines très symptomatiques et contaminées au niveau de l'embryon ne sont plus capables de germer (Darrasse et al. 2018). *P. amygdali* pv. *phaseolicola* se transmet par la voie florale et les bactéries contaminant naturellement les graines ont été retrouvées dans les couches de parenchymes du testa et à la surface de l'embryon (Taylor et al. 1979a).





Comme pour la voie florale, les bactéries transmises par la voie vasculaire peuvent être retrouvées dans des compartiments internes et externes. Chez *X. campestris* pv. *campestris* sur moutarde et colza, une colonisation vasculaire conduit à une contamination de l'enveloppe de la graine, de l'albumen et également de l'embryon chez des graines symptomatiques (Singh and Mathur 2004). Les endophytes non-pathogènes et vasculaires du melon colonisent les faces externes et internes de l'enveloppe de la graine, le périsperme, les cotylédons entourant l'embryon et l'intérieur de l'embryon (Glassner et al. 2017). La taille des populations bactériennes suit un gradient avec de nombreuses bactéries retrouvées dans l'enveloppe de la graine et seulement quelques bactéries retrouvées individuellement dans l'embryon (Glassner et al. 2017).

La transmission par la voie par contact conduit souvent à une contamination externe des graines, notamment lorsque les graines sont contaminées tardivement après la fécondation. Cependant, pour des bactéries phytopathogènes, dans le cas d'infections sévères, des contaminations bactériennes peuvent se retrouver au niveau de l'embryon. Ainsi, pour *A. citrulli*, une inoculation artificielle du péricarpe du fruit conduit à une colonisation de l'endosperme mais également de l'embryon pour quelques graines fortement contaminées (Dutta et al. 2012).

Enfin, la localisation des bactéries pourrait être liée au moment où elles colonisent les graines (Glassner et al. 2017). Pour expliquer la localisation de différents types de bactéries dans les graines de melon, Glassner et collègues supposent que la couche perméable protectrice de l'embryon agirait comme une barrière physique chez certaines espèces végétales (Glassner et al. 2017). Ainsi, une colonisation précoce dans les premiers stades de maturation des graines permettrait aux bactéries de pénétrer dans les parties internes de la graine, alors qu'à un stade plus tardif, l'enveloppe entourant l'embryon des cucurbitacées agirait comme une barrière physique vis-à-vis des bactéries (Glassner et al. 2017). Les travaux conduits sur *A. citrulli* soutiennent cette idée puisque par la voie florale, les bactéries colonisent très précocement la graine en formation et se retrouvent ensuite au niveau l'embryon de la graine mature alors qu'une inoculation du péricarpe du fruit induit une colonisation plus tardive de la graine en formation et résulte en une contamination externe de l'embryon (Dutta et al. 2012a).

### 2.2.5. La survie des bactéries dans les semences

La graine déshydratée est un environnement particulièrement hostile aux micro-organismes. Une graine de courge possède une teneur en eau d'environ 5 à 6 % (Kocabiyik et al. 2009). Au cours de la colonisation de la graine en formation dans la plante-mère, les bactéries subissent les changements physiologiques de la graine et divers stress comme la déshydratation. Cependant, malgré ces stress, les bactéries peuvent se conserver durant des mois voire des années dans les graines matures. Ainsi, certaines bactéries peuvent survivre au-delà du temps de maintien de la capacité germinative des graines. Par exemple, sur haricot, *Curtobacterium flaccumfaciens* peut survivre jusqu'à 24 ans (Schuster and Coyne 1974). Des bactéries viables de *X. phaseoli* et *X. citri* pv. *fuscans* ont été retrouvées sur des graines conservées pendant 15 ans (Schuster and Coyne 1974). *A. citrulli* survivrait plus de 34 ans dans des graines de melon et pastèque (Block and Shepherd 2008). Différents facteurs influencent la survie des bactéries dans les graines comme leur localisation et les températures de stockage.

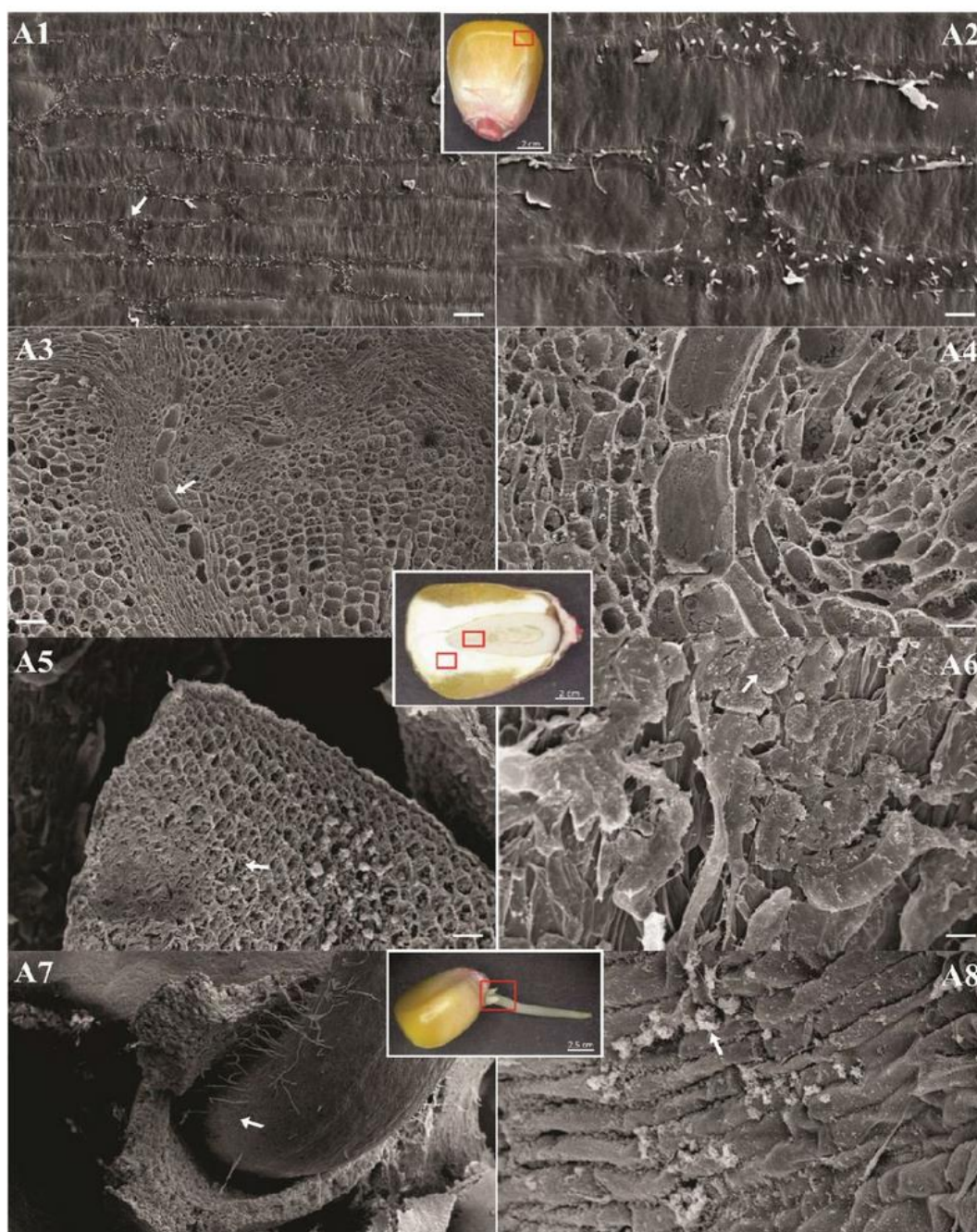


Figure 2.17. Colonisation de semences de maïs inoculées par une communauté synthétique de 12 isolats et désinfectées (A). Les cellules bactériennes ont été visualisées par microscopie électronique à balayage. Régions des graines : péricarpe (A1 et A2), endosperme (A3 et A4), embryon (A5 et A6) et radicule (A7 et A8). Les flèches blanches indiquent les biofilms et les petits agrégats bactériens. Les barres représentent les échelles suivantes: A2, A6 et A8: 10  $\mu\text{m}$ ; A1 et A4: 20  $\mu\text{m}$ ; A3 et A5: 100  $\mu\text{m}$ ; A7: 200  $\mu\text{m}$ . (d'après dos Santos et al. 2020)

Chez certaines bactéries phytopathogènes, la localisation semble être un trait plus important que la tolérance à la déshydratation pour une survie à long terme dans les graines (Dutta et al. 2016). *A. citrulli*, *P. stewartii* subsp. *stewartii* et *X. campestris* pv. *campestris* sont sensibles à la déshydratation sur papier filtre et sur graines, et c'est la localisation bactérienne interne dans l'embryon des graines qui permet une survie sur le long terme (Dutta et al. 2016).

Pour résister à la déshydratation de la graine et survivre dans les graines dormantes, les bactéries colonisant les graines ont co-évolué avec les plantes (Mitter et al. 2017). Ainsi, les changements physiologiques de la graine au cours de sa maturation affectent les bactéries et sélectionnent celles qui vont être capables de coloniser la graine (Truyens et al. 2015). Par exemple, la perte en eau de la graine favorise les endophytes tolérants à la pression osmotique, comme il a été montré pour les endophytes survivant dans les graines de riz (Mano et al. 2006). Les cellules bactériennes capables de survivre dans les graines sont généralement regroupées sous forme de biofilm (Figure 2.17) (Singh and Mathur 2004). De plus, les téguments de certaines semences présentent des aspects plus ou moins rugueux (céréales, pois, crucifères) ou sculptés (carotte, laitue) qui offrent ainsi de nombreux micro-habitats protecteurs des bactéries (Maude 1996). D'autres mécanismes peuvent permettre aux bactéries de survivre dans les graines sur le long terme. Ainsi, de nombreuses bactéries phytopathogènes sont connues pour répondre à certains stress environnementaux par l'entrée dans un état physiologique particulier, appelé état Viable mais Non Cultivable (VNC) (Oliver 2005). Sous l'effet d'un signal inducteur (levée du stress, autre stress, mise en contact avec l'hôte, germination etc.), les bactéries VNC sont capables de « ressusciter » et d'être à nouveau virulentes (Dong et al. 2020). Plusieurs bactéries pathogènes de plantes ont la capacité à entrer dans un état VNC dont *A. citrulli* (Kan et al. 2019), *P. syringae* (Mock et al. 2015), *X. axonopodis* pv. *citri* (del Campo et al. 2009) ou *E. amylovora* (Ordax et al. 2006).

## 2.3. La transmission des bactéries phytopathogènes par les semences

### 2.3.1. La spermosphère

La spermosphère désigne la graine et l'environnement soumis à son influence. La germination de la graine va fortement influencer les associations microbiennes de la plantule. Lors de l'imbibition de la graine, celle-ci va relarguer divers métabolites primaires et secondaires dans le sol (Shade et al. 2017 ; Nelson 2004). Ainsi une large gamme de sucres, d'acides aminés, d'acides organiques, de composés phénoliques et de substances volatiles a été identifiée au cours des phases de la germination de la graine (Nelson 2004). Certains de ces composés vont attirer les micro-organismes de la graine et du sol, ce qui fait de la spermosphère une zone riche en activité microbienne (Shade et al. 2017). Si les conditions sont favorables, les bactéries présentes dans la graine peuvent reprendre leur croissance, se multiplier et coloniser la plantule. La reprise de croissance peut se faire grâce à la solubilisation du phosphore, la sécrétion d'acétoïne, de pectinases et de cellulases ainsi que par la fixation de l'azote (Walitang et al. 2017 ; Johnston-Monje and Raizada 2011). Chez le haricot, lors de la germination, la semence exsude de l'acide malique qui favorise la croissance et la formation de biofilms de *Bacillus amyloliquefaciens* (Martins et al. 2018).



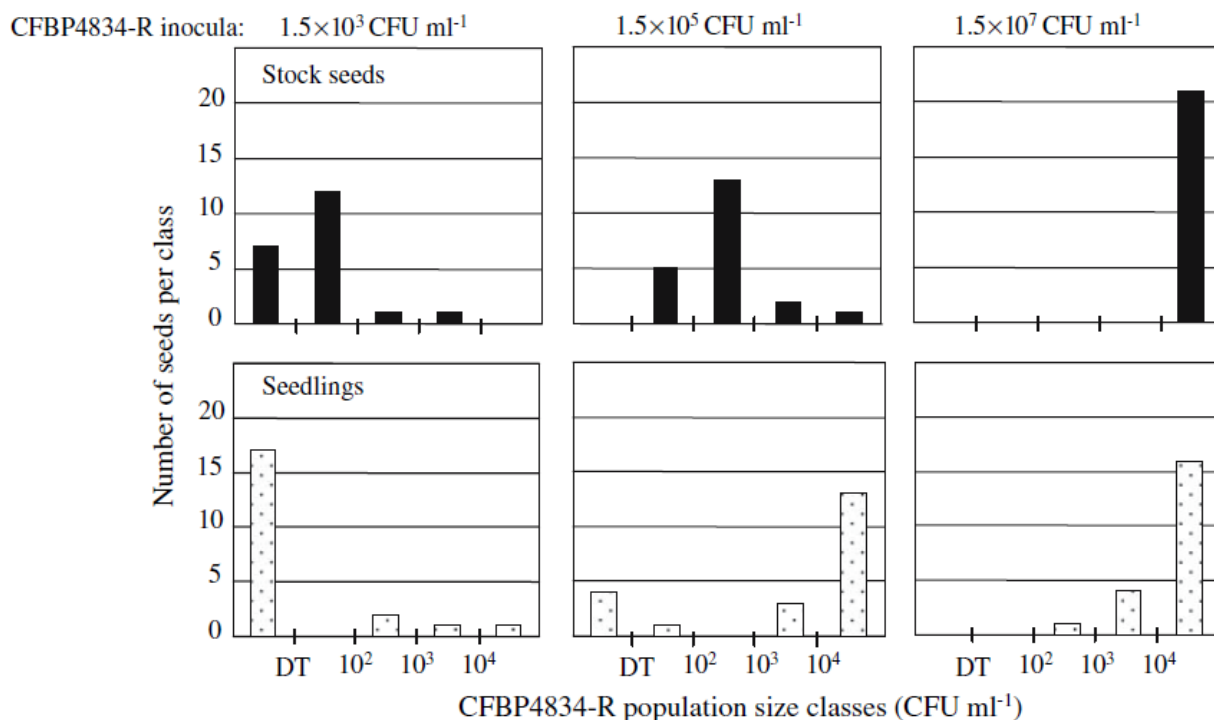


Figure 2.18. Tailles de population de *X. citri* pv. *fuscans* (CFBP 4834-R) dans 21 graines inoculées à  $1,5 \times 10^3$ ,  $1,5 \times 10^5$  et  $1,5 \times 10^7$  ufc.mL<sup>-1</sup> (barres noires) et transmission des bactéries aux plantules à 3 jours à partir de 21 autres graines inoculées aux mêmes concentrations (barres blanches). Les tailles de populations dans les graines et dans les plantules sont distribuées en classes d'un log<sub>10</sub> à chaque fois et DT correspond au seuil de détection fixé à 10 bactéries par graine. (d'après Darrasse et al. 2007)

### 2.3.2. La colonisation de la plantule

La transmission d'une bactérie phytopathogène de la semence à la plantule peut provoquer l'établissement de la bactérie dans les cultures et le développement de maladies si les conditions sont favorables à la multiplication bactérienne (Darrasse et al. 2007 ; Gitaitis and Walcott 2007a). Par exemple pour le haricot, les semences contaminées par *P. amygdali* pv. *phaseolicola* en faible nombre dans un lot de semences donné, sont à l'origine du développement de la maladie sur quelques plantes, puis après dispersion elles peuvent entraîner des graves épidémies (Taylor et al. 1979a). La capacité de transmission des bactéries de la semence aux plantules dans le cadre d'une interaction non-hôtes a également été montrée (Darrasse et al. 2010).

L'efficacité de la transmission des bactéries aux plantules dépend de la charge bactérienne initiale dans les graines (Figure 2.17). Par exemple, pour la transmission de *X. citri* pv. *fuscans* aux plantules de haricot, une charge bactérienne d'au moins 100 cfu.graine<sup>-1</sup> est préalablement nécessaire, mais la transmission est systématique lorsque la charge est supérieure à 1000 cfu.graine<sup>-1</sup> (Darrasse et al. 2007). Sur la pastèque, 10 cfu.graine<sup>-1</sup> d'*A. citrulli* sont suffisantes pour contaminer la plantule (Dutta et al. 2012).

Pour parvenir à coloniser les plantules, les micro-organismes doivent mettre en place un système de piégeage des nutriments efficace couplé à une utilisation rapide des ressources pour pouvoir se multiplier rapidement (Shade et al. 2017). Ainsi, des traits sont importants dans la colonisation de la spermosphère par les bactéries comme le chimiotactisme (Gamliel and Katan 1992), la capacité à former de biofilms (Tian et al. 2015) et la sécrétion de composés anti-microbiens (Nelson 2004). Il est également nécessaire que les conditions d'humidité et de températures soient favorables à la multiplication des bactéries (Xin et al. 2018). Les bactéries phytopathogènes colonisent généralement l'hypocotyle de manière superficielle et peuvent pénétrer dans le système vasculaire ou les parenchymes à partir des cotylédons par les ouvertures naturelles ou les blessures (Maude 1996). Par exemple, après 24 h de germination, *X. citri* pv. *fuscans* a été observée à la surface des cotylédons, de l'hypocotyle, des plumules et dans les plis des tissus embryonnaires (Darrasse et al. 2018). Les mécanismes de la colonisation épiphyte et endophyte des plantules sont les mêmes que ceux décrits plus généralement pour la phyllosphère.

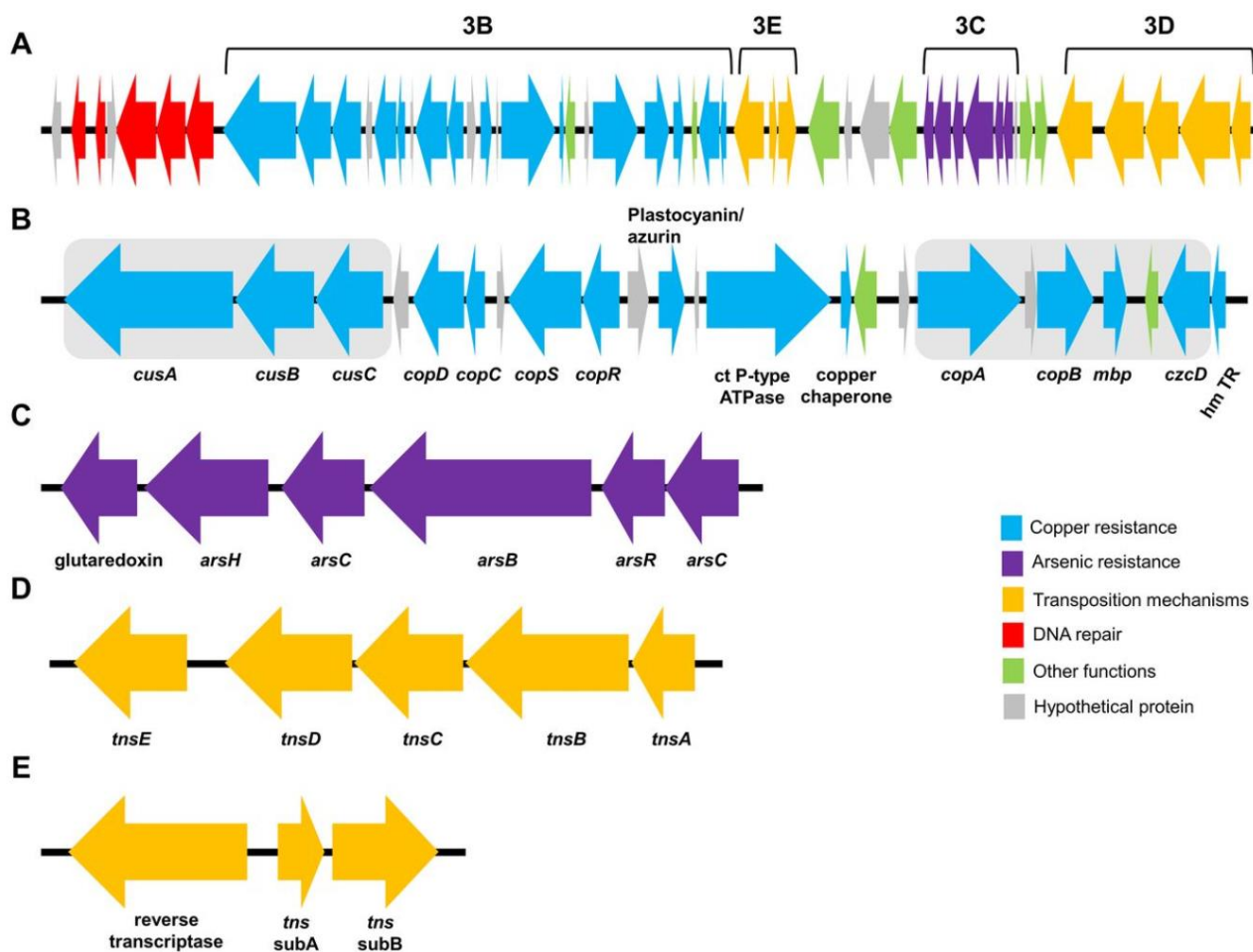


Figure 3.1. Organisation génétique du transposon de type Tn7 associé à un phénotype hyper-résistant au cuivre chez *P. syringae* pv. *syringae* (souche UMAF0291). (A) Structure génétique complète du transposon de type Tn7 de 51 178 pb qui est composé de 49 cadres de lecture ouverts. Les flèches grises représentent des protéines hypothétiques; les flèches rouges représentent des gènes putativement impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN; les flèches bleues représentent des gènes putativement impliqués dans la résistance au cuivre; les flèches vertes représentent des gènes impliqués dans différentes fonctions; les flèches jaunes représentent des gènes putativement impliqués dans les mécanismes de transposition; et les flèches violettes représentent des gènes putativement liés à la désintoxication des composés de l'arsenic. (B) Structure génétique liée à la résistance du cuivre (C) Structure génétique des gènes liés à la résistance à l'arsenic (D) Structure génétique de la machinerie de transposition typique des transposons Tn7 codés par les gènes *tns*ABCDE. (E) Structure génétique d'un rétrotransposon. (d'après Aprile et al. 2020)

## 3. Le contrôle des agents phytopathogènes transmis par les semences

### 3.1. Les moyens de lutte contre les phytobactérioses transmises par les semences sur les cultures de porte-graine

#### 3.1.1. La lutte chimique

Aucune méthode chimique curative n'existe actuellement pour lutter contre les bactéries pathogènes des plantes. L'utilisation des antibiotiques n'est pas autorisée en Europe dans la lutte contre les maladies bactériennes des plantes en raison des résistances qui pourraient être sélectionnées (Sundin et al. 2016). De plus les gènes de résistances aux antibiotiques pourraient être disséminés dans l'environnement au risque d'être transmises aux bactéries pathogènes de l'homme et donc de représenter un risque en santé humaine puisque les antibiotiques utilisés en agriculture sont communs avec ceux utilisés pour usage clinique (Organisation Mondiale de la Santé, consulté le 25/01/2021). Par ailleurs, l'efficacité des antibiotiques, dans les pays où leur usage est autorisé, est rapidement limitée du fait de la sélection de souches porteuses de gènes de résistance puis la dissémination de ceux-ci entre souches, entre pathovars et entre espèces (McManus et al. 2002). En Europe, l'utilisation de produits chimiques pour lutter contre les phytobactérioses épiphytes ou transmises par les semences est donc limitée au cuivre et à ses dérivés. Ces composés sont d'usage courant en agriculture, néanmoins ils s'avèrent bien souvent inefficaces, par l'acquisition de gènes de résistance transférables, comme dans le cas de la résistance aux antibiotiques. Des souches du complexe d'espèces *P. syringae* pv. *syringae* isolées de mangue possèdent un transposon Tn7like qui leur confère une hyper résistance au cuivre et par conséquent le traitement devient inefficace (Figure 3.1) (Aprile et al. 2020). Ce transposon contient 49 cadres de lectures ouverts (ORFs) dont certains gènes impliqués dans la résistance au cuivre (*cusA*, *cusB*, *cusC*, *copD*, *copC*, *copS*, *copR* etc.), la résistance à l'arsenic (*arsH*, *arsC*, *arsB*, *arsR*, *arsC*), la réparation de l'ADN et des mécanismes de transposition (Aprile et al. 2020). Aux Etats-Unis, 80 % des souches de *P. amygdali* pv. *phaseolicola*, transmissibles par les semences et isolées de haricot sont résistantes au cuivre (Zhang et al. 2017).

#### 3.1.2. La résistance variétale

Le déploiement de variétés résistantes aux agents phytopathogènes est une stratégie de lutte généralement efficace sur le long terme, sauf dans le cas de résistance gène pour gène qui peut être rapidement contournée. Sur le riz, de nombreux gènes (*xa5*, *Xa7*, *xa13*, *Xa21* et *Xa23*) de résistances ont été sélectionnés selon les variétés contre des souches de *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. oryzae* pv. *oryzicola* appartenant à différentes races (Jiang et al. 2020). Les races au sein d'un même pathovar sont définies selon les différentes réactions entre les souches et les variétés d'une plante hôte sur la base des ET3 et des gènes de résistance associés. Les programmes de sélection sont onéreux, parfois fastidieux pour certaines espèces végétales et nécessitent donc plusieurs années de recherche avant commercialisation. Par exemple, sur la banane des programmes de sélection pour créer des variétés résistantes au champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 sont en cours de développement depuis 2015 (FAO, consulté le 01/02/2021) et récemment des lignées de bananes Cavendish transgéniques ont été identifiées comme résistantes à la maladie grâce au gène de résistance RGA2 (Dale et al. 2017).

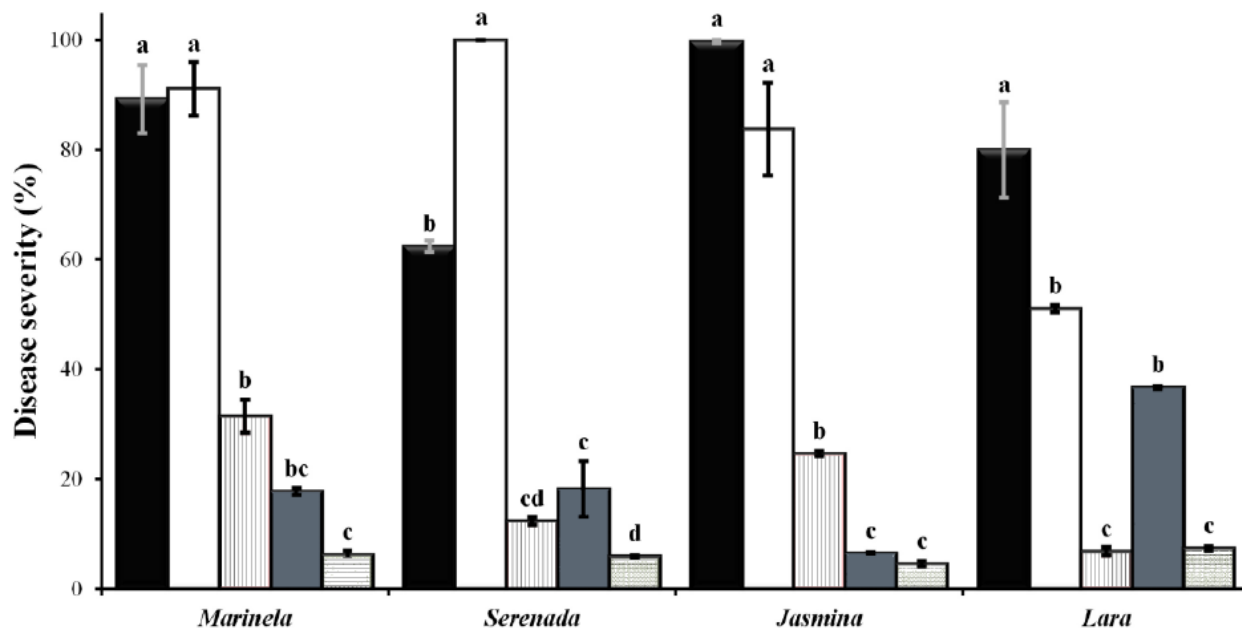


Figure 3.2. Estimation de la sévérité de la maladie de la tache foliaire sur betterave à 7 jours après inoculation de *B. amyloliquefaciens* (souche SS-12.6) et l'agent causal *P. syringae* pv. *actinidiae* (souches P53 et CFBP 2473) sur quatre variétés de betterave. Les barres noires correspondent à CFBP 2473, les barres blanches à P53, les barres rayées verticalement à SS 12.6 + CFBP 2473, les barres grises à SS-12.6 + P53 et les barres rayées horizontalement au contrôle + SS-12.6). (D'après Nikolić et al. 2019).

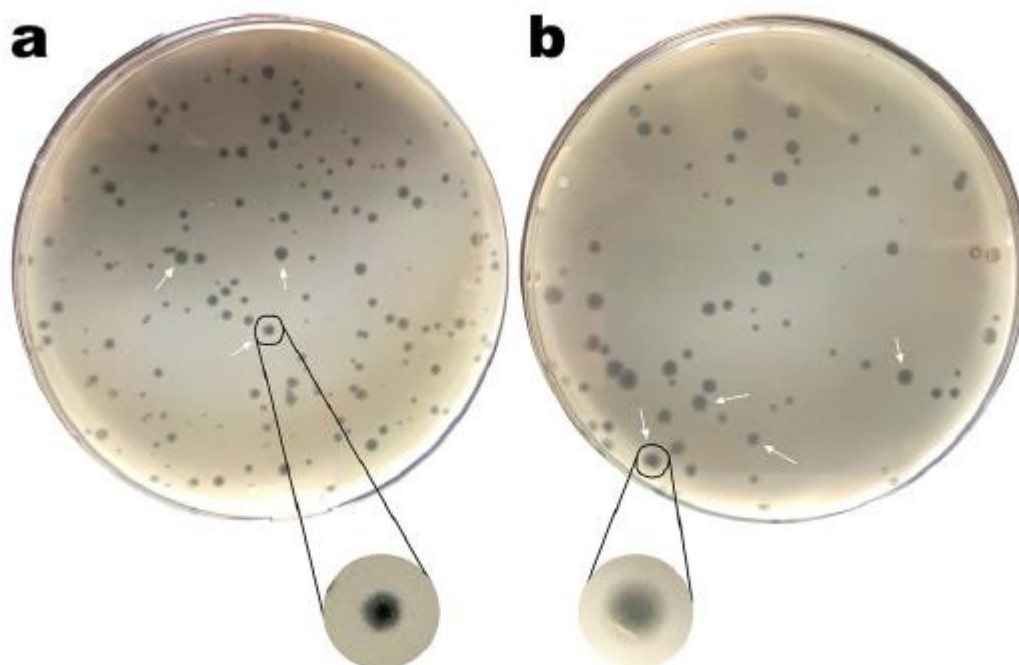


Figure 3.3. Plages de lyses du phage  $\phi 6$  sur *P. syringae* pv. *actinidiae* (A) souche CRAFRU 12.54 (B) souche CRAFRU 14.10. (D'après Pinheiro et al. 2020)

Des travaux sont toujours en cours pour évaluer de nombreuses lignées transgéniques de bananes résistantes avant potentielle commercialisation dans les pays autorisant l'exploitation des organismes génétiquement modifiés. Après un déploiement de variétés résistantes sur un territoire, il est possible que les agents pathogènes contournent le gène de résistance après un temps plus ou moins long selon la pression de sélection exercée. Par exemple, sur la tomate et le poivron, le gène de résistance *Bs2* cible l'effecteur *avrBs2* de *X. perforans* et *X. vesicatoria* et confère une résistance à ces bactéries. Néanmoins, des souches de *X. vesicatoria* ont contourné la résistance conférée par *Bs2* et ont induit des symptômes sur poivron par acquisition de nouveaux allèles *avrBs2* résultant d'une insertion ou une délétion de cinq nucléotides ou par changement ponctuel d'un nucléotide (Gassmann et al. 2000; Dangl et al. 2013; Adhikari et al. 2020). Ainsi, le gène *Bs2* ne reconnaît plus sa cible et l'agent phytopathogène devient virulent. La durabilité des variétés résistantes peut aussi être limitée par le réchauffement climatique. Par exemple, une hausse de la température réduit la résistance des variétés de riz IRBB NILs possédant le gène de résistance *Xa4* contre *X. oryzae* pv. *oryzae* (Dossa et al. 2020).

### 3.1.3. Le bio-contrôle

Le principe du contrôle biologique (ou bio-contrôle) est d'utiliser des organismes vivants antagonistes, compétiteurs, prédateurs, des agents phytopathogènes ou assurant la prémunition (induction des réactions de défense de la plante) ou d'utiliser des molécules d'origine naturelle (microbienne, animale ou végétale) (Sundin et al. 2016). Le bio-contrôle repose sur deux stratégies majeures (i) l'approche écologique sélectionne des organismes pouvant partager la même niche écologique que l'agent phytopathogène à contrôler et repose sur la base d'une interaction antagoniste ou de prédation (ii) l'autre approche vise à contrôler l'agent phytopathogène par le biais d'application de composés chimiques d'origine naturelle. Dans le cadre d'une production de semences, le produit de bio-contrôle peut être appliqué directement sur le porte-graines pour contrôler la transmission des agents phytopathogènes transmis aux semences ou alors par traitement de la semence (enrobage). Pour contrôler les souches du pathovar *P. syringae* pv. *syringae* responsables de la brûlure des épis d'orge, il est possible d'appliquer directement des souches de *P. agglomerans* pendant le développement des épis et avant la fenêtre d'infection la bactérie phytopathogène (Braun-Kiewnick et al. 2000). L'application de cette méthode peut réduire de 45 à 75 % l'incidence de la maladie dans des cultures en plein champ (Braun-Kiewnick et al. 2000). Le contrôle du pathovar *P. syringae* pv. *aptata* sur betterave est possible *in vitro* et *in vivo* par l'utilisation d'extraits lipopeptidiques bruts produits par la bactérie *B. amyloliquefaciens* ou par l'inoculation directe de cette bactérie antagoniste (Figure 3.2), mais la validation pour le contrôle au champ de cette maladie n'a pas encore été rapportée (Nikolić et al. 2019).

La phagothérapie ou utilisation de virus spécifiques des bactéries, les bactériophages, pour lutter contre les maladies des plantes est une méthode ancienne (années 1920) qui regagne un vif intérêt (Buttimer et al. 2017). Toujours utilisés à des fins thérapeutiques dans les pays de l'ex-bloc de l'Est, leur usage clinique ou en santé des plantes est tombé en désuétude dans les pays occidentaux avec l'avènement des antibiotiques. Actuellement, l'utilisation du bactériophage commercial  $\phi 6$  permet contrôler *P. amygdali* pv. *phaseolicola* au champs et des études plus récentes ont également évalué *in vitro* son potentiel pour contrôler les pathovars *P. syringae* pv. *syringae* et *P. syringae* pv. *actinidiae* avant d'évaluer l'efficacité dans des champs naturellement contaminés (Figure 3.3) (Pinheiro et al. 2019, 2020; Vidaver et al. 1973).





### 3.1.4. Les mesures prophylactiques

La mise en place de stratégies de lutte prophylactiques, en accord avec la biologie des agents phytopathogènes, représente un levier d'action contre les phytobactérioses. La prophylaxie vise à prévenir l'apparition et la propagation des agents phytopathogènes dans les cultures ainsi que les maladies associées. Pour y parvenir, la maîtrise des sources inoculum est primordiale et différentes pratiques prophylactiques peuvent être appliquées en amont d'un cycle cultural, pendant la culture et après la récolte. Par exemple, pour *X. campestris* pv. *campestris* responsable de la pourriture noire du chou, plusieurs adventices de la famille des Crucifères peuvent porter de façon asymptomatique l'agent phytopathogène et par conséquent représenter une potentielle source d'inoculum (Schaad and Dianese 1981; Silva et al. 2017). Ainsi pour éviter ces sources potentielles d'inoculum, il s'agit de mettre en place des actions de désherbage et des cycles de rotations des cultures suffisamment longs (Lamichhane et al. 2015; Silva et al. 2017). Pendant et après le cycle cultural, les pratiques agricoles sont importantes pour réduire les sources d'inoculum et limiter la prolifération des bactéries phytopathogènes. La période de taille du kiwi a un impact sur le développement de la maladie causée par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Mauri et al. 2016). En effet, lorsque la taille est effectuée précocement quand les arbres sont dormants, l'incidence du chancre et sa sévérité sont diminuées par rapport à une taille pendant la période végétative du kiwi (Mauri et al. 2016). Enfin, lors de la fin du cycle cultural, il est nécessaire d'éliminer les débris végétaux (ou de les enfouir) et de supprimer les repousses qui peuvent contenir et maintenir des agents phytopathogènes dans l'environnement (Lamichhane et al. 2015).

La semence étant une source d'inoculum primaire de nombreuses maladies bactériennes des plantes, une mesure prophylactique primordiale est de s'assurer de l'utilisation de semences saines, c'est-à-dire indemnes d'agents phytopathogènes (Burdman and Walcott 2012; Lamichhane et al. 2015; Gitaitis and Walcott 2007a). Il s'agit ici d'un principe d'exclusion des agents phytopathogènes dans le matériel végétal de départ. L'utilisation de semences indemnes d'agents phytopathogènes repose sur des tests sanitaires effectués sur les lots de semences et des méthodes de décontamination si nécessaire. Une autre mesure prophylactique basée sur l'exclusion correspond aux zones « hors graisse » du haricot. En France, les zones dites « hors graisse » sont définies par arrêtés ministériels, où la graisse du haricot fait l'objet d'un contrôle renforcé. Dans ces zones, les parcelles sont semées avec des semences certifiées et le suivi de la culture est rigoureux afin de détecter toute apparition de symptômes.



## 3.2. Tester l'état sanitaire des lots de semences

### 3.2.1. Objectifs et principes de la sélection sanitaire

Tester l'état sanitaire d'un lot de semences a comme objectif de déterminer si celui-ci est contaminé par un organisme cible. L'analyse est réalisée sur un échantillon puisqu'elle est destructive, il doit donc être représentatif du lot. Les tests sanitaires des semences sont importants pour quatre raisons (ISTA, 2021) :

- i) L'inoculum transmis par les semences peut entraîner le développement progressif de la maladie dans le champ et réduire la valeur commerciale de la culture.
- ii) Les lots de semences importés peuvent introduire des maladies dans de nouvelles régions. Des tests pour répondre aux exigences de quarantaine peuvent donc être nécessaires.
- iii) Les tests sanitaires des semences peuvent expliquer les causes d'une mauvaise germination ou d'un mauvais établissement des plantes au champ.
- iv) Les résultats des tests de sélection sanitaire peuvent indiquer la nécessité d'effectuer un ou plusieurs traitements des lots de semences afin d'éradiquer les agents phytopathogènes transmis par les semences ou de réduire le risque de transmission de maladies.

### 3.2.2. Les normes et les méthodes de détection standards

Les tests sanitaires doivent être effectués à l'aide de méthodes et d'équipements qui ont été validés pour s'assurer qu'ils soient adaptés à la détection des agents phytopathogènes recherchés. L'association Internationale de test des semences (ISTA) définit les normes mondiales pour chaque agent phytopathogène. Les règles internationales pour les tests sur semences sont répertoriées dans un guide téléchargeable sur le site de l'ISTA (<https://www.seedtest.org/>). L'ISTA propose des méthodes standardisées validées pour la détection des agents phytopathogènes transmis par les semences. L'ensemble des méthodes et protocoles sont consultables sur le site de l'ISTA (<https://www.seedtest.org/>). Chaque méthode proposée dépend de l'agent phytopathogène ciblé et de l'espèce végétale et un effectif minimum de semences à tester est indiqué. En France l'analyse des lots de semences est réalisée par des laboratoires spécialisés et accrédités, comme la Station Nationale d'Essai de Semences (SNES) du GEVES et pour les importations pouvant impliquer des agents phytopathogènes de quarantaine le Laboratoire de la Santé des Végétaux dépendant de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (LSV-ANSES).

D'autres organismes proposent des protocoles de détection standardisés et validés à un niveau international (Fatmi et al. 2017). La fédération Internationale des semences (ISF) représente les intérêts de l'industrie semencière professionnelle à l'échelle mondiale. L'une des responsabilités de l'industrie semencière dans le domaine de la santé des végétaux est de fournir des semences saines aux agriculteurs. L'International Seed Health Initiative (ISHI) est une plateforme dirigée par l'industrie semencière dans le but de développer et de diffuser des méthodes de référence pour tester l'état sanitaire des semences.



L'ISHI regroupe des partenaires privés, des institutions publiques et des laboratoires privés pour développer et valider des méthodes de test en santé des semences. Pour démontrer la robustesse d'une méthode de détection, l'ISHI évalue la performance, la spécificité, la sélectivité, la répétabilité et la reproductibilité des protocoles. Les méthodes sont régulièrement révisées afin de les mettre à jour. Sur le site web de l'ISHI, de nombreux protocoles standards sont disponibles afin de détecter certains agents phytopathogènes dans les lots de semences (<https://www.worldseed.org/our-work/phytosanitary-matters/seed-health/ishi-veg-protocols/>). Par exemple, y figurent des protocoles pour la détection de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sur semences de tomate, d'*A. citrulli* sur Cucurbitacées, de *P. amygdali* pv. *phaseolicola* sur haricot ou encore *X. campestris* pv. *campestris* sur Brassicacées.

Un test sanitaire est effectué sur un échantillon d'un lot de semences. Par conséquent, il est essentiel que l'échantillon utilisé soit représentatif du lot de semence et que sa taille permette la détection de l'agent phytopathogène recherché s'il est présent (Morrison 1999). Selon les agents phytopathogènes, différentes normes ont été définies pour établir le nombre de graines à tester par lot. Par exemple, pour *X. axonopodis* pv. *phaseoli* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* responsables de la gousse commune du haricot la norme est de vérifier l'absence de contamination dans 30 000 graines pour les « zones hors gousse » et 5 000 graines pour les autres zones selon le protocole 7-021 de l'ISTA (Darrasse et al. 2007; Grimault et al. 2014). Chez le haricot, il a été montré que le semis d'un lot de semences contaminé à seulement 0,003 % (1 graine contaminée sur 30 000) par *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pouvait même en l'absence de symptômes contaminer la récolte à un taux plus élevé que dans le lot de semences de base (Darrasse et al. 2007). Pour analyser des lots de 5 000 ou 30 000 graines, il est recommandé d'analyser plusieurs sous-échantillons de taille équivalente ou de tailles dégressives afin d'estimer un taux de contamination avec une probabilité de 95 % à 99 % (Morrison 1999). Pour *X. phaseoli* pv. *phaseoli* et *P. amygdali* pv. *phaseolicola* les protocoles de l'ISTA recommandent une analyse de 5 000 graines de haricot minimum divisées en sous-échantillons de 1000 graines. Plusieurs méthodes permettent de calculer le taux de contamination d'un lot de semences selon la probabilité de détection souhaitée comme la formule de Maury ou les tables de Swaroop (Maury et al. 1986 ; Swaroop 1951). La formule de Maury permet de calculer le taux de contamination en analysant N sous-échantillons de x graines et le taux est calculé selon le nombre de sous-échantillons « sain » (Maury et al. 1986). Les tables de Swaroop se basent sur l'analyse d'un sous-échantillonnage dégressif (par exemple 1 x 50 graines, 5 x 10 graines et 5 x 1 graine) et permettent de calculer un taux de contamination avec un intervalle de confiance selon le nombre de sous-échantillons retrouvés contaminés (Swaroop 1951).



### 3.3. Les méthodes pour tester l'état sanitaire d'un lot de semences

#### 3.3.1. Les analyses sur plantules à partir du semis d'un lot de graines

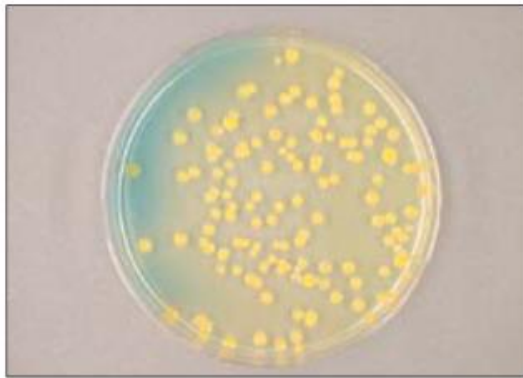
L'état sanitaire d'un lot de semences peut être déterminé par inspection visuelle des plantules après semis d'un échantillon du lot à contrôler en terrine et incubation dans une chambre de culture ou une serre. Ce type de test, aussi appelé test « grow-out » consiste à semer un échantillon du lot de semences dans les conditions optimales à la multiplication de l'agent phytopathogène et au développement de la maladie recherchée. Ainsi, l'expression de la maladie par l'apparition de symptômes spécifiques traduit la présence ainsi que la viabilité de l'agent phytopathogène ciblé. Ce test est ainsi très sélectif car il repose sur la spécificité de l'interaction hôte-pathogène (Gitaitis and Walcott 2007b). En général, les plantules suspectes sont ensuite testées par des outils moléculaires basés sur la PCR pour confirmer l'identité de l'agent phytopathogène responsable des symptômes. Pour sa réussite ce type de test est très dépendant des conditions d'incubation (humidité, température, durée du test, densité du semis, substrat etc.) propres à chaque pathosystème (Gitaitis and Walcott 2007a). Par exemple, pour la détection d'*A. citrulli*, le test doit se dérouler dans des conditions d'humidité relative d'au moins 70 % à des températures comprises entre 30 et 32 °C et il faut être vigilant aux éclaboussures de l'arrosage pouvant mener à des contaminations croisées (Gitaitis and Walcott 2007a). Ce type de test est dépendant de l'œil humain qui inspecte parfois des milliers de plantes successivement afin de reconnaître celles qui montrent les symptômes typiques de la maladie recherchée. Par exemple, pour *A. citrulli*, un minimum de 10 000 plantules par lot doit être évalué (Gitaitis and Walcott 2007a). Par conséquent, un œil averti est primordial pour cette tâche longue et fastidieuse.

#### 3.3.2. Les analyses à partir d'un macérât de graines

##### a) Obtention d'un macérât de graines

La majorité des méthodes utilisées pour tester l'état sanitaire d'un lot de semences se base sur l'analyse du macérât des semences. Les protocoles de macération diffèrent selon les espèces végétales mais souvent ils consistent à faire macérer les graines dans un tampon pendant quelques heures ou toute une nuit à température ambiante ou à 4°C pour permettre la libération des bactéries à partir des espaces intercellulaires, en évitant toutefois leur multiplication pour ne pas biaiser la détermination de la charge. La macération peut être faite sous agitation, en présence d'un agent mouillant de type Tween 20, éventuellement suivie par le broyage des semences. La détection de *P. amygdali* pv. *phaseolicola* sur semences de haricot est faite sur un macérât de graines après trempage une nuit à 4°C dans une solution saline supplémenté de Tween 20 (0,02 % v/v) (protocole 7-023 ISTA 2021, consulté le 03/02/2021). Pour *X. campestris* pv. *campestris* dans les semences de chou préalablement désinfectées à l'eau chaude ou au chlore, la détection se fait sur un macérât après macération des graines sous-agitation pendant 2h30 à température ambiante et un broyage des graines pendant 2 min dans un broyeur à pales (protocole 7-019b ISTA 2021, consulté le 02/03/2021).





**Figure 1.** *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* colonies on MSP plates after 4 d are circular, raised globose, glistening and light yellow, and the medium around the colony turns light yellow.



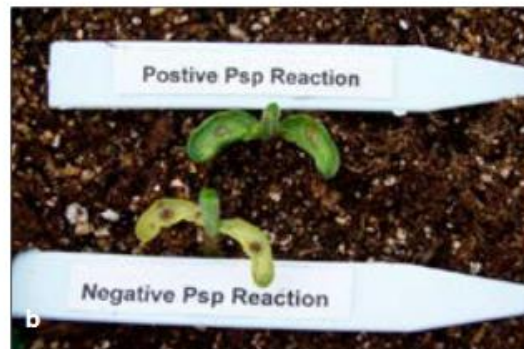
**Figure 2.** *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* colonies on MT plates after 4 d are creamy white, flat, circular and 4.5–5 mm in diameter.



**Figure 3.** Isolation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* by sectoring on KB medium showing white, creamy and flat colonies.



**Figure 4.** Germinated bean seedlings. The method of inoculation.



**Figure 5a, b.** Typical *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* symptoms in a pathogenicity test, indicated as a typical 'greasy' spot (arrows) at the point of inoculation.

Figure 3.4. Exemple d'un workflow établi par l'ISTA pour la détection de *P. amygdali* pv. *phaseolicola* dans des semences de haricot. (d'après le protocole 7-023 ISTA 2021)

### b) Analyses du macérât et identification des clones suspects

A partir d'un macérât, différentes techniques d'analyses peuvent être appliquées en fonction de l'agent phytopathogène recherché. Les techniques les plus courantes sont d'une part l'analyse indirecte du macérât par culture de celui-ci sur un milieu (semi-)sélectif de l'agent phytopathogène recherché. Par exemple, selon le protocole 07-023 de l'ISTA, le macérât obtenu à partir des graines de haricot pour la détection de *P. amygdali* pv. *phaseolicola* doit ensuite être dilué et étalé sur un milieu de culture sélectif (MT ou MSP) et incubés quatre à cinq jours à 28 °C. Les colonies à la morphologie typique sont ensuite recherchées, repiquées sur milieu de culture puis un test de pouvoir pathogène des clones suspectés est effectué sur une variété de haricot sensible à la maladie pour confirmer leur identité (Figure 3.4) (protocole 7-023 ISTA 2021, consulté le 03/02/2021). Des méthodes similaires sont décrites dans les protocoles officiels de l'ISTA pour la détection de *X. campestris* pv. *campestris* sur graines de *Brassica* spp. (7-019b, ITSA 2021) ou *P. syringae* pv. *pisi* sur semences de pois (7-029, ISTA 2021). Il est également possible d'analyser les clones suspects par des tests PCR d'identification comme il est mentionné dans le protocole de la fédération internationale des semences (ISF) pour la détection de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dans les semences de tomate (version 4.3 septembre 2015, ISF) ou dans le protocole ISTA pour *X. campestris* pv. *campestris* dans semences de Brassicacées (protocole 7-019b ISTA 2021, consulté le 02/03/2021).

D'autre part, il existe des analyses directes sur le macérât comme les extractions d'ADN total suivi d'un test de détection moléculaire spécifique de l'agent phytopathogène recherché. Par exemple, l'ISF propose un protocole pour la détection d'*A. citrulli* sur semences de melons, pastèques et courges (version 1.0, 2017, ISF). L'extraction d'ADN se fait sur macérât de graines avec des kits et l'ADN extrait doit être testé par deux ou trois tests q-PCR Taqman (tests Aac21, Aac22 et AcZUP) validés par l'ISF pour la détection d'*A. citrulli*. Un échantillon de semences est considéré positif lorsque l'un des tests est positif. Il est alors nécessaire d'analyser le lot de semences en question par un test grow-out pour confirmer la contamination.

#### 3.3.3. Les outils de détection et d'identification moléculaires

Les méthodes de détection moléculaires, basées sur la PCR, en point final ou en temps réel, voire isothermes, sont aujourd'hui très couramment utilisées pour tester l'état sanitaire des semences (Fatmi et al. 2017). Elles ont nettement amélioré la fiabilité des tests sanitaires et elles ont considérablement raccourci les temps nécessaires aux analyses des lots de semences (Fatmi et al. 2017). D'autres types de tests sont utilisés pour la détection des agents phytopathogènes dans les semences, comme les tests sérologiques, et principalement les tests à dosage immuno-enzymatique (ELISA). Leur seuil de détection est cependant généralement plus élevé et leur spécificité est parfois médiocre. Par exemple, pour la détection de *X. fastidiosa*, la sensibilité analytique des tests ELISA varie de  $10^4$  à  $10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> de *X. fastidiosa* de macérât suivant les espèces végétales analysées. De plus la spécificité est moyenne et entraîne des faux-positifs pour la détection dans certains échantillons de plantes comme *Quercus* et *Platanus* si flore microbienne est importante (Loconsole et al. 2014 ; EPPO 2019). Ce type de tests cède peu à peu la place aux tests moléculaires basés sur le principe de la PCR.

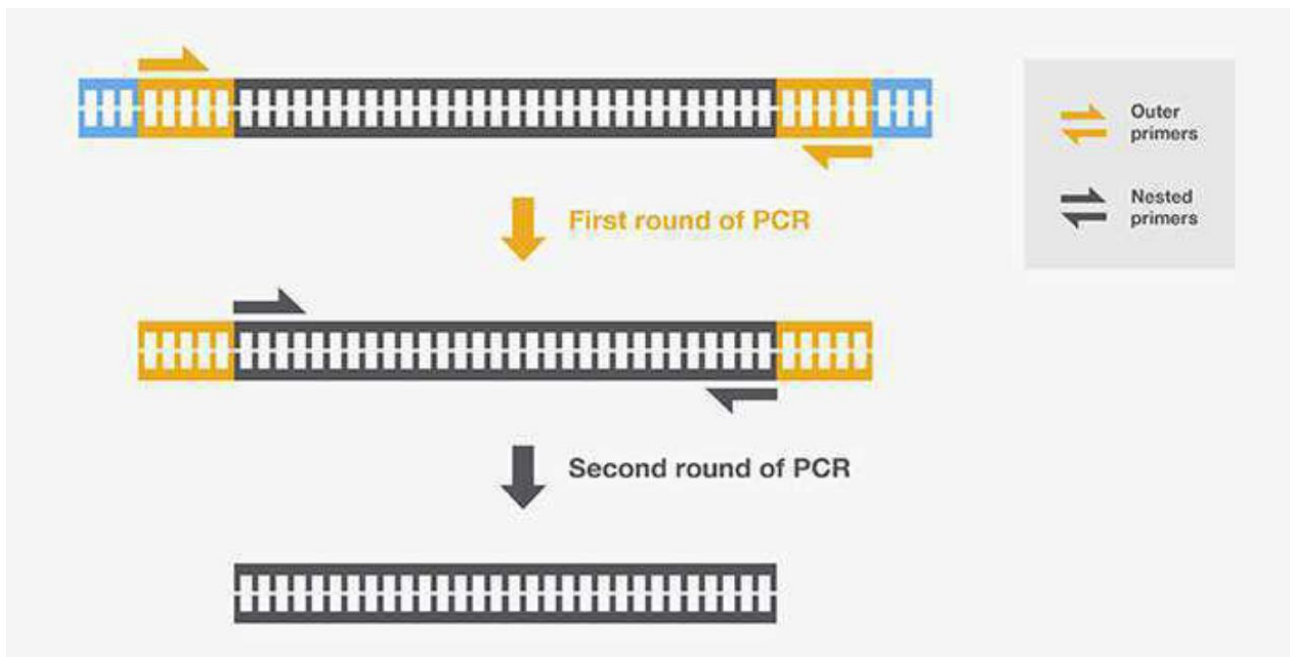


Figure 3.5. Schéma du principe de la PCR nichée. Dans cette méthode, deux paires d'amorces PCR sont conçues : un ensemble d'amorces externes qui flanque une région d'ADN contenant l'amplicon d'intérêt, tandis que le deuxième ensemble (amorces imbriquées) flanque la région précise de l'ADN à amplifier. Les amorces externes sont utilisées dans un premier cycle de PCR pour amplifier la cible avec des régions flanquantes étendues. Le produit de ce premier tour sert ensuite de matrice dans un deuxième tour de PCR avec les amorces imbriquées.

(d'après ThermoFischer, 2018)

### a) Principe de base de la PCR

Les tests moléculaires de détection basés sur le principe de la PCR ciblent une séquence d'ADN d'une longueur définie spécifique d'un ou des agent(s) phytopathogène(s) recherché. Un test PCR comprend plusieurs cycles, chacun constitué de trois étapes successives : dénaturation thermique de l'ADN, hybridation des amorces et élongation. Chaque cycle met en œuvre deux amorces qui définissent, en la bornant, la séquence à amplifier. L'amplification se fait grâce à une enzyme, la Taq polymérase, capable de synthétiser de l'ADN à partir des nucléotides présents dans la réaction en utilisant les produits de chaque étape de synthèse comme matrice pour les étapes suivantes (Jaton and Greub 2007). Ainsi, l'amplification obtenue est exponentielle, et à partir d'une molécule d'ADN, il est possible d'obtenir un milliard de copies de cette même molécule. Après électrophorèse, les molécules amplifiées (amplicons) peuvent être visualisées sur un gel d'agarose à l'aide de molécules fluorescentes (bromure d'éthidium ou Sybr Green) (Jaton and Greub 2007).

La spécificité d'un test PCR est définie selon les principes d'exclusivité et d'inclusivité. L'inclusivité d'un test désigne sa capacité à détecter toutes les bactéries ciblées par le test pour éviter les faux-négatifs. L'exclusivité désigne la capacité d'un test à ne pas détecter des bactéries non-ciblées par le test pour éviter les faux-positifs. L'exclusivité et l'inclusivité d'un test PCR exprimées en pourcentage sont généralement évaluées *in silico* et ensuite, *in vitro* sur des matrices de bactéries cibles et non-cibles soigneusement définies. La PCR a l'avantage d'être spécifique mais elle est également sensible, rapide et reproductible (Jaton and Greub 2007). Pour chaque test PCR développé, la sensibilité analytique (limite de détection exprimée en nombre de copies de génomes par réaction) est déterminée. En général, plus la PCR cible un large spectre de bactérie, moins sa spécificité est bonne en raison de l'utilisation d'amorces dégénérées (par exemple, le remplacement de certaines bases par une inosine) (Jaton and Greub 2007). Pour la détection spécifique d'un pathovar, comme *P. syringae* pv. *japonica*, les seuils de détection de tests PCR sont plus bas autour de  $10^3$  bactéries.mL<sup>-1</sup> (Yoshioka et al. 2020). Pour gagner encore plus en sensibilité et descendre à une détection de  $10^2$  bactéries. mL<sup>-1</sup> le principe de la « nested PCR ou PCR nichée » peut être utilisée pour la détection de ce pathovar (Yoshioka et al. 2020). La PCR nichée consiste à enchaîner deux tests PCR, dont l'ADN source du deuxième correspond à l'amplicon du premier test (Figure 3.5). Cette technique permet la détection à des seuils relativement bas de bactéries phytopathogènes dans des échantillons de plantes asymptomatiques comme cela a été montré pour *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* sur Anthurium, *P. amygdali* pv. *savastanoi* sur olive et *E. amylovora* sur différentes plantes (Robène-Soustrade et al. 2006; Bertolini et al. 2003; Llop et al. 2000). La droplet PCR digitale est une nouvelle technologie qui permet également d'abaisser les seuils de détection comme cela a été montré pour *X. fastidiosa* sur certaines matrices de plantes (Dupas et al. 2019b).

Les tests PCR sont très largement développés et peuvent être utilisés pour tester l'état sanitaire des lots de semences. Par exemple, pour la détection de *Pseudomonas coronafaciens* dans des lots de semences d'avoine des amorces PCR ont récemment été dessinées sur des séquences spécifiques partagées par les souches responsables du grasse à halo de l'avoine (An et al. 2015). Le développement de ces amorces est intéressant pour la détection de *P. coronafaciens* qui est un organisme réglementé de quarantaine dans certains pays qui par conséquent demande une certification des lots de semences commercialisés (An et al. 2015).

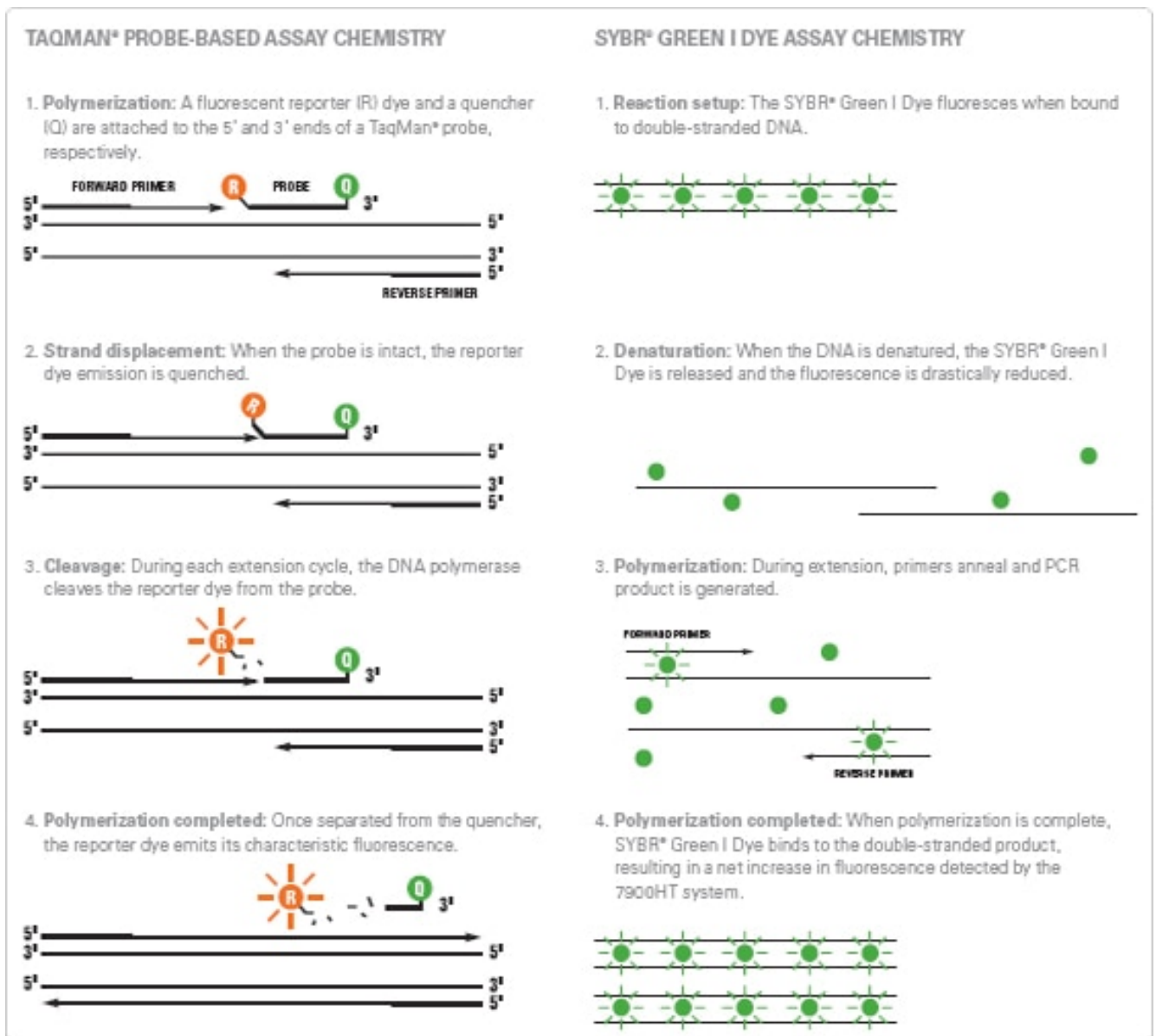


Figure 3.6. Comparaison des de la q-PCR basée sur le principe de la TaqMan ou en SYBR Green. (D'après thermoFisher, 2018)



Des tests PCR sont aussi officiellement proposés dans les protocoles de l'ISTA, par exemple, pour la détection de *X. hortorum* pv. *carotae* l'identification des clones cultivés à partir de macérât de graines se fait avec un jeu d'amorces spécifique qui cible une région de 355 pb (Meng et al. 2004 ; protocole 7-020, ISTA 2021).

### b) Les PCR quantitatives ou en temps réel

La PCR quantitative ou PCR en temps réel (q-PCR) est une variante de la PCR en point final et constitue une méthode plus sensible et plus rapide qui permet la mesure en continu du produit amplifié (Waliullah et al. 2019). La quantification est faite par la mesure de la fluorescence générée lorsqu'une sonde est fixée sur l'ADN amplifié. La quantification de l'agent phytopathogène présente est effectuée à l'aide d'une gamme d'échantillons standards calibrés. Il existe plusieurs types de technologies pour la détection en temps réel dont la technologie SYBR Green et la technologie TaqMan (Figure 3.6). L'un des inconvénients de la technologie SYBR Green est qu'elle détecte l'accumulation de produits PCR spécifiques ou non, pouvant induire des faux-positifs. L'établissement d'une courbe de fusion permet cependant à la fin de l'amplification de contrôler l'absence de produits d'amplification non spécifiques ou de dimères d'amorces. La technologie TaqMan est plus spécifique car elle fait appel à une sonde qui s'hybride à l'ADN double brin ciblé et détecte ainsi uniquement les produits d'amplification spécifiques. Le clivage de la sonde oligonucléotidique TaqMan au cours de chaque passage de la Taq polymérase sera accompagné d'une augmentation de fluorescence causée par le relargage du fluorophore et par le clivage du quencher. La fluorescence sera mesurée au cours de chaque cycle de PCR (Figure 3.6). Des q-PCR TaqMan très sensibles et spécifiques ont été développées pour détecter des bactéries phytopathogènes à partir de lots de semences. Par exemple sur le riz, une q-PCR Taqman permet la détection spécifique de *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) en ciblant un récepteur putatif d'un sidérophore (Zhao et al. 2007). Cet outil est intéressant pour sa capacité à détecter spécifiquement *Xoo* et pas *X. oryzae* pv. *oryzicola* qui est une bactérie phylognétiquement très proche mais responsable d'une autre maladie sur le riz (Zhao et al. 2007). *Pseudomonas avellanae* cause le chancre du noisetier en Europe et une q-PCR Taqman a été mise au point pour détecter cet agent phytopathogène spécifiquement des autres bactéries pathogènes du noisetier dont *P. syringae* pv. *coryli*, *Xanthomonas arboricola* pv. *corylina* (Gervasi and Scortichini 2009). Cette q-PCR Taqman est sensible et permet la détection jusqu'à neuf jours après inoculation de 80 cellules de *P. avellanae* sur une feuille de noisetier (Gervasi and Scortichini 2009).

### c) Le multiplexage des tests d'identification

Il peut être intéressant de combiner au sein d'une même réaction PCR plusieurs couples d'amorces et de sondes portant un marquage différent pour détecter et identifier plusieurs agents phytopathogènes dans un même échantillon. La qPCR multiplex permet de gagner un temps considérable pour la recherche d'agents phytopathogènes puisqu'elle combine la détection et l'identification de plusieurs organismes très différents en une seule réaction. Ainsi, un outil q-PCR tetraplex (quatre cibles) a été récemment développé pour détecter *X. fastidiosa* et identifier la ou les sous-espèces infectant un échantillon végétal (Dupas et al. 2019a). Les couples d'amorces spécifiques des sous-espèces (*pauca*, *fastidiosa*, *morus* et *multiplex*) ont été dessinés sur des séquences partagées par tous les génomes de chaque sous-espèce et sur les séquences partagées par toutes les sous-espèces (Dupas et al. 2019a). La q-PCR multiplex est modulable et permet de combiner jusqu'à quatre couples d'amorces, car à l'heure actuelle la plupart des appareils ne détectent que quatre fluorochromes.





L'outil développé permet de détecter et d'identifier les différentes sous-espèces de *X. fastidiosa* à un seuil compris entre  $10^5$  et  $10^3$  ufc/mL par échantillon de plante selon l'espèce végétale analysée (Dupas et al. 2019a). Le seuil de détection varie considérablement d'une espèce végétale à l'autre à cause d'inhibiteurs de réaction propre à chaque espèce végétale dont des polyphénols, des polysaccharides, de la pectine ou du xylane (Dupas et al. 2019a). Ces outils multiplex permettent un suivi épidémiologique efficace d'agents phytopathogènes réglementés de quarantaine comme *X. fastidiosa*. Récemment, un outil q-PCR multiplex permet de détecter et d'identifier différents agents phytopathogènes d'espèces différentes infestant la tomate dont *P. syringae* pv. *tomato*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* et *Xanthomonas* spp. (Peňázová et al. 2020).

#### d) Les tests bio-PCR

Pour augmenter le seuil de sensibilité lors d'une réaction PCR et éviter les inhibiteurs de réaction PCR, il est possible de passer par un enrichissement bactérien par culture du macérât sur un milieu plus ou moins sélectif des agents phytopathogènes recherchés avant d'effectuer la PCR. Cette technique est appelée Bio-PCR et elle a également l'avantage de détecter uniquement les bactéries vivantes et cultivables présentes dans l'échantillon à tester et permet de s'affranchir des protocoles d'extraction d'ADN. Toutefois, les inconvénients majeurs de cette méthode sont qu'elle ne permet pas une quantification exacte des bactéries présentes dans un échantillon, qu'elle est dépendante de la capacité des bactéries recherchées à être cultivées et cette méthode est plus long à obtenir que la PCR classique ou en temps réel puisqu'elle nécessite des étapes de culture sur plusieurs jours. Cette technique est utilisée pour la détection de différentes bactéries phytopathogènes. Par exemple, pour la détection de *Xanthomonas citri* pv. *viticola* responsable du chancre de la vigne au Brésil, l'enrichissement sur un milieu de culture semi-sélectif (milieu NYDAM) permet une amélioration significative de la sensibilité de détection en q-PCR. Ainsi, il est ainsi possible de détecter  $10$  bactéries.mL<sup>-1</sup> grâce à l'enrichissement préalable sur milieu contre  $10^2$  bactéries.mL<sup>-1</sup> sans enrichissement avant la q-PCR (Villela et al. 2019). De nombreux protocoles de Bio-PCR ont été développés pour détecter différentes bactéries pathogènes dans des lots de semences comme *P. amygdali* pv. *phaseolicola*, *A. citrulli*, *X. oryzae* pv. *oryzae* et *X. campestris* pv. *campestris* (Schaad et al. 2007 ; Song et al. 2004 ; Sakthivel et al. 2001 ; Laala et al. 2015).

#### e) La détection en PCR des bactéries viables mais non cultivables (VNC)

Dans certains cas, les bactéries sont dans un état VNC dans les semences suite à des stress (Jiang et al. 2016). Il n'est alors pas possible de cultiver ces bactéries sur milieux ce qui peut entraîner l'obtention de faux-négatifs pour les échantillons analysés en Bio-PCR. L'état VNC est induit par des stress chimiques, physiques ou environnementaux et permettraient aux bactéries de survivre plus longtemps dans ces conditions (Oliver 2005). Il peut être intéressant d'être en mesure de différencier les bactéries mortes des bactéries vivantes dans un échantillon de semences afin de trancher sur la contamination « réelle » d'un lot de semences. Pour détecter les bactéries dans un état VNC, plusieurs méthodes ont été développées. Le traitement des échantillons avant extraction d'ADN avec des agents intercalants tels que le propidium monoazide (PMA) ou le monoazide d'éthidium (EMA) permet de n'amplifier l'ADN que des cellules aux membranes intègres, donc viables. Ces molécules ayant un fort encombrement stérique, elles ne peuvent pénétrer que dans les cellules bactériennes mortes ou dont les membranes sont endommagées. Les molécules se fixent sur l'ADN à l'obscurité et leur liaison à l'ADN double-brin devient covalente après exposition à la lumière (Nocker et al. 2006; Riedy et al. 1991).

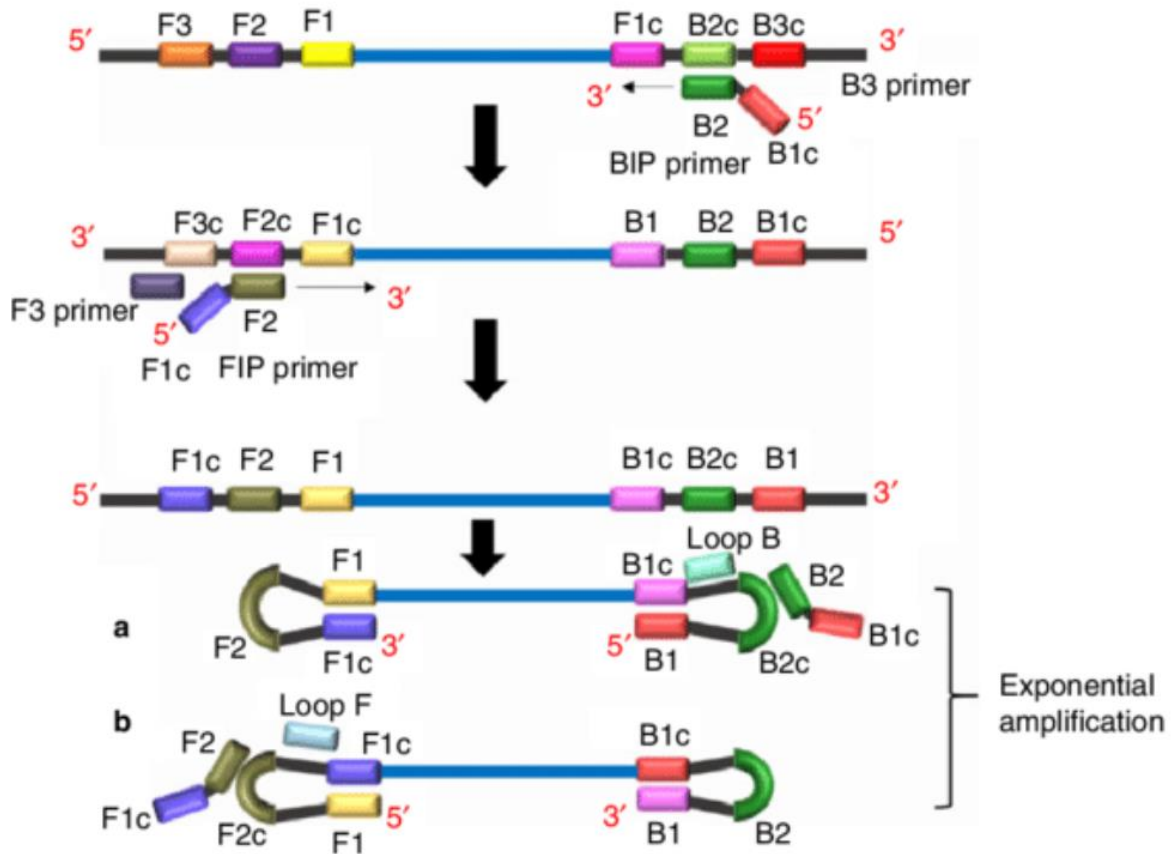


Figure 3.7. Principe de la PCR isotherme LAMP (d'après Wong et al. 2017). Cette méthode utilise plusieurs couples d'amorces composés d'une courte séquence nucléotidique présente en extrémité du fragment ciblé (nommée F1c et B1c). A la fin de chaque cycle d'amplification l'extrémité ayant initié l'amplification se replie et forme une boucle. Le nouveau fragment formé contient de nombreux sites pour initier la synthèse d'un nouveau brin d'ADN (nommés F1, F2, B1 et B2). L'amplification se poursuit ensuite simultanément à partir des différents sites de fixation des amorces amplifiant la portion d'ADN ciblée de façon exponentielle.

L'ADN marqué ne peut plus être amplifié par PCR, ainsi les bactéries mortes ne seront pas détectées par la suite. Et donc, seul l'ADN présent dans des cellules viables dont les membranes sont intègres pourra être amplifié. Des protocoles ont été développés avec ces techniques couplées à la q-PCR comme par exemple pour la détection de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* et de *P. syringae* pv. *tomato* sur semences de tomates (Han et al. 2018; Chai et al. 2020) et d'*A. citrulli* sur semences de pastèque (Tian et al. 2016). Cette méthode a également été développée pour la détection de cellules de *P. syringae* pv. *lachrymans* viables dans les semences de concombre (Meng et al. 2016). Le test proposé utilisant le PMA et la qPCR permet un gain de temps comparé à la méthode Bio-PCR et permet la détection de  $3,25 \times 10^2$  ufc/ml en suspension bactérienne et de  $10^3$  à  $10^4$  ufc/g de graines naturellement contaminées (Meng et al. 2016).

#### f) Les tests reposant sur une PCR isotherme

La PCR loop-mediated isothermal amplification (LAMP) et la PCR recombinaise polymerase amplification (RPA) sont d'autres types de PCR réalisées à températures constantes (isothermes). Ces PCR sont intéressantes car elles peuvent être directement utilisées dans les parcelles, ne nécessitent pas de purification de l'échantillon à analyser et sont généralement peu coûteuses, rapides, sensibles et spécifiques. Des PCR LAMP ont récemment été développées pour la détection d'agents phytopathogènes comme *P. syringae* pv. *tomato* sur tomate ou *P. syringae* pv. *actinidiae* sur kiwi (Chen et al. 2020; Ruinelli et al. 2017). Au niveau des seuils de détection, il est possible de détecter  $1.05 \times 10^3$  bactéries.mL<sup>-1</sup> de *P. syringae* pv. *tomato* sans extraction d'ADN préalable, ce qui est 10 000 fois supérieur à la PCR conventionnelle chez cette bactérie (Chen et al. 2020). Les échantillons de tomate naturellement contaminés par la bactérie sont également détectés par la PCR LAMP aussi efficacement que les méthodes de détection conventionnelles (Chen et al. 2020). La PCR RPA a récemment été développée et commercialisée par la société Agdia ([www.agdia-emea.com](http://www.agdia-emea.com)) pour la détection de *X. fastidiosa*, (Rugang Li et al. 2017). Elle a également été développée pour la détection de *Xanthomonas gardneri*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, et *X. vesicatoria* sur la tomate (Strayer-Scherer et al. 2018) ou de *Dickeya solani* sur pomme de terre (Ivanov et al. 2020).

#### 3.3.4. La mise au point de nouveaux outils moléculaires

Grâce au séquençage de génomes complets de bactéries, la génomique comparative permet de mettre au point des outils d'identification moléculaire de certains groupes de bactéries (pathovar, ST ou souches) à des fins d'épidémiologie-surveillance des maladies. C'est le cas des espèces et des sous-espèces de *X. fastidiosa* (Dupas et al. 2019a). Pour *P. syringae* pv. *actinidiae*, une qPCR multiplex permet d'assigner les souches à trois haplotypes différents (l'haplotype Japonais/Coréen, l'haplotype Européen et l'haplotype Chinois) (Balestra et al. 2012). Cet outil d'identification a pu être mis au point grâce à des analyses de génomiques comparatives révélant des régions moléculaires spécifiques à chacun des haplotypes d'intérêt (Mazzaglia et al. 2012).



### 3.4. Les traitements pour décontaminer les semences

La détection d'un lot de semences contaminé par un agent phytopathogène implique soit la destruction du lot de semences, son déclassement ou son traitement pour le décontaminer. Différentes méthodes de décontamination des semences sont disponibles et l'enjeu est de pouvoir éliminer tous les agents phytopathogènes sans impacter les qualités germinative et physiologique des graines.

#### 3.4.1. Les traitements physiques

La thermothérapie est une méthode physique qui permet d'éliminer les agents phytopathogènes sensibles à la chaleur qui sont localisés à l'extérieur et à l'intérieur de la graine (Grondeau et al. 1994 ; Singh et al. 2020). Le traitement par la chaleur peut s'effectuer par chaleur sèche, par bain d'eau chaude ou par contact avec de la vapeur. Cette méthode est efficace pour certaines espèces végétales et contre certains agents phytopathogènes fongiques et bactériens à conditions d'ajuster le protocole pour pouvoir désinfecter les graines sans impacter leur qualité physiologique et germinative. Les températures utilisées sont généralement comprises entre 57°C et 60°C pendant une courte période de 10 min mais le succès de la méthode peut varier selon les agents phytopathogènes. Une température plus chaude sur une plus longue période de temps serait plus efficace mais endommage la qualité des graines (Buck and Walcott 2003). Cette technique est plus ou moins adaptée pour les semences de tomates, de tabac, de riz, d'orge, de carotte, de concombre, de crucifères, de courges et de coton afin de les désinfecter des bactéries phytopathogènes appartenant aux genres *Xanthomonas*, *Clavibacter* et *Pseudomonas* (Grondeau et al. 1994 ; Singh et al. 2020). Sur graines d'orge, un traitement de chaleur sèche à 71 °C pendant 11 jours permet l'éradication de *X. campestris* pv. *translucens* des lots de graines contaminés en ayant un impact assez faible sur la germination (Fourest et al. 1990). Néanmoins certaines bactéries sont très difficiles à éliminer comme par exemple *A. citrulli*. En effet, une température sèche de 85°C est nécessaire pendant sept jours pour une désinfection complète des graines de courge, ce qui par conséquent impacte la germination des graines (Kubota et al. 2012). La thermothérapie est également utilisée pour traiter les lots de semences contaminés par des agents fongiques comme *Phoma* spp. et *Alternaria* spp. sur chou (Nega et al. 2003; Cardoso et al. 2020).

De très nombreux autres traitements physiques sont utilisables pour désinfecter les semences contaminées par les agents phytopathogènes. La désinfection des semences par application de forte pression hydrostatique est également une possibilité. Cette technique est particulièrement développée pour désinfecter des semences destinées à l'alimentation humaine car elle ne dénature pas la qualité gustative des produits et ne laisse pas de résidus potentiellement toxiques pour la santé. Les semences de luzerne (alfalfa) sont par exemple consommées juste après germination (jeunes pousses) mais des cas de contaminations par *Escherichia coli* et *Salmonella* provenant de ces semences consommées ont engendré des intoxications (Fett et al. 2005). Un traitement des semences de luzerne alfalfa à 500 MPa pendant 2 min à 40°C permet une réduction de la charge bactérienne d'au moins cinq log de la population d'*E. coli* sur les semences sans impacter la germination (Neetoo et al. 2009). Les radiations gamma sont aussi utilisées pour la désinfection des semences destinées à l'alimentation humaine. Cette technique est particulièrement efficace contre les champignons produisant des mycotoxines néfastes pour la santé humaine (Aziz et al. 2004). Elle est également utilisée sur semences d'alfalfa pour réduire les charges bactériennes totales portées par semences.



Ainsi, après une exposition à 2kGy à 20°C la charge totale diminue de trois log cfu.g<sup>-1</sup> de semences (Rajkowski and Thayer 2001). Toutefois, à des doses plus élevées (> 3 kGy), les rayons gamma affectent le rendement des plantes après germination (Rajkowski and Thayer 2001). Une autre technique de désinfection consiste à utiliser des micro-ondes sur les semences pour les désinfecter. Sur des semences de tabac artificiellement inoculées avec *Pectobacterium carotovorum*, un traitement à 625 watts pendant 20 min élimine les cellules bactériennes sans impacter la germination des graines (Hankin and Sands 1977). Néanmoins, cette technique est plus ou moins adaptée à certaines espèces végétales puisque sur semences de haricot ou de chou, la germination est détériorée après traitements aux micro-ondes pendant 2 min ou 5 min (Hankin and Sands 1977).

### 3.4.2. Les traitements chimiques

Les méthodes chimiques sont limitées par le contexte réglementaire. Certains traitements sont autorisés comme l'utilisation d'hypochlorite de calcium ou le peroxyde d'hydrogène pour désinfecter les semences. Sur le chou, le standard pour décontaminer les graines infectées par des agents phytopathogènes (*Salmonella* spp. et *Escherichia coli*) est d'appliquer un traitement de 20 000 ppm d'hypochlorite (Ding et al. 2013). Toutefois, les traitements à base d'hypochlorite ne sont pas toujours efficaces pour décontaminer certains agents phytopathogènes. Sur les semences de pastèque, la désinfection à base de clorox (eau de javel) dilué au 10<sup>ème</sup> pendant 20 min à 50°C ne permet pas d'éliminer toutes les contaminations et impacte la germination (Feng et al. 2009). Plus récemment, des formulations à base d'extraits de plante ou des huiles essentielles ont montré une certaine efficacité pour traiter des graines contaminées par des bactéries (Van Der Wolf et al. 2008). Certaines huiles essentielles sont riches en terpènes qui interfèrent avec différentes fonctions du métabolisme des bactéries comme la respiration, la membrane cytoplasmique des bactéries à gram-positive, l'acquisition des nutriments et l'activité ATPase (Van Der Wolf et al. 2008). D'autres composés antibactériens sont présents dans les huiles essentielles comme les phénols et les alcools (Lo Cantore et al. 2009). L'huile essentielle de thym, de cannelle et de clou de girofle concentrée à 0,1% réduit la charge bactérienne associées aux graines de plus de 99% sans impacter la qualité des semences pour un trempage de moins d'une heure (Van Der Wolf et al. 2008). L'eugenol est un phénol qui permet une réduction de la bactérie *X. phaseoli* pv. *phaseoli* pv. *fuscans* sur semences de haricot de  $2,6 \times 10^6$  ufc.graine<sup>-1</sup> à  $7,0 \times 10^2$  ufc.graine<sup>-1</sup> après application d'une dose à 4mg/mL pendant 20 min (Lo Cantore et al. 2009). L'application d'eau électrolysée sur les semences ou sur les plantes en végétation a un effet antibactérien (Forghani 2019). Sur pastèque, un trempage dans de l'eau électrolysée acide pendant 20 min élimine la bactérie *A. citrulli* sans impacter la germination des semences (Feng et al. 2009). D'autres méthodes de désinfections chimiques sont utilisées dans le monde comme la désinfection avec des solutions à base de cuivre, des solutions antibiotiques ou autres.





### 3.4.3. Les traitements biologiques

Le traitement biologique peut consister à utiliser des antagonistes visant à inhiber un agent pathogène ciblé. Cette technique appelée bio-priming est fréquemment utilisée pour le contrôle de certains champignons transmis par les semences (Costa Carvalho et al. 2014; Jensen et al. 2004; Mao et al. 1997; Pengnoo et al. 2006). Sur pois chiche, le traitement des graines avec une formulation constituée de *P. fluorescens* permet de limiter le développement du champignon *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* et d'augmenter les rendements (Khan et al. 2004). Chez les bactéries, il a été montré qu'un traitement des graines de tomate avec *Rahnella aquatilis* réduit la sensibilité à *Xanthomonas vesicatoria* (El-Hendawy et al. 2005).



## 4. Le complexe d'espèces *Pseudomonas syringae*

### 4.1. Taxonomie

#### 4.1.1. Définitions, concepts et notions

##### a) La taxonomie

La taxonomie décrit la diversité des êtres-vivants, regroupe les taxons proches, les classe et les nomme. En bactériologie, la taxonomie est utilisée pour donner un cadre clair permettant de comprendre les relations entre les bactéries et de communiquer efficacement sur celles-ci (Bull and Koike 2015). La taxonomie est dynamique et instable puisqu'elle repose sur des hypothèses pour établir les relations des organismes au fur et à mesure de leur découverte et dépend des progrès technologiques permettant d'apprécier et de caractériser la diversité des bactéries (Bull and Koike 2015).

La taxonomie contient trois sous-disciplines : l'identification, la classification et la nomenclature. Ainsi, une bactérie inconnue est identifiée et assignée à un taxon déjà décrit ou non (Bull and Koike 2015). Dans le cas où la bactérie ne correspond à aucun taxon déjà décrit, des méthodes permettent de classer et de nommer les nouveaux taxons selon des règles précises de nomenclature (Bull and Koike 2015; International Code of Nomenclature of Prokaryotes 2019). Le code international de la nomenclature des procaryotes (ICNP) donne les règles de dénomination des taxons bactériens selon leur rang. Il a été créé en 1958 et il est régulièrement révisé, la dernière révision date de 2008. La nomenclature moderne dépend des « Listes des noms bactériens approuvées » (LPSN) qui retiennent uniquement les taxons bactériens suffisamment bien décrits (avec une souche « type » décrivant l'espèce) et respectant les règles du code de l'ICNP. Ainsi, depuis sa création en 1980, environ 2 000 noms ont été acceptés par la LPSN après révision de plus de 40 000 noms pour désigner des taxons bactériens accumulés depuis plus de 200 ans. En phytobactériologie, la dernière mise à jour effectuée par le « International Society of Plant Pathology Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria » date de 2012 (Bull et al. 2014).

##### b) Le concept de l'espèce bactérienne

L'espèce constitue le rang de base en taxonomie et de nombreuses espèces bactériennes ont été nommées. Néanmoins, la définition de l'espèce bactérienne et sa délimitation est une source de débats de longue date dans la communauté scientifique (Cohan 2002; Fraser et al. 2009; Parks et al. 2020). En biologie, le concept d'espèce a été défini : « Une espèce est un groupe de populations naturelles au sein duquel les individus peuvent, réellement ou potentiellement, échanger du matériel génétique; toute espèce est séparée des autres par des mécanismes d'isolement reproductif » (Mayr 1943). Le concept d'espèce décrit une base théorique pour laquelle la diversité biologique est structurée en unités génétiques distinctes (Baltrus et al. 2017). Les unités génétiques distinctes servent d'unité de base dans la classification et elles aident à comprendre la diversité (Bull and Koike 2015).



Cependant, ce concept d'espèce est difficilement applicable aux bactéries qui se reproduisent de façon asexuée, principalement clonale, mais qui ont la capacité d'échanger du matériel génétique entre elles par recombinaison et transferts horizontaux. En effet, la recombinaison brouille les signaux génétiques des lignées et supprime toute histoire généalogique commune au génome dans son ensemble (Baltrus et al. 2017).

Plusieurs concepts d'espèces sont proposés pour désigner les unités de base significatives (De Queiroz 2007). Trois concepts d'espèces sont particulièrement importants en bactériologie, il s'agit de l'espèce biologique, de l'espèce évolutive et de l'espèce écologique (Bull, conférence APS meeting 2020 ; De Queiroz 2007). Une espèce biologique repose sur le flux de gènes et l'échange d'ADN entre les unités, ainsi selon ce concept, deux unités qui échangent du matériel appartiennent à la même espèce. Une espèce évolutive est identifiée comme une unité distincte en phylogénie. Une espèce écologique correspond à une unité partageant une même niche écologique. La prise en compte de ces différents concepts basés à des niveaux biologiques, génomiques et écologiques renforce la définition des espèces bactériennes (Lassalle et al. 2011).

### c) La notion de complexe d'espèces

Certaines espèces bactériennes sont difficilement distinguables en unités clairement délimitées. Les complexes d'espèces ont traditionnellement été définis comme des groupes d'espèces étroitement apparentées qui sont difficiles à distinguer phénotypiquement et dont la recombinaison entre les lignées est suffisamment élevée pour brouiller les limites taxonomiques (Dillon et al. 2019b). Au sein d'un complexe d'espèces, certaines populations sont suffisamment différenciées pour être séparées en plusieurs espèces, mais les limites de ces espèces restent assez diffuses et elles n'ont pas d'isolement reproductif complet (Alagona 2016). Un complexe d'espèces bactériennes peut être défini comme composé des bactéries «généralistes» avec des modes de vie sympatriques, un haut niveau de transferts horizontaux de gènes, un grand pangénome (ensemble des gènes des individus d'une espèce) et un nombre important d'opérons ribosomiaux (Georgiades and Raoult 2011). Un isolement d'une bactérie spécialisée dans une nouvelle niche ou une réduction stochastique de la taille de la population conduira à la création d'une véritable espèce, qui se définirait comme un organisme spécialisé dans une niche donnée qui présente un mode de vie allopatrique, un pan-génome réduit et un nombre réduit d'opérons ribosomiaux (Georgiades and Raoult 2011).

Les définitions données pour un complexe d'espèces bactériennes s'appliquent bien au cas des souches « *P. syringae* ». En effet, au sein du complexe d'espèces *P. syringae*, de nombreuses souches sont des agents pathogènes généralistes et possèdent une gamme d'hôtes étendue à plusieurs espèces végétales (Morris et al. 2019). De plus, au sein du complexe d'espèces, les souches appartenant à différentes lignées génétiques partagent des niveaux élevés de recombinaison et de transferts horizontaux (Dillon et al. 2019b). Enfin, ces souches partagent des niches écologiques (Dillon et al. 2019b). Au sein du complexe d'espèces *P. syringae*, il est difficile d'identifier des unités clairement délimitées à la fois génotypiquement et phénotypiquement.

Tableau 4.1. Terminologie utilisée pour les désignations infrasubspécifiques. (d'après l'annexe X du code international de nomenclature des procaryotes)

Preferred name	Synonym(s)	Notes
Biovar	Biotype, physiological type	Biochemical or physiological properties.
Chemoform	Chemotype	Chemical constitution.
Chemovar		Production or amount of production of a particular chemical.
Cultivar		A cultivated strain with special properties.
<i>forma specialis</i> (abbreviation, f.sp.)	Special form	A parasitic, symbiotic, or commensal microorganism distinguished primarily by adaptation to a particular host or habitat. Named preferably by the scientific name of the host in the genitive.
Morphovar	Morphotype	Morphological characteristics.
Pathovar	Pathotype	Pathogenic reactions in one or more hosts. For recommendations on designating pathovars and use of designations when reviving names see Dye <i>et al.</i> (1980) in Appendix 3.
Phagovar	Phagotype, lysotype	Reactions to bacteriophage.
Phase		Restricted to well-defined stages of naturally occurring alternating variations.
Serovar	Serotype	Antigenic characteristics.
State		Colonial variants, e.g., rough, smooth, mucoid (may be defined antigenically).



Ainsi, le groupe génétique nommé clade 2b du complexe d'espèces *P. syringae* rassemble des souches très proches sur la base des séquences génomiques mais il n'y a pas de cohérence phénotypique puisque certaines de ces souches sont des agents phytopathogènes spécialistes de certaines plantes, d'autres sont des agents phytopathogènes généralistes à large gamme d'hôtes et d'autres sont associées à des environnements très diversifiés comme les substrats, les lacs et les rivières (Berge et al. 2014; Monteil et al. 2016; Morris et al. 2019; Pietsch et al. 2017).

D'autres complexes d'espèces bactériennes sont actuellement définis. Par exemple, le complexe d'espèces *Burkholderia cepacia* rassemble 24 groupes de souches proches qui sont largement distribués dans l'environnement et qui occupent diverses niches écologiques dont le sol, l'eau et la rhizosphère des plantes (Tavares et al. 2020). Les souches appartenant à ce complexe d'espèces sont très diverses puisque certaines sont bénéfiques pour les plantes, d'autres sont pathogènes de l'homme et d'autres sont responsables de maladies sur les plantes (Tavares et al. 2020).

#### d) Les pathovars, une sous-division de l'espèce

En phytopathologie, des niveaux infrasubspécifiques (sous le rang d'espèce) sont définis dans une annexe de l'ICNP comme le pathovar, le biovar, le mophovar, le chemovar, le serovar et le phagovar (Tableau 4.1) (International Code of Nomenclature of Prokaryotes, 2019). Ces niveaux infrasubspécifiques n'ont pas de valeur taxonomique et ne sont pas couverts par le code de l'ICNP ni par la LPSN. Néanmoins, l'ICNP encourage l'application des désignations infraspécifiques comme le pathovar. Ainsi, le comité de taxonomie des bactéries phytopathogènes de la société internationale de pathologie des plantes (ISPP) définit des standards pour nommer les pathovars au sein des espèces bactériennes (International Society for Plant Pathology, consulté le 27/01/2021). Le pathovar désigne une souche ou un ensemble de souches ayant les mêmes caractéristiques ou des caractéristiques similaires, différenciées au niveau infrasubspécifique des autres souches de la même espèce ou sous-espèce sur la base d'une pathogénie distinctive sur un ou plusieurs hôtes végétaux (International Society for Plant Pathology, consulté le 27/01/2021, Dye et al. 1980). Par exemple, *P. syringae* pv. *actinidiae* et *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* partagent le même hôte (kiwi) mais induisent des symptômes différents (Cunty et al. 2015b, 2016). Les pathovars *P. syringae* pv. *maculicola* et *P. syringae* pv. *alisalensis* sont tous les deux pathogènes du brocoli mais le pathovar *maculicola* est pathogène des Crucifères alors que le pathovar *alisalensis* possède un gamme d'hôtes plus large, et est pathogène des Crucifères, de l'avoine, de la tomate, du brome caréné et de la fléole des prés (Cintas et al. 2002). Au sein du complexe d'espèces *P. syringae*, plus d'une soixantaine de pathovars ont été décrits (Young 2010, 1991). La distinction des pathovars est particulièrement importante pour le suivi épidémiologique des maladies et la gestion des agents phytopathogènes qui en sont responsable. La désignation des pathovars aide aussi à la communication entre les phytopathologistes et les acteurs du monde agricole et enfin, elle est essentielle pour la réglementation et le contrôle des agents phytopathogènes (Bull et al. 2008; Bull and Koike 2015). La commission européenne définit la liste officielle des bactéries réglementées de quarantaine (ORQ) ou n'étant pas de quarantaine (ORNQ) et mentionne plusieurs pathovars qui font l'objet de contrôles comme *P. syringae* pv. *persicae* et *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* sur plants de *Prunus* spp. et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* dans les semences de haricot (Règlement d'exécution UE 2019/2072, 2019).



#### 4.1.2. Les méthodes utilisées pour la taxonomie de *P. syringae*

Parallèlement aux concepts d'espèces, des méthodes permettent de délimiter les espèces, d'établir les relations phylogénétiques entre les organismes et de mettre en évidence la diversité. Historiquement, les espèces ont été délimitées en utilisant des méthodes basées sur des critères phénotypiques et biochimiques puis l'essor des outils moléculaires a permis d'utiliser de nouveaux critères pour définir les espèces et mettre à jour la taxonomie bactérienne. Aujourd'hui la classification standard des taxons bactériens repose sur des approches polyphasiques incorporant des caractéristiques phénotypiques, biochimiques et génétiques (Bull and Koike 2015).

##### a) Les méthodes basées sur le phénotype bactérien

Plusieurs critères phénotypiques sont utilisés pour différencier les souches du complexe d'espèces *P. syringae* (Berge et al. 2014). Les tests biochimiques, les analyses de profils nutritionnels, la production de phytotoxines, la production de sidérophore ou encore le pouvoir glaçogène sont couramment utilisées pour comparer les phénotypes des bactéries du complexe d'espèce *P. syringae*. Historiquement, les tests biochimiques du LOPAT ont été très utilisés et sont basés sur cinq tests majeurs : la production de Levane, l'activité Oxydase, la production d'enzymes pectinolytique déterminée par la capacité à entrainer une pourriture molle sur Pommes de terre, la production d'Arginine dihydrolase et la réaction hypersensible sur Tabac (Lelliott et al. 1966). Les analyses des profils nutritionnels les plus utilisés chez *P. syringae* consistent en des tests de dégradation de l'esculine, d'acidification du saccharose ou l'utilisation du D- tartrate (Berge et al. 2014). Les analyses standardisées (système BIOLOG) permettent également de déterminer les profils métaboliques des bactéries à gram-négatif en évaluant leur capacité d'utilisation de 95 sources de carbone (Rüger and Krambeck 1994; Balmeles-Grottes 1993). La fluorescence des souches du complexe d'espèces *P. syringae* est évaluée sur un milieu pauvre en fer (milieu B de King, King et al. 1954) et permet de différencier les souches produisant un sidérophore (pyoverdine) de celles qui n'en produisent pas (King et al. 1954). La production de toxines comme la syringomycine est évaluée sur milieu SRM où la zone d'inhibition entre la colonie de la souche testée et le champignon *Geotricum candidum* est mesurée (Berge et al. 2014). La capacité du pouvoir glaçogène des souches du complexe d'espèces *P. syringae* est évaluée à partir de microgouttes de suspensions bactériennes déposées sur un morceau d'aluminium en contact avec des bains froids de -2 à -8°C (Berge et al. 2014).

Actuellement, les critères de distinction phénotypiques sont essentiels pour décrire une nouvelle espèce bactérienne. Néanmoins, les critères phénotypiques utilisés seuls ne sont pas suffisants pour la taxonomie (Berge et al. 2014). Il est alors nécessaire d'utiliser d'autres approches se basant sur l'analyse génomique des bactéries pour différencier les espèces.

##### b) Les méthodes basées sur le génome bactérien

L'hybridation ADN ADN (DDH) se base sur les propriétés d'appariement des bases complémentaires des acides nucléiques. La comparaison s'effectue deux à deux (en général avec une souche type d'une espèce) et permet de mesurer la similarité entre les séquences d'ADN génomiques de deux organismes.



Les seuils appliqués pour que deux souches appartiennent à la même espèce sont une homologie d'au moins 70 % d'hybridation et une différence de température de fusion des hybrides ( $\Delta T_m$ ) inférieur à 5°C (Gardan et al. 1999). Cette technique permet classer les bactéries au sein d'espèces génomiques (genomospecies). Les analyses DDH ont largement été utilisées dans les années 1990 pour la taxonomie bactérienne dont celle du complexe d'espèce *P. syringae* (Gardan et al. 1999) ou *Xanthomonas* (Vauterin et al. 1995). Néanmoins, les analyses DDH sont très lourdes à mettre en œuvre, ne sont pas très facilement reproductibles entre laboratoires, elles ne prennent pas en compte le niveau en dessous de l'espèce et elles ne sont pas adaptées à l'identification des espèces (Bull and Koike 2015).

Le séquençage de gènes est rapide, désormais facilement accessible et permet les comparaisons inter-laboratoires, les données sont de plus dites portables, car échangeables entre laboratoire grâce à des bases de données. Les analyses de l'ADN<sub>r</sub> 16S permettent de construire des phylogénies robustes et de comprendre les relations entre les organismes. L'ADN<sub>r</sub> 16S est le plus couramment utilisé pour la classification et l'identification des bactéries en raison de son universalité et de sa facilité d'utilisation. A partir de séquences obtenues grâce à des amorces PCR universelles, les comparaisons s'effectuent par recherches de similarités informatiquement par outil BLAST (basic local alignment search tool). Pour des seuils supérieurs à 98,65 %, deux souches sont considérées comme apparentant à la même espèce (Kim et al. 2014). Toutefois, les analyses de l'ADN<sub>r</sub> 16S initialement sélectionnées pour les études phylogénétiques manquent de pouvoir discriminant pour différencier les espèces dans de nombreux genres comme *Aeromonas*, *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Streptococcus* (Janda and Abbott 2007).

Les analyses de multi-locus sequence analysis (MLSA) reposent sur les séquences polymorphiques issues de gènes de ménage codant pour des fonctions de base dans la cellule qui sont présents chez tous les individus du groupe étudié (Glaeser and Kämpfer 2015). L'analyse des séquences pour chacun des gènes de ménage individuellement ou concaténés permet de construire des phylogénies robustes pour assigner des souches à des taxons précédemment décrits et révéler les relations phylogénétiques entre les souches. La MLSA est particulièrement puissante pour étudier les relations entre les souches d'une population à un niveau intraspécifique et infrasubspécifique comme pour le complexe d'espèces *P. syringae* (Berge et al. 2014). Son niveau de résolution est donc plus fin que celui des analyses basées sur l'ADN<sub>r</sub> 16S.

Les progrès des technologies de séquençage de l'ADN et l'utilisation des données de séquence du génome ont permis un élan important dans la taxonomie des procaryotes. Les analyses taxonomiques reposant sur des comparaisons de séquences du génome entier sont à présent accessibles et couramment utilisées pour déduire des relations génétiques entre des bactéries étroitement liées et construire des phylogénies. Les comparaisons de l'identité nucléotidique moyenne (ANI) et les calculs de la distance génome à génome (GGDC) sont maintenant les standards pour la délimitation des espèces bactériennes et viennent substituer les analyses DDH (Lalucat et al. 2020). Les analyses ANI reposent sur différentes méthodes pour comparer les séquences génomiques dont les algorithmes (BLAST : ANIb), MUMmer : ANIm, ou orthoANI) (Konstantinidis et al. 2006; Kurtz et al. 2003; Goris et al. 2007; Lee et al. 2016). Les analyses ANI permettent la délimitation des espèces bactériennes avec un seuil de proposé vers 95 %.

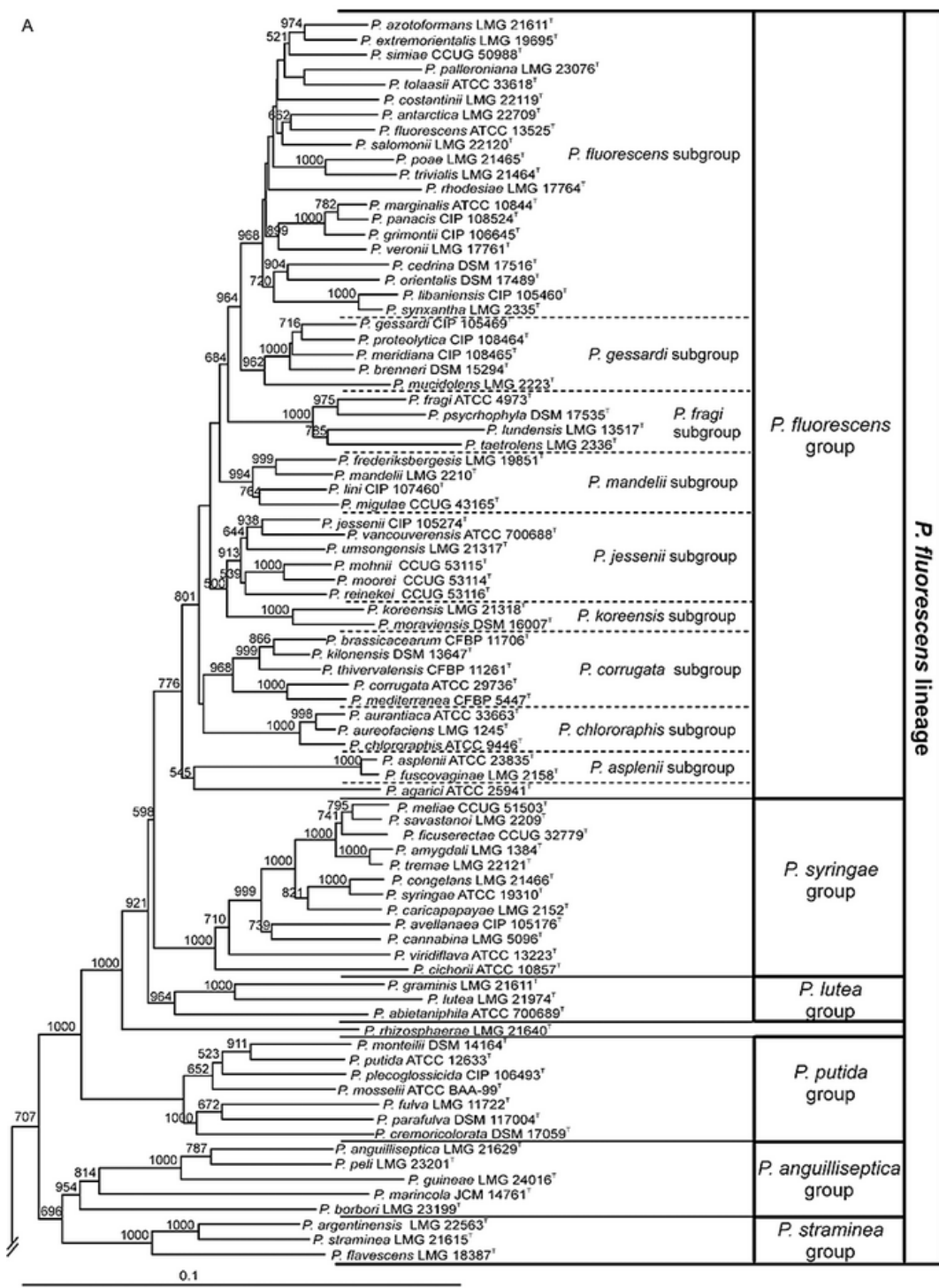


Figure 4.1. Arbre phylogénétique construit sur quatre gènes de ménage concaténés (ARN ribosomique 16S, gyrB, rpoB et rpoD) illustrant les relations phylogénétiques des souches de la lignée *P. fluorescens*. La flèche rouge indique la position du groupe *P. syringae*. (d'après Mulet et al. 2010)

Ainsi en théorie, si deux génomes ont un pourcentage d'identité nucléotidique moyen inférieur à 95 %, ils appartiennent à deux espèces distinctes. Plus récemment, de nouvelles méthodes de calcul, basées sur le nombre de mots de longueur  $k$  ( $k$ -mers) partagés entre les séquences génomiques ont été proposés comme proxy pour la délimitation des espèces bactériennes, car elles sont aussi puissantes et fiables que les méthodes ANI avec un temps de calcul beaucoup plus rapide (Briand et al. 2019; Denancé et al. 2019). Sur la bactérie *X. fastidiosa*, les phylogénies construites à partir de l'analyse des  $k$ -mers partagés (avec  $k = 22$ ) est congruente avec la phylogénie construite sur la base d'analyse ANIb, qui est la méthode de référence (Denancé et al. 2019). Pour le complexe d'espèces *P. syringae* sur la base de  $k=15$  mers, le seuil de l'espèce est défini à 50 % de  $k$ -mers partagés et les relations infrasub-spécifiques sont définies à 75 % (Briand et al. 2019). Toutefois, les robustesses de ces techniques sont dépendantes de la qualité du séquençage réalisé au départ.

Récemment, il a été proposé d'utiliser des codes basés sur la similitude, appelés numéros d'identification de la vie (LIN) pour décrire des isolats bactériens et revisiter les taxonomies (Tian et al. 2020; Vinatzer et al. 2017). L'attribution des numéros LINs pourrait donner un nouveau cadre pour la taxonomie bactérienne à l'avenir (Vinatzer et al. 2017). Cette méthode attribue un code à une souche selon les valeurs ANIb calculées par comparaison deux à deux sur génomes complets. Une base de données est en cours de création ([www.LINbase.org](http://www.LINbase.org)) et permettra d'accélérer et de simplifier la description de la diversité microbienne avec une précision qui inclut et qui va également au-delà, des espèces nommées, avec des données phénotypiques par exemple (Tian et al. 2020). Les utilisateurs peuvent circonscrire, décrire et nommer n'importe quel groupe de bactéries (LIN groups) au niveau du genre ou en dessous, même si le groupe se compose d'une seule lignée clonale.

#### 4.1.3. Historique de la taxonomie du complexe d'espèces *P. syringae*

##### a) Classification actuelle

Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonaceae*, à l'ordre des *Pseudomonadales*, et à la classe des Gammaprotéobactéries. Migula est le premier à proposer le genre *Pseudomonas* en 1894 (Skerman et al. 1980). Le genre *Pseudomonas* est extrêmement diversifié et contient actuellement 240 taxons dont le nom est valide (List of Prokaryotic Names with Standing in the Nomenclature, consulté le 26/01/2021). Le genre est divisé en deux lignées phylogénétiques majeures, *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* (Mulet et al. 2010). La lignée *P. fluorescens* contient six groupes : *P. fluorescens*, *P. syringae*, *P. lutea*, *P. putida*, *P. anguilliseptica* et *P. straminea* (Figure 4.1) (Mulet et al. 2010).

Le complexe d'espèces *P. syringae* correspond à un ensemble d'espèces nommées et d'espèces génomiques non formellement décrites (Bull and Koike, 2015) et son contour varie car certains auteurs y incluent ou non les espèces *P. cichorii* et *P. viridiflava* (Berge et al. 2014). Treize phylogroupes ont été identifiés dans le complexe d'espèces *P. syringae* par MLSA (Berge et al. 2014) et seize espèces sont actuellement officiellement nommées.



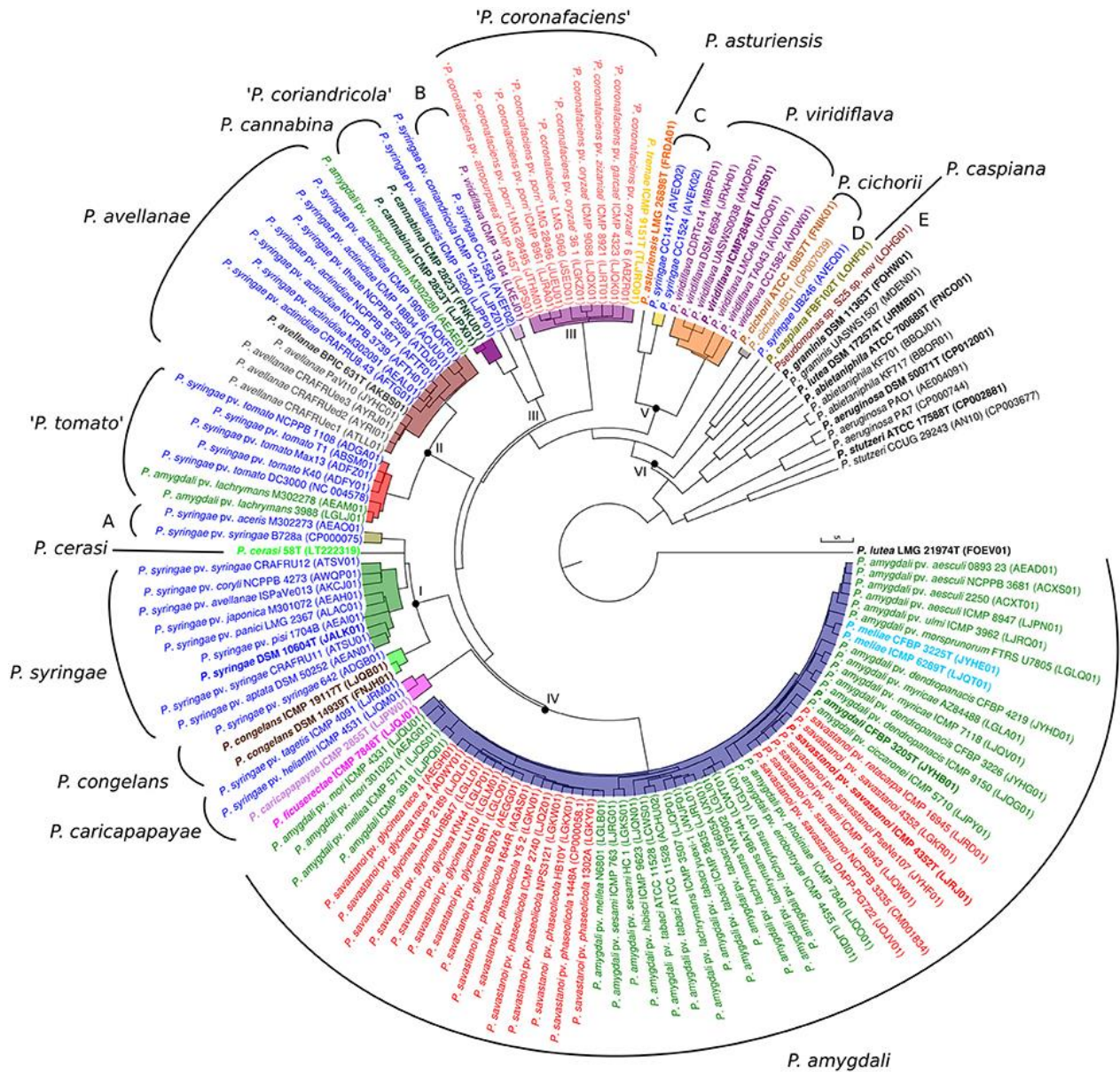


Figure 4.2. Dendrogramme représentant le complexe d'espèces *P. syringae*. Dendrogramme UPGMA basé sur les valeurs d'ANIb de comparaisons par paires de génomes complets. Les chiffres romains aux nœuds indiquent les branches phylogénomiques. Les espèces phylogénomiques à l'intérieur de chaque branche phylogénétique sont mises en évidence avec différentes couleurs. Les souches types d'espèce sont indiquées en gras. Les numéros d'accension des génomes correspondants sont indiqués entre parenthèses. Les espèces phylogénomiques proposées sont indiquées dans le cercle extérieur. Les nouvelles espèces putatives sont indiquées entre guillemets ou en majuscules (A – E). (Modifié d'après Gomila et al. 2017).



L'espèce *P. syringae* a été décrite en 1902 par Van Hall, puis l'on rejointe les espèces *P. cichorii* (Stapp 1928), *P. viridiflava* (Burkholder 1948), *Pseudomonas caricapapayae* (Robbs 1956), *P. amygdali* (Psallidas et al. 1975), *Pseudomonas meliae* (Ogimi 1977), *P. savastanoi* (Gardan et al. 1992), *Pseudomonas ficuserectae* (Goto 1983), *Pseudomonas avellanae* (Janse et al. 1996), *Pseudomonas cannabina* (Gardan et al. 1999), *Pseudomonas tremae* (Gardan et al. 1999), *Pseudomonas congelans* (Behrendt et al. 2003), *Pseudomonas asturiensis* (González et al. 2013), *Pseudomonas cerasi* (Kaluzna et al. 2016), *Pseudomonas caspiana* (Busquets et al. 2017) et *Pseudomonas coronafaciens* (Dutta et al. 2018).

Sur la base de la comparaison des génomes (ANI) à l'échelle du complexe d'espèces *P. syringae*, Gomila et collaborateurs (2017) identifient 19 espèces phylogénomiques au sein du groupe. Ils proposent d'élever les pathovars *tomato* et *coriandricola* au rang d'espèce, de rassembler les espèces *P. ficuserectae*, *P. meliae* et *P. savastanoi* au sein de l'espèce *P. amygdali* et identifient cinq nouvelles espèces phylogénomiques, référencées de A à E, qui ne sont pas encore décrites (Figure 4.2) (Gomila et al. 2017).

## b) Historique

Dans un premier temps, les espèces de *Pseudomonas* ont été classées suivant des caractères biochimiques et des tests d'hypersensibilité sur tabac (test LOPAT) afin de séparer les souches pathogènes des non pathogènes (Lelliott et al. 1966). Sur cette base, cinq groupes distincts d'agents phytopathogènes ont été définis. Cette classification a été approfondie par les travaux de Sands qui remarque que certaines espèces du groupe I ne peuvent pas être différenciées uniquement sur la base de critères phénotypiques (Sands et al. 1970). Les premières analyses DDH ont indiqué une diversité génomique au sein du groupe I défini par Lelliott mais elles n'étaient pas significatives pour tirer des conclusions taxonomiques (Palleroni et al. 1973). Il a ensuite été suggéré que *P. syringae* forme un complexe de plusieurs espèces distinctes capables d'infecter différentes gamme d'hôtes de plantes (Young et al. 1978). En 1980, de nombreuses bactéries phytopathogènes ne sont pas incluses dans les listes approuvées et il est alors proposé de classer ces bactéries dans différents pathovars sur la base des spécificités parasitaires des souches (Young et al. 1978). Ainsi pour le complexe d'espèces *P. syringae*, 40 pathovars ont été proposés (Young et al. 1978). Cependant, cette classification était limitante et confuse en raison de la variabilité et de l'étendue des gammes d'hôtes des souches (Young 2010). Le séquençage de l'ADN-16S à partir d'amorces universelles a ensuite permis de classer et d'identifier de nombreuses bactéries associées au genre *Pseudomonas* (Moore et al. 1996). L'hybridation ADN-ADN a donné un nouveau souffle à la classification de ce complexe d'espèces (Gardan et al. 1999; Young 2010). Par cette approche, Gardan et ses collaborateurs ont défini neuf espèces génomiques et ont clarifié la classification de nombreuses souches de *P. syringae* jusqu'alors classées uniquement selon des critères phénotypiques et biochimiques (LOPAT) (Gardan et al. 1999). De plus, l'espèce génomique 9 a été élevée au rang d'espèce (*P. cannabina*) grâce à des caractéristiques phénotypiques permettant de distinguer les souches de cette espèce des souches des autres espèces génomiques (Figure 4.3) (Gardan et al. 1999).

Le développement des méthodes utilisant le séquençage de l'ADN a actualisé la taxonomie du complexe d'espèces *P. syringae*. Grâce à la MLSA sur quatre gènes de ménage (*cts*, *gyrB*, *gapA* et *rpoD*), 13 phylogroupes ont été définis au sein du *P. syringae* (Berge et al. 2014).

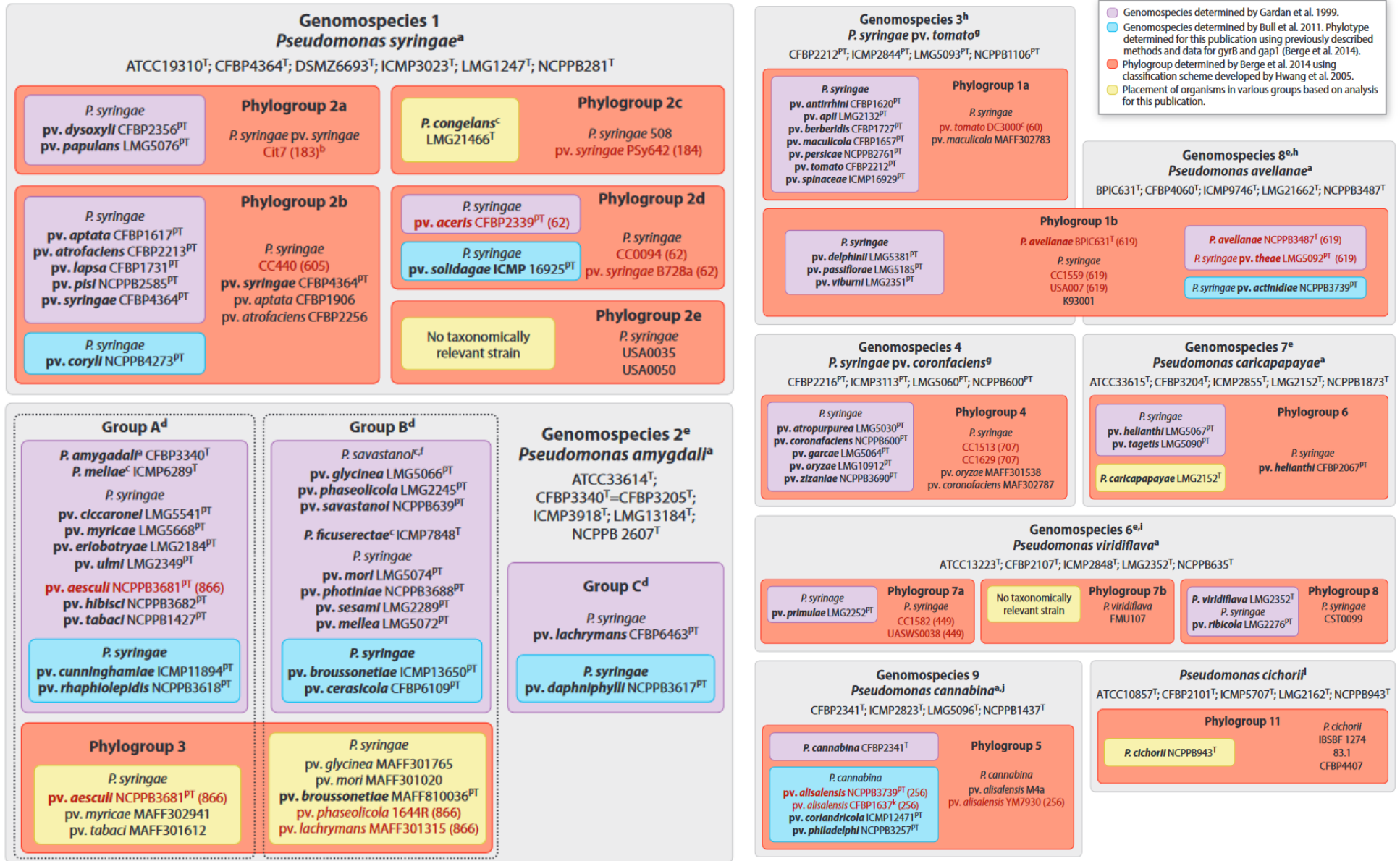


Figure 4.3. Espèces génomiques, phylogroupes et pathovars décrit dans le complexe d'espèces *P. syringae*. (d'après Bull et Koike 2015)

Le séquençage de génomes complets appliqué au complexe d'espèces *P. syringae*, a permis d'identifier 19 espèces phylogénomiques (Gomila et al. 2017). Néanmoins, pour être officiellement décrites, il faudrait identifier des caractères phénotypiques qui différencient ces espèces phylogénomiques les unes des autres.

Récemment, 391 génomes complets appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* ont été analysés pour retracer l'histoire évolutive des souches agricoles et environnementales appartenant à ce contexte (Dillon et al. 2019b). Ces analyses s'appuient notamment sur le contenu du core-génome (ensemble des gènes partagés par tous les individus d'un groupe) et du pan-génome (ensemble de tous les gènes) des souches, et sur les événements de recombinaison et de transferts horizontaux. Sur la base de ces études, le complexe d'espèces *P. syringae* est considéré comme un groupe écologique et évolutif cohérent (Dillon al. 2019a, 2019b). Plus particulièrement, deux sous-unités sont mises en évidence : « les phylogroupes primaires » contenant principalement des souches associées aux environnements agricoles et appartenant aux phylogroupes 1, 2, 3, 4, 5 et 6 et « les phylogroupes secondaires » contenant principalement des souches environnementales des phylogroupes 7, 9, 10, 11 et 13 (Dillon et al. 2019b, 2019b). Au sein de ces deux unités, les souches partagent des niveaux importants de recombinaison intra/inter-phylogroupes notamment sur des loci correspondant à des gènes associés à la virulence (SST3, ET3 et phytotoxines) et partagent des niches écologiques communes (Dillon et al. 2019a). L'histoire évolutive des souches du complexe d'espèces *P. syringae* montre le maintien d'une cohérence génétique et écologique et pour ces raisons, les auteurs de ces travaux ne considèrent pas qu'il soit justifiable de diviser le complexe d'espèces de *P. syringae* en plusieurs espèces différentes (Dillon et al. 2019a).

## 4.2. Les schémas MLST et MLVA pour le typage bactérien

### 4.2.1. Le typage multi-locus sequence typing (MLST)

Le multi-locus sequence typing (MLST) est une méthode qui se base sur l'analyse de gènes. Elle a été mise au point par Maiden et ses collaborateurs sur *Neisseria meningitidis* responsables de méningites chez l'humain (Maiden et al. 1998). La MLST a été développée dans le but de proposer une méthode portable et universelle afin de caractériser la diversité bactérienne. En effet, la MLST repose sur le séquençage de séquences d'ADN qui sont traitées informatiquement puis échangées internationalement sur bases données publiques. Par exemple, la base Plant Associated and Environmental Microbes Database (PAMDB) proposent des séquences MLST de *P. syringae*, *Xanthomonas* sp., *Ralstonia solanacearum*, *A. citrulli* et de *C. michiganensis* ([www.pamdb.org](http://www.pamdb.org), consulté le 27/01/2021) (Almeida et al. 2010). La MLST vise à rechercher du polymorphisme entre les séquences nucléotidiques pour étudier et comparer la diversité génétique au sein d'une population bactérienne. Les séquences nucléotidiques utilisées pour les analyses MLST correspondent à des portions de gènes de ménage codant pour des fonctions de base dans la cellule qui sont présents chez tous les individus du groupe étudié. Dans un schéma MLST, chaque gène de ménage va correspondre à un locus. Pour chaque locus, un numéro d'allèle est attribué pour chaque type de séquence unique. Ainsi, si deux souches ont une séquence différente pour un locus (polymorphisme), celle-ci vont avoir un numéro d'allèle différent. Au contraire, deux souches ayant des séquences identiques pour un locus vont partager un numéro d'allèle commun. Différents loci peuvent être séquencés dans une analyse MLST (en général quatre à huit) et la combinaison d'allèles obtenus pour chaque locus définit un type de séquence (sequence type, ST).

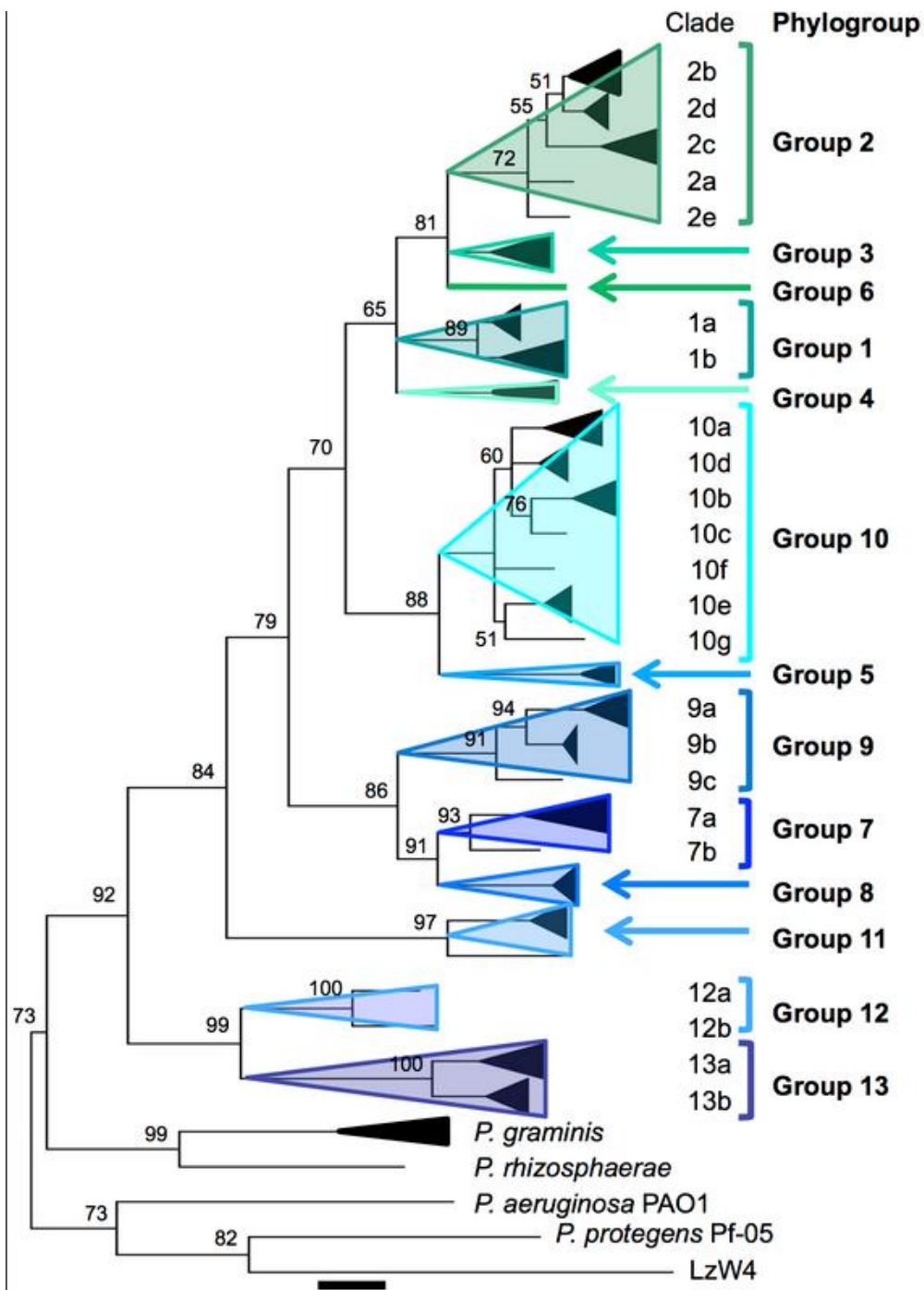


Figure 4.4. Arbre phylogénétique construit sur quatre gènes de ménage (*cts*, *gltA*, *gyrB* et *rpoD*) illustrant les 13 phylogroupes du complexe d'espèces *P. syringae*. Le phylogroupe 2 contient cinq clades : clade 2a à 2e. (d'après Berge et al. 2014)

Ainsi, la MLST est un outil puissant pour identifier et classer une bactérie nouvellement isolée parmi la diversité déjà décrite. La MLST est également un outil d'épidémiologie-surveillance utilisé pour suivre la dissémination de certaines bactéries phytopathogènes comme *X. fastioda*, *P. syringae* pv. *actinidiae* ou *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cesbron et al. 2020; He et al. 2018; Ansari et al. 2019).

#### 4.2.2. Le typage Multi-Locus Variable number of tandem repeats Analysis (MLVA)

Le niveau de résolution de la MLST est parfois insuffisant pour certains agents phytopathogènes monomorphes car les séquences des gènes de ménage ne sont pas suffisamment polymorphes pour différencier les populations (Pruvost et al. 2014). Les marqueurs VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) qui sont des séquences d'ADN répétées au sein des génomes, présentent un polymorphisme particulièrement adapté pour différencier les souches entre elles et établir leurs liens de filiation. Des schémas MLVA (Multi-Locus Variable number of tandem repeats Analysis) ont permis de mieux comprendre les niveaux de structuration entre les souches au niveau infra-spécifique au sein du complexe d'espèces *P. syringae*. Un schéma MLVA a été développé pour le suivi épidémiologique de *P. syringae* pv. *tomato* et *P. syringae* pv. *maculicola* qui sont deux pathovars pathogènes de la tomate mais dont la gamme d'hôtes diffère (Gironde and Manceau 2012). De la même façon, un schéma MLVA pour le suivi épidémiologique des souches de *P. syringae* pv. *actinidiae* responsables du chancre du kiwi a été proposé et a permis d'émettre des hypothèses sur l'origine de l'introduction de l'agent phytopathogène (Cunty et al. 2015a).

### 4.3. Le phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae*

#### 4.3.1. Phylogénie

##### a) Position dans le complexe d'espèces *P. syringae*

Le phylogroupe 2 (PG 2) du complexe d'espèces *P. syringae* (Berge et al. 2014) correspond à l'espèce génomique 1 (Gardan et al. 1999; Bull and Koike 2015) et à la branche phylogénomique I (Gomila et al. 2017) (Figures 4.2, 4.3 et 4.4).

Le PG 2 est phylogénétiquement proche du phylogroupe 3 (PG 3), du phylogroupe 6 (PG 6), du phylogroupe 1 (PG 1) et du phylogroupe 4 (PG4) (Figure 4.4) (Berge et al. 2014). Sur la base de quatre gènes de ménage, la distance phylogénétique est de 0.07, 0.09, 0.10 entre le PG 2 et les PGs 3, 6 et 1 respectivement (Berge et al. 2014). Par ailleurs, ces autres phylogroupes proches contiennent des souches phytopathogènes comme *P. amygdali* pv. *lachrymans*, *P. amygdali* pv. *aesculi* et *P. amygdali* pv. *phaseolicola* (PG 3), *P. caricapapayae* (PG 6) et *P. tomato* pv. *tomato* (PG 1). Tous ces phylogroupes dont le PG 2 appartiennent notamment à l'unité des « phylogroupes primaires » associée aux environnements agricoles décrits par Dillon et al. (2019a), et sont responsables d'épisodes épidémiques sur plantes annuelles dans le monde entier (Lamichhane et al. 2015).



Tableau 4.2. Pourcentage d'identité nucléotidique moyen (ANIb) inter et intra-clades sur la base d'analyses de génomes issues de souches principalement associées aux Cucurbitacées. Pav correspond à deux souches du clade 2b associées exclusivement au déclin du noisetier qui avaient été classées dans l'espèce *P. avellanae* (O'Brien et al. 2012). (d'après Newberry et al. 2019)

	2a	2b	Pav	2b-a	2d
2a	98.95				
2b	94.80	98.35			
Pav	95.20	96.55	98.16		
2b-a	96.00	97.43	96.15	98.68	
2d	94.61	95.20	95.54	95.05	98.75

<sup>a</sup>Percent identity was calculated after correcting for clones in the dataset.

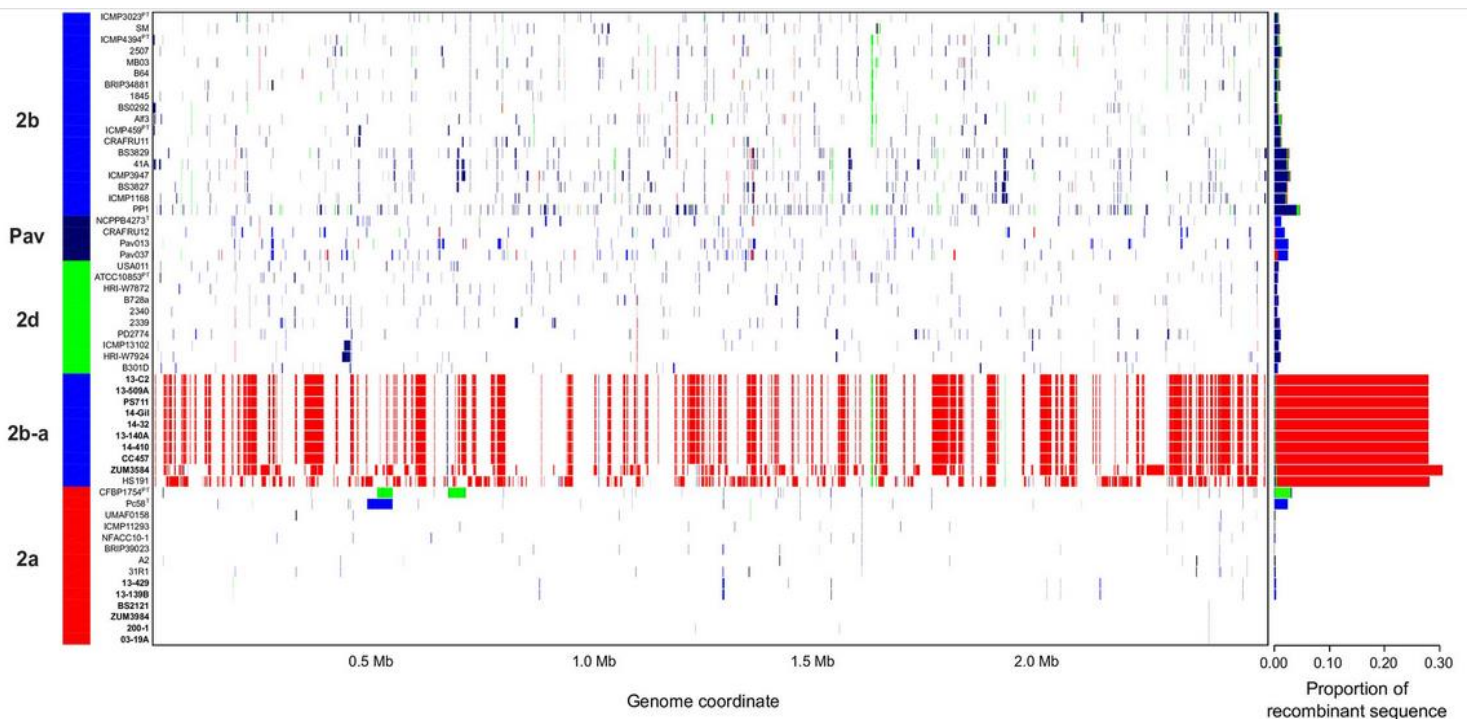


Figure 4.5. Visualisation des événements de recombinaison homologue dans les séquences génomiques des souches associées aux Cucurbitacées (indiquées en gras) de différents clades. Au sein du clade 2ba, une forte proportion de gènes recombinés issus du clade 2a (indiqués par des traits rouges) est identifiée (d'après Newberry et al. 2019). Les autres couleurs représentent les gènes recombinés provenant des autres clades (selon la platte de couleur à gauche). Pav correspond à deux souches du clade 2b associées exclusivement au déclin du noisetier qui avaient été classées dans l'espèce *P. avellanae* (d'après O'Brien et al 2012).

## b) Les clades du phylogroupe 2

Le PG 2 contient cinq clades (nommés clade 2a à 2e) clairement identifiés en MLSA sur la base de quatre gènes de ménage (Berge et al. 2014). Sur la base des séquences génomiques complètes, quatre espèces phylogénomiques distinctes ont été identifiées (Gomila et al. 2017). Trois de ces quatre espèces phylogénomiques correspondent à des espèces officiellement décrites et valides. Ainsi, le clade 2a correspond à l'espèce *P. cerasi*, le clade 2b à l'espèce *P. syringae (sensu stricto)*, le clade 2c à l'espèce *P. congelans*. Quant à lui, le clade 2d n'est pas une espèce officielle et correspond uniquement à une espèce phylogénomique (Berge et al. 2014; Gomila et al. 2017). Sur la base des valeurs d'ANIb, chacune de ces espèces est clairement délimitée. En effet, les valeurs d'ANIb sont supérieures à 95 % entre deux génomes issus d'un même clade et elles sont inférieures à 95 % entre des génomes appartenant à deux clades différents (Gomila et al. 2017). Le génome des souches du clade 2e n'a pas été séquencé à ce jour et nous ne savons pas si elles représentent une nouvelle espèce phylogénomique.

Récemment, un nouveau clade (clade 2ba) a été identifié dans le PG 2 sur la base de l'analyse des séquences génomiques complètes de souches isolées de diverses cucurbitacées (Newberry et al. 2019). Le clade 2ba contient essentiellement des souches pathogènes des Cucurbitacées dont les courges, les melons et les pastèques (Newberry et al. 2019). Néanmoins, ce clade n'est pas clairement délimité sur la base des valeurs ANIb (Tableau 4.2). En effet, les génomes du clade 2ba partagent en moyenne un pourcentage d'identité nucléotidique moyen supérieur à 95 % à la fois avec les génomes des clades 2a (espèce *P. cerasi*) et 2b (espèce *P. syringae sensu stricto*) (Newberry et al. 2019). De nombreux événements de recombinaison ont été identifiés dans les core-génomes appartenant au clade 2ba et dans plus de 98 % des cas, les séquences recombinantes prédites ont pour origine le clade 2a (Figure 4.5) (Newberry et al. 2019). Ces événements récents de recombinaison ont conduit à la divergence du clade 2ba à partir du clade 2b (Newberry et al. 2019).

Enfin, un nouveau clade putatif (clade 2f) a été identifié en MLSA sur la base de trois gènes de ménage et regroupe des souches responsables de pourriture bactérienne sur les inflorescences de la vigne en Australie (Hall et al. 2019).

### 4.3.2. Diversité des souches

#### a) Ubiquité

Une espèce ubiquiste colonise plusieurs niches écologiques variées et se distribue souvent sur une zone géographique large. Parmi les souches du complexe d'espèces *P. syringae*, les souches appartenant au PG 2 sont les plus ubiquistes et elles sont retrouvées dans de nombreux habitats terrestres et aquatiques (Berge et al. 2014; Morris et al. 2010). Des souches des clades 2a à 2d ont été retrouvées dans des environnements très variés comme les lacs, les rivières, la pluie, la neige, des biofilms, des plantes sauvages, des plantes cultivés et dans les eaux d'irrigation (Berge et al. 2014; Morris et al. 2010, 2008, 2000; Monteil et al. 2016; Pietsch et al. 2017).



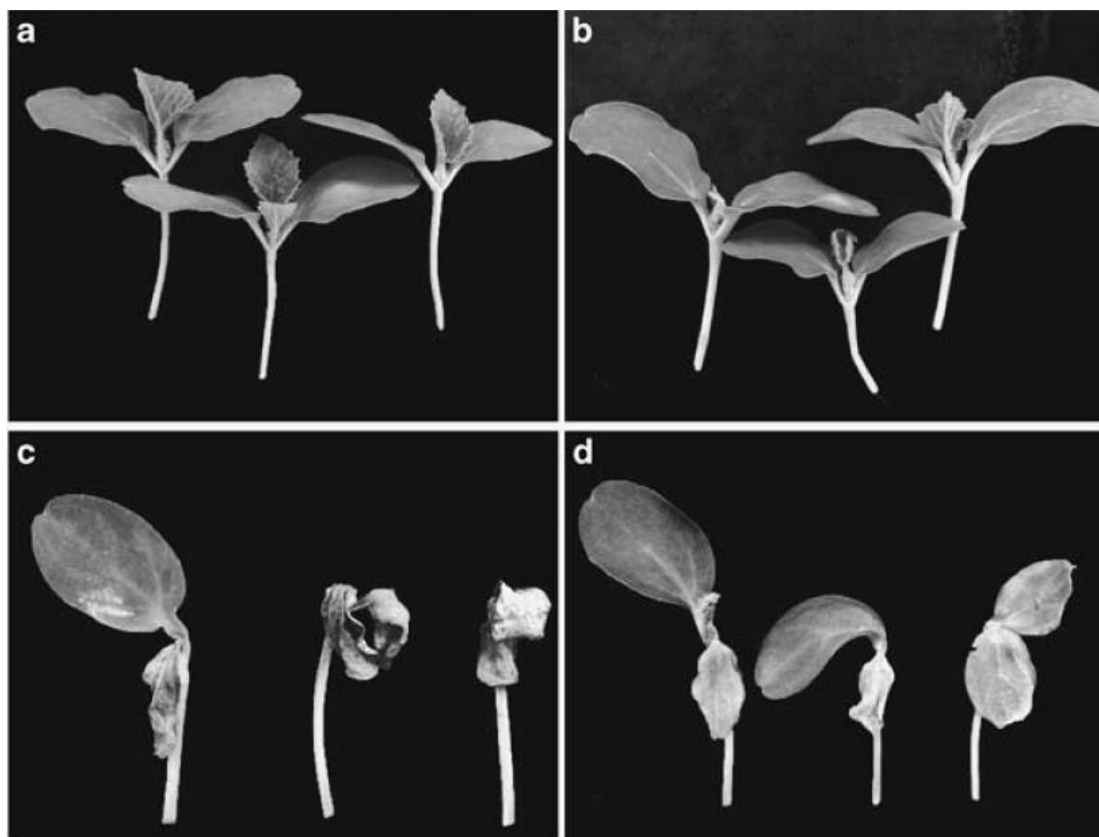


Figure 4.6. Reactions du melon sept jours après inoculation de souches de *P. syringae* possédant un SST3 canonique ou atypique. (A) eau (B) Souche CC1524 sans SST3 canonique du clade 2c (C) Souche CC0094 avec SST3 canonique du clade 2b (D) Souche sans SST3 canonique du clade 2a. (D'après Diallo et al. 2012)

De plus, les souches du PG 2 ont été isolées sur presque tous les continents dont l'Europe, l'Amérique du Nord et du Sud, l'Océanie, l'Asie et l'Afrique (Ashorpour et al. 2008; Morris et al. 2010; Muedi et al. 2015; Vasebi et al. 2019; Liu et al. 2019; Araujo et al. 2020). Une souche de *P. syringae* (LzW4) aurait été isolée en Antarctique, mais celle-ci aurait été mal classée et serait finalement plus proche de *Pseudomonas protegens* (Berge et al. 2014; Sulthana et al. 2011).

### b) Les souches isolées de l'environnement non végétal

Tous les clades, à l'exception du clade 2f, contiennent des souches non isolées de plantes (Berge et al. 2014). Par exemple dans le clade 2a, des souches ont été isolées de la pluie et de lacs (Berge et al. 2014; Pietsch et al. 2017), dans le clade 2b de nombreuses souches ont été isolées à partir de lacs et de rivières (Berge et al. 2014; Pietsch et al. 2017; Monteil et al. 2016), dans le 2c des souches ont été isolées à partir de neige et de rivières (Berge et al. 2014) et dans le 2d, des souches isolées de bassins d'irrigation, de neige, d'eau douce de rivières et de pluie (Pietsch et al. 2017; Monteil et al. 2016, 2014c; Morris et al. 2000). Le clade 2e contient seulement deux souches et elles ont été isolées à partir d'échantillons d'eau douce et de neige (Berge et al. 2014).

Certaines souches isolées de l'environnement non végétal sont néanmoins capables d'induire une HR sur plantes. Sur 126 souches isolées de l'environnement non végétal, 65 % des souches induisent une HR sur tabac (Diallo et al. 2012). La réaction HR générée par des bactéries Gram négatif est généralement liée à la présence d'un SST3 et à ses effecteurs (ET3). Les souches de l'environnement qui ne sont pas capables d'induire une réaction HR ne possèdent pas l'ET3 *hopI1* qui est conservé chez les souches pathogènes de plantes. Parmi ces souches qui n'induisent pas de HR, certaines manquent également d'autres gènes conservés du SST3 canonique (T-PAI) comme *hrpK1*, *hrpL*, *avrE1*, *hrpW1* et *hrcC* (Diallo et al. 2012). Les souches du clade 2c qui n'induisent pas de HR sur tabac n'ont pas l'ensemble de ces six effecteurs et ne possèdent pas de SST3 canonique (Diallo et al. 2012). A la place du SST3 canonique, ces souches possèdent un SST3 atypique (A-PAI) similaire à l'îlot de pathogénicité (Single-PAI) des souches de *P. viridiflava* (Berge et al. 2014; Diallo et al. 2012; Clarke et al. 2010). Toutefois, les souches du clade 2c sont capables de coloniser les plantes de façon épiphyte à des densités de population relativement élevées (Clarke et al. 2010). Par exemple, sur *A. thaliana*, six jours après inoculation, la souche Psy642 (clade 2c) atteint une taille de population de  $10^5$  ufc.cm<sup>-2</sup> ce qui est plus qu'une souche pathogène en situation incompatible ( $10^4$  ufc.cm<sup>-2</sup>) mais moins qu'une souche pathogène en situation compatible ( $10^6$  ufc.cm<sup>-2</sup>) (Clarke et al. 2010). Pour certaines souches, T-PAI n'est pas strictement indispensable pour être pathogène d'une plante. Ainsi, des souches du clade 2a sont très agressives sur le melon même si elles ne possèdent pas les six gènes conservés du SST3 canonique (*hrpW1*, *hrcC*, *hopI1*, *hrpK1*, *hrpL* et *avrE1*) (Figure 4.6) (Diallo et al. 2012). Ce résultat illustre que le SST3 canonique n'est pas indispensable pour la virulence de certaines souches et que les souches de l'environnement pourraient utiliser d'autres facteurs de virulence comme le pouvoir glaçogène, la production de toxines et d'enzymes pour induire des symptômes sur les plantes (Berge et al. 2014; Clarke et al. 2010; Diallo et al. 2012).



Figure 4.7. Symptômes causés par *P. syringae* pv. *aptata* sur melon à gauche et sur betterave à droite. (d'après E-phytia)

### c) Les souches pathogènes associées aux plantes

Le PG 2 groupe des souches responsables de maladies sur diverses espèces de plantes cultivées ou sauvages. Les symptômes causés par ces bactéries comprennent des graisses, des chloroses, des brûlures et des chancres. Les souches du PG 2 colonisent une gamme diversifiée d'organes et de tissus végétaux comme des feuilles, des graines, des fruits et de l'écorce (Arnold and Preston 2018).

La majorité des souches phytopathogènes appartiennent aux clades 2a, 2b et 2d et certaines de ces souches correspondent à des pathovars décrits. Par exemple, au sein du clade 2a, des souches du pathovar *P. syringae* pv. *papulans* sont responsables de la boursouffure du pommier (Kerkoud et al. 2002; Bull and Koike 2015). D'autres souches affiliées au clade 2a (*P. cerasi*) sont responsables de chancre du cerisier en Europe (Kaluzna et al. 2016; Hulin et al. 2020). Au sein du clade 2b, de nombreux pathovars sont décrits dont *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *coryli*, *P. syringae* pv. *atrofaciens* et *P. syringae* pv. *laspa*. Ces pathovars sont responsables de maladies sur des plantes annuelles et pérennes, *P. syringae* pv. *aptata* responsable de brûlures bactérienne sur melon et betterave (Figure 4.7) (Riffaud et al. 2003; Nikolić et al. 2018a; Dutta et al. 2014b). *P. syringae* pv. *pisi* est responsable de brûlures bactériennes sur pois (Baltrus and Clark 2019; Ali et al. 2015; Martín-Sanz et al. 2012). *P. syringae* pv. *coryli* est responsable du dépérissement bactérien des rameaux du noisetier (Scortichini et al. 2005). Au sein du clade 2d, *P. syringae* pv. *aceris* est responsable la tache foliaire de l'érable (Takikawa 1991) et *P. syringae* pv. *solidagae* est responsable de la tache bactérienne de la grande verge d'or (Sato et al. 2001). Des souches pathogènes des Cucurbitacées mais non affiliées à des pathovars appartiennent aux clades 2a, 2b, 2ba et 2d (Newberry et al., 2016, 2017a, 2017b, 2019 ; Tymon and Inglis 2017). Ces bactéries sont pathogènes sur feuilles de courge, melon et pastèque (Newberry et al., 2016, 2017a, 2017b, 2019).

La plupart des souches du PG 2 sont pathogènes sur plusieurs espèces végétales, ayant une gamme d'hôte étroite, modérée ou large (Morris et al. 2019). Par exemple, au sein du PG 2, la souche CFPB 1906 de *P. syringae* pv. *aptata* est pathogène sur plus de 16 espèces végétales, alors que la souche CFBP 1392 de *P. syringae* pv. *syringae* est pathogène sur 8 espèces végétales et que la souche CFBP 1788 de *P. syringae* pv. *syringae* est pathogène sur seulement trois espèces végétales, sur la base de tests de pouvoir pathogène (injection d'inoculum, infiltration après blessure ou dépôt d'une goutte inoculum après blessure) et d'incubation en conditions contrôlées favorables aux bactéries (Morris et al. 2019). Il est à noter que les souches CFBP 1392 et CFBP 1788 ne devraient pas appartenir au même pathovar *syringae* puisqu'elles n'ont pas la même gamme d'hôtes. L'étendue de la gamme d'hôtes des souches du PG 2 est positivement corrélée avec la motilité des souches sur milieu gélosé (Morris et al. 2019). Par ailleurs les souches du PG 2 se distinguant par leur large gamme d'hôtes ont un potentiel épiphyte élevé, de plus petits répertoires de T3Es et peuvent synthétiser plusieurs toxines comme la syringoline A, la syringomycine et la syringopeptine (Xin et al. 2018).

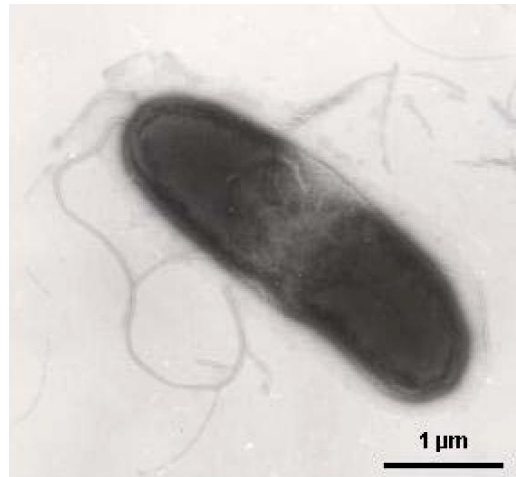


Figure 4.8. Image au microscope électronique à transmission d'une cellule de la bactérie *P. syringae* pv. *aptata*. La cellule mesure 2,7 μm de long. Plusieurs flagelles polaires et morceaux de flagelles brisés sont visibles. (d'après Morris et al. 2004).

### 4.3.3. Caractéristiques phénotypiques

*P. syringae* est une bactérie aérobie à Gram négatif avec des cellules en forme de bâtonnets, qui mesurent généralement 1,5 µm de long et 0,7 à 1,2 µm de diamètre (Arnold and Preston 2018). Les cellules sont mobiles avec un à trois flagelles polaires (Young 1991) (Figure 4.8). Sur milieu King B, la plupart des souches produisent un pigment fluorescent diffusible qui varie d'une couleur entre bleu pâle, bleu, bleu-vert, vert et jaune-vert. Néanmoins, certaines souches de *P. syringae* pv. *syringae* comme ICM1445, ICMP6014 et ICMP6036 ne produisent pas de pigment (Young 1991). La température optimale de croissance varie de 22 à 30 °C et *P. syringae* est négative pour l'activité oxydase et la dihydrolase de l'arginine. Beaucoup souches de *P. syringae* produisent du lévane et engendrent une HR sur tabac (Arnold and Preston 2018).

### 4.3.4. Caractéristiques génomiques

#### a) Composition du génome

Les souches du complexe d'espèces *P. syringae* ont un génome de taille comprise entre 5,34 Mb pour la souche ICMP 9093 (*P. syringae* pv. *oryzae*) et 7,21 Mb pour la souche ICMP 14479 (*P. syringae* pv. *glycinea*) (Dillon et al. 2019a). S'agissant des souches isolées de Cucurbitacées et appartenant au PG 2, la taille moyenne du génome des souches du clade 2b-a est de 5.92 Mb et 6.23 Mb pour les souches associées aux Cucurbitacées du clade 2a (Newberry et al. 2019).

Les plasmides sont des éléments importants pour la fitness de certaines souches du complexe d'espèces *P. syringae* et peuvent notamment porter des facteurs de virulence. Les souches du PG 2 pathogènes de Cucurbitacées du clade 2a contiennent un ou plusieurs plasmides (Newberry et al. 2019). Un contig de 52,42 Kb a été assemblé dans les souches 200-1 et 03-19A (clade 2a, isolées de Cucurbitacées) et la séquence présente 93% d'identité nucléotidique et 66% de recouvrement avec la séquence plasmidique de la souche HS191 (clade 2ba) isolée de millet (Newberry et al. 2019). Des T3E sont portés sur ce plasmide présent dans les trois souches comme *hopC1* et *hopH1*. Les souches 13-429 et 13-139B isolées de pastèque et appartenant aussi au clade 2a portent d'autres effecteurs sur un plasmide comme *hopAU1*, *hopAW1*, *hopAF1* et *avrPto* (Newberry et al. 2019). Par contre, les souches ZUM3984 et Bs2121 (clade 2a) contiennent deux plasmides (pCC1557 et pB13-200A) mais aucun gène de virulence n'a été identifié (Newberry et al. 2019).

#### b) Diversité et réarrangements génomiques

Le contenu des génomes des souches du complexe d'espèces *P. syringae* est très variable. En effet, l'analyse de 391 génomes appartenant à 13 phylogroupes différents, montre une très forte divergence dans la composition génomique des souches (Dillon et al. 2019a). Seulement 3,10 % des 77 728 familles de gènes orthologues appartiennent au « soft core- genome » (ensemble des gènes présents chez 95 % des génomes analysés) et seulement 124 familles d'orthologues pour le « hard core-genome » (présents dans 100% des souches). Le génome accessoire est très étendu avec 75 318 familles d'orthologues et dont 60,60 % des familles d'orthologues qui sont uniques à un seul génome (Dillon et al. 2019a).





Au sein du PG 2, les souches analysées partagent toutes 1 482 familles d'orthologues parmi 23 255 familles identifiées soit 6,37 % des familles d'orthologues identifiées (Dillon et al. 2019a). Un contenu génétique important est échangé entre le PG 2 et d'autres phylogroupes par recombinaison et transfert horizontal (Dillon et al. 2019a). Ainsi, sur la base d'une analyse du pan-génome, les souches du PG 2 et du PG 10 sont rassemblées sous une même branche phylogénétique alors que ces deux phylogroupes sont éloignées sur la base de l'analyse du core-génome. Sur la base du pan-génome, les souches des PG 2 et 10 partagent en moyenne 3 918 familles d'orthologues. Néanmoins, les événements de recombinaison et de transferts horizontaux inter-phylogroupes ne sont pas suffisants pour brouiller les traits héréditaires des souches (Dillon et al. 2019a).

Le SST3 canonique contient une région EEL dont la composition en ET3 varie drastiquement entre les souches d'un même phylogroupe ou de phylogroupes différents (Xin et al. 2018). Cette région est extrêmement dynamique et les gènes sont acquis ou perdus très fréquemment vraisemblablement en réponse à la sélection médiée par l'hôte (Dillon et al. 2019a). Par exemple, les souches B728A et BD301D appartiennent toutes les deux au PG 2 et les gènes portés par l'EEL sont différents. B728A porte les effecteurs *avrB3*, *hopX1* et *hopZ3* alors qu'ils sont absents chez BD301D qui porte à la place l'effecteur *hopA2* (Ravindran et al. 2015). Chez *P. syringae* pv. *actinidiae* (PG 1) la composition de l'EEL varie dans le contenu en effecteurs chez différents biovars virulents ou non sur le kiwāi (kiwi de Sibérie) (Hemara 2020). Par exemple, les souches Psa1 J-35 et Psa2 K-28 sont très agressives sur le kiwāi alors que la souche Psa3 V-13 est avirulente (Hemara 2020). La délétion des effecteurs *hopAW1* et *hopBB1-2* portés par l'EEL chez Psa3 V-13 induit une multiplication bactérienne sur l'hôte alors que la complémentation de ces deux effecteurs dans la souche Psa2 K-28 induit une réaction d'hypersensibilité.

Des souches des clades 2ba et 2a ont convergé pathologiquement sur les Cucurbitacées. Des arrangements génomiques ont été clairement identifiés dans les séquences génomiques de ces souches appartenant à différents clades (Figure 4.9) (Newberry et al. 2019). Ainsi, de nombreux réarrangements sont situés sur un îlot génomique de 90 000 à 125 000 pb correspondant à un ICE (Newberry et al. 2019). L'ICE est délimité par les gènes *parA* et *xerC* et est flanqué à ses extrémités d'une région répétée tRNA<sub>lys</sub> permettant la fixation de l'îlot génomique (Figure 4.9). La structure interne de l'ICE est fragmentée et diffère selon les souches par des éléments mobiles et différentes cassettes de gènes (Newberry et al. 2019). Par exemple, l'effecteur *hopAR1* est porté dans l'ICE de la souche 200-1 entre une hélicase prédite et *pilL*, tandis que le gène de l'ET3 *avrRpt2* a été trouvé au même locus dans la souche 13-509A et le gène *hcp1* chez la souche HS191 (Figure 4.9) (Newberry et al. 2019). De même, *hopZ5* et une copie tronquée de *hopH1* sont présents dans les ICEs de toutes les souches pathogènes des Cucurbitacées sauf la souche 13-509A (clade 2ba), qui porte *hopC1* et une copie intacte de *hopH1* sur le même locus. Par ailleurs, certains ICE portés par les souches associées aux Cucurbitacées sont similaires à ceux qui ont été décrits chez les souches de *P. syringae* pv. *actinidiae* et *P. amygdali* pv. *phaseolicola* appartenant respectivement aux PG 1 et 3 (Newberry et al. 2019). Ce résultat suggère des réarrangements génomiques entre des souches appartenant à des phylogroupes différents avec transfert horizontal de gènes impliqués dans le pouvoir pathogène.

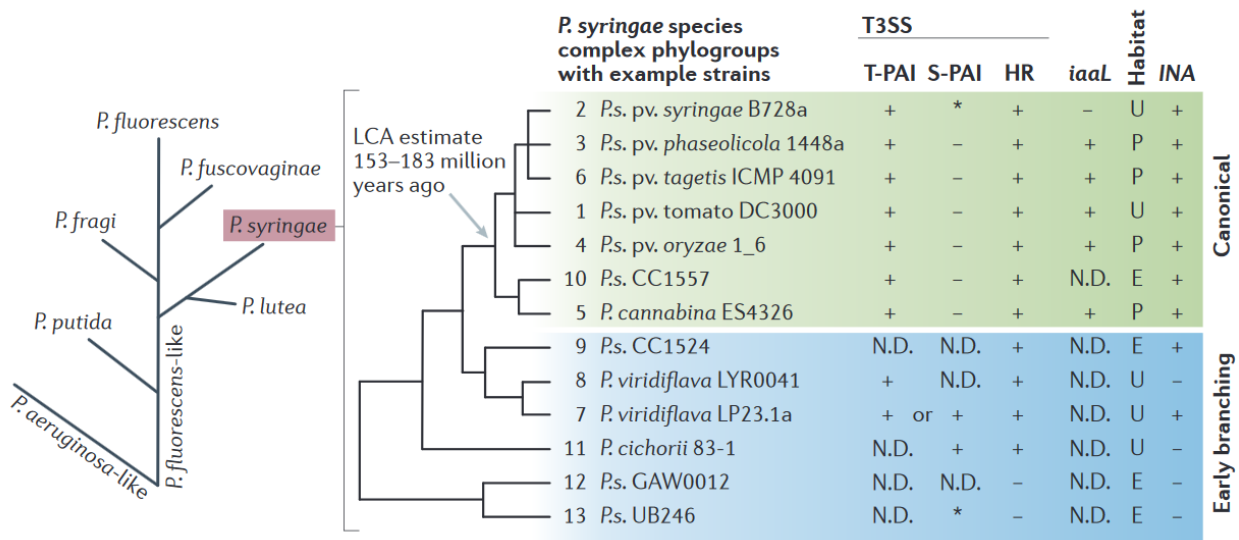


Figure 4.10. La phylogénie de *P. syringae* et les caractéristiques communes des phylogroupes. *P. syringae* a évolué à partir de la branche principale *Pseudomonas fluorescens* (partie gauche). Sur la base de l'analyse de séquence multilocus (MLSA), 13 phylogroupes (PG) ont été identifiés dans le complexe d'espèces *P. syringae* (partie droite). Les îlots de pathogénicité à partie unique (S-PAI) n'ont pas le locus effecteur conservé mais peuvent porter des effecteurs conservés dans le cluster *hrp* – *hrc*. Certaines souches portent le gène de la lysine synthétase de l'acide indole acétique (*iaaL*) pour l'inactivation de l'auxine. Les souches ont un habitat commun dans les phylogroupes. Elles sont principalement isolées des plantes (P), de l'environnement (E) ou des deux, c'est-à-dire qu'elles sont omniprésentes (U). Certaines souches ont un pouvoir glaçogène car elles portent un gène codant une protéine de nucléation de la glace (INA). HR, réponse hypersensible; LCA, dernier ancêtre commun; N.D., non décrit jusqu'à présent; T3SS, système de sécrétion de type III; T-PAI, PAI tripartite. \* PG 2 clade c et PG 13 ont des S-PAI atypiques avec des emplacements génomiques distincts (d'après Xin et al. 2018)

#### 4.3.5. Les facteurs impliqués dans la virulence de *P. syringae*

##### a) Evolution vers une bactérie phytopathogène

Il est estimé que le dernier ancêtre commun des lignées canoniques de *P. syringae* date d'il y a 153 à 183 millions d'années (figure 4.10) (Xin et al. 2018). Celui-ci possédait probablement des facteurs de virulence comme le T-PAI, la capacité à induire une réaction HR sur plantes résistantes, le pouvoir glaçogène, et la capacité à inactiver l'auxine végétale par la biosynthèse de la synthétase acide indol acétique-lysine codée par *iaaL* qui sont actuellement des traits communs à toutes les lignées canoniques de *P. syringae* (Xin et al. 2018).

Le SST3 le plus courant dans les lignées phytopathogènes de *P. syringae* est le T-PAI qui contient trois sections distinctes (Xin et al. 2018; Baltrus et al. 2017). Ce système de sécrétion canonique est requis pour la virulence *in planta* des souches phytopathogènes des phylogroupes 1, 2, 3, 4, 5, 6 (Baltrus et al. 2017; Xin et al. 2018). Toutefois, un système de sécrétion atypique, A-PA, a été décrit chez des souches de *P. syringae* du PG 2, clade 2c. Les souches possédant le A-PAI sont d'excellents épiphytes et sont parfois pathogènes des plantes. Le SST3 T-PAI est également présent chez toutes les souches des phylogroupes 10 et 8 qui sont associées à des environnements non agricoles (Dillon et al. 2019b). Par ailleurs, certaines des souches du phylogroupe 10 sont pathogènes des plantes et possèdent le T-PAI (Dillon et al. 2019b).

##### b) Les ET3

Le répertoire d'ET3 est indispensable pour la virulence et l'agressivité des souches de *P. syringae* sur leurs hôtes. Sa composition en effecteurs est très variable, mais est en moyenne de 30 ET3 (Dillon et al. 2019a, 2019b; Xin et al. 2018; Cunnac et al. 2009). Certaines souches comme *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 possède plus de 40 T3E alors que la souche cit7 de *P. syringae* en possède moins de 15 (Baltrus et al. 2011). Le nombre d'effecteurs dans le répertoire n'est pas forcément lié à une augmentation de l'agressivité sur les plantes, par exemple, la souche mutante de DC3000 qui contient un set de seulement huit T3E (*AvrPtoB*, *HopM1*, *AvrE*, *HopE1*, *HopG1*, *HopAM1-1*, *HopAA1-1* et *HopN1*) est agressive sur la tomate (Cunnac et al. 2009). En général, les souches du PG 2 contiennent moins de T3E comparativement aux souches phytopathogènes des autres phylogroupes (Berge et al. 2014; Dillon et al. 2019a). En moyenne les souches du complexe d'espèces contiennent 30 ET3 alors que les souches du PG 2 contiennent généralement entre 10 et 30 ET3 au maximum pour très peu de souches (Dillon et al. 2019a).

Par l'analyse de 494 séquences génomiques de souches du complexe d'espèces *P. syringae*, plus de 14 613 T3Es différents ont été identifiés (Dillon et al. 2019a). Ces T3Es sont répartis dans 70 familles d'effecteurs et certaines de ces familles sont très conservées (*avrE*, *hopM* et *hopAA*) et présentes dans plus de 95 % des souches pathogènes des espèces cultivées (Dillon et al. 2019a). Les fonctions de ces effecteurs sont associées à la suppression de la PTI pour et à l'établissement d'un environnement aqueux dans l'apoplasme à l'origine du symptôme de lésion humide (water-soaking) pour *avrE* et *hopM1* (Xin et al. 2018) tandis que *hopAA* est impliqué dans le développement des symptômes de moucheture chez la tomate (Munkvold et al. 2009). Les fonctions et les cibles des autres familles d'effecteurs sont très diverses comme illustré dans le Tableau 4.3 (Xin et al. 2018).

Tableau 4.3. Cibles des ET3 produits par le SST3 des souches du complexe d'espèces *P. syringae* (D'après Xin et al. 2018)

T3Es	Host targets*	Host process
AvrPto	FLS2, EFR and BAK1	PTI
AvrPtoB	FLS2, CERK1, Bti9 and BAK1	PTI
HopB1	BAK1	PTI
AvrPphB	BIK1, PBS1 and PBLs	PTI
HopF2	BAK1 and MKK5	PTI
HopAl1	MPK3, MPK6 and MPK4	PTI
AvrRpt2	MPK4 and MPK11	PTI
AvrRps4	WRKY transcription factors	PTI
HopD1	NTL9	ETI
AvrPtoB	FEN and R <sub>HopAD1</sub>	ETI
HopX1, HopBB1 and HopZ1a	JAZ	JA
AvrB	–	JA
AvrRpt2	AUX/IAA	Auxin
AvrPtoB	–	ABA
HopAM1	–	ABA
HopQ1	–	Cytokinin
HopAF1	MTN1 and MTN2	Ethylene
HopI1	–	SA
HopW1	Actin	Actin
HopG1	Kinesin	Actin
HopE1	MAP65	Microtubule
HopZ1a	Tubulin	Microtubule
HopM1	MIN7	Water balance
AvrE	PP2A	–
HopN1	PsbQ	Chloroplast
HopI1	HSP70	Chloroplast
HopK1	–	Chloroplast
AvrB	RIN4, MPK4, HSP90 and RAR1	RIN4 complex
AvrRpt2	RIN4	RIN4 complex
AvrRpm1	RIN4	RIN4 complex
AvrPto and AvrPtoB	RIN4	RIN4 complex
HopF2	RIN4	RIN4 complex
AvrRps4 and HopA1	EDS1	EDS1
HopU1	GRP7 and GRP8	Gene transcript
HopZ1a and HopZ1b	GmHID1	Phytoalexin
HopZ4	RPT6	Proteasome
HopM1, HopG1, HopAO1 and HopA1	–	Proteasome

ABA, abscisic acid; AUX, auxin; BAK1, BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase1; MIN7, HopM1-interactor 7; BIK1, Botrytis-induced kinase 1; Bti9, AvrPtoB tomato-interacting 9; CERK1, chitin elicitor receptor kinase 1; EFR, elongation factor Tu receptor; ETI, effector-triggered immunity; FEN, fenthion sensitivity; FLS2, flagellin-sensitive 2; GmHID1, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; GRP, glycine-rich RNA-binding protein; HSP, heat shock protein; IAA, indole-3-acetic acid; JA, jasmonate; JAZ, jasmonate ZIM domain-containing protein; MAP65, microtubule-associated protein 65; MKK5, mitogen-activated protein kinase kinase 5; MPK, mitogen-activated protein kinase; MTN, methylthioadenosine nucleosidase; NTL9, protein NTM1-like 9; PBL27, PBS1-like 27; PBS1, AvrPphB susceptible 1; PP2A, protein phosphatase 2A; PTI, pattern-triggered immunity; PsbQ, photosystem II subunit Q; RAR1, required for MLA12 resistance 1; RHopAD1, R protein recognizing HopAD1; RIN4,

### c) Les toxines

La production de phytotoxines est un contributeur de l'agressivité des souches du complexe d'espèces *P. syringae* (Baltrus et al. 2011). Les phytotoxines sont des métabolites secondaires qui possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques (Bender 1999). Au moins huit phytotoxines sont synthétisées par les souches de *P. syringae*. Il s'agit de la coronatine, tabtoxine, phaseolotoxine, syringopétine, syringoline, mangotoxine, l'auxine et syringomycine (Dillon et al. 2019b). L'auxine est la toxine la plus distribuée au sein du complexe d'espèces *P. syringae* et est retrouvée dans la quasi-totalité des souches à l'exception de PziICMP8959 du phylogroupe 4 (Dillon et al. 2019b; Glickmann et al. 1998). Elle est synthétisée par les gènes *iaaM* et *iaaH* et perturbe le système hormonal de la plante (Glickmann et al. 1998; Xin et al. 2018). Les autres toxines sont plus ou moins distribuées dans les souches des différents phylogroupes du complexe d'espèces *P. syringae* (Dillon et al. 2019b). Contrairement aux souches des autres phylogroupes, la majorité des souches du PG 2, sont capables de produire plusieurs toxines à la fois dont la syringomycine, la syringoline, la mangotoxine, la phaseolotoxine et la syringopéptine (Xin et al. 2018; Dillon et al. 2019b). Par exemple la souche B728A produit la syringoline, la syringopéptine et la syringomycine (Baltrus et al. 2011). Des souches de *P. syringae* pathogènes de Cucurbitacées produisent quant à elles la mangotoxine, la syringoline, la syringopéptine et la syringomycine (Newberry et al. 2019). Certaines souches possèdent aussi le gène *dcd2* impliqué dans la synthèse de la phaseolotoxine mais elles manquent d'autres gènes pour la production de cette toxine (Newberry et al. 2019).

Différentes fonctions ont été décrites pour ces phytotoxines. La production de mangotoxine est régulée par les gènes *gacS/gacA* et assurée par quatre gènes *mbo* (Carrión et al. 2014). Chez *P. syringae* pv. *syringae* pathogène de la mangue, la production de mangotoxine est un facteur de virulence clé conduisant à la formation de nécroses (Carrión et al. 2014; Arrebola et al. 2007). La syringoline A est synthétisée grâce à un cluster de cinq gènes (*syIA* à *syIE*) où *syIA* est un activateur de transcription putatif, *syIB* code une lysine reductase putative, *syIC* code un module prédit pour l'activation de la valine, *syID* cible deux modules NRPS (nonribosomal peptide synthase) qui activent la lysine et l'acide 5-méthyl-4-amino-2-hexenoïque et *syIE* code pour un exportateur potentiel (Huang et al. 2018; Amrein et al. 2004). La syringoline A est un facteur de virulence important pour la souche B728A pathogène du haricot puisque les mutants sont nettement moins agressifs (Groll et al. 2008). La syringoline A est un inhibiteur du protéasome eucaryote et empêche la fermeture stomatique induite lors de la PTI (Schellenberg et al. 2010). La production de syringopéptine et de syringomycine implique les gènes *sypA* et *syrB1* respectivement chez la souche B301D de *P. syringae* (Scholz-Schroeder et al. 2001). Ces deux toxines sont des facteurs de virulence importants pour les souches de *P. syringae*. Ainsi, les mutants de *sypA* sont à 59 % moins agressifs, ceux de *syrB1* sont à 59 % moins agressifs et les mutants des deux gènes à 76 % moins agressifs sur la cerise (Scholz-Schroeder et al. 2001).

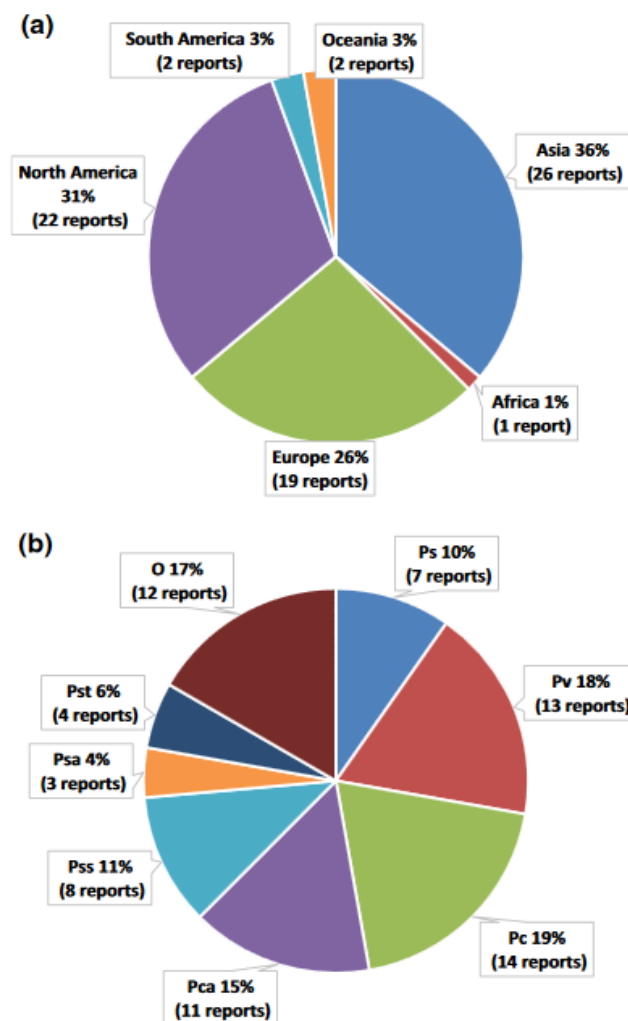


Figure 4.11. (A) Cas d'épidémies (%) sur les plantes annuelles dues au complexe d'espèces *P. syringae* signalés dans le monde depuis 2000 (B) Cas d'épidémies (%) associées à chaque groupe bactérien responsable d'une maladie : (Ps) *Pseudomonas syringae*, (Pv) *Pseudomonas viridiflava*, (Pc) *Pseudomonas cichorii*, (Pca) *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*, (Pss) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, (Psa) *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*, (Pst) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* et (o) autres pathovars divers. (d'après Lamicchane et al. 2015)

#### d) Le pouvoir glaçogène

Le pouvoir glaçogène, en anglais « ice nucleation activity» (INA), participe au pouvoir pathogène de *P. syringae*. Ce facteur de virulence est présent chez 85 % des souches du PG 2 (Berge et al. 2014). Le pouvoir glaçogène confère à *P. syringae* la capacité de geler l'eau à des températures « chaudes » autour de -2.5°C à -5°C ce qui crée des blessures à la surface des feuilles (Maki et al. 1974; Lindow 1982). Cette capacité à rompre la surfusion d'eau est possible par la production de protéines par le gène *InaZ* qui serviront à initier le gel (Cochet and Widehem 2000). Le pouvoir glaçogène est particulièrement impliqué dans l'agressivité des souches de *P. syringae* sur les arbres (Kennelly et al. 2007) mais également sur les plantes annuelles comme le maïs, la tomate, le concombre, le pois ou le haricot (O'Brien and Lindow 1988).

### 4.4. Impacts des souches du complexe d'espèces *P. syringae* en agriculture

Les pathovars du complexe d'espèces *P. syringae* ont été élus pour remporter la médaille d'or dans le concours des bactéries phytopathogènes les plus coriaces (Mansfield et al. 2012). L'impact économique de *P. syringae* est très important en raison de la résurgence d'anciennes maladies comme la tache bactérienne de la tomate causée par *P. syringae* pv. *tomato* (Shenge et al. 2007; Cruz et al. 2010; Mensi et al. 2018) ou le chancre du kiwi causé par *P. syringae* pv. *actinidiae* (Scortichini et al. 2012) mais aussi à cause de l'apparition de nouvelles maladies comme le chancre du marronnier en Europe causée par *P. syringae* pv. *aesculi* (Green et al. 2010). Les maladies causées par *P. syringae* sur les plantes ligneuses ont un impact très important sur l'économie agricole (Lamichhane et al. 2014). Par exemple, en Italie, *P. syringae* responsable de chancres a détruit des milliers d'hectares de noisetiers engendrant une perte annuelle d'environ 1.5 millions de dollars (Scortichini 2002). Sur les kiwis, *P. syringae* pv. *actinidiae* a détruit des milliers de plantes à travers le monde. En Nouvelle-Zélande uniquement, il a été estimé qu'en 2012 plus de 90 000 tonnes de kiwis ont été perdus engendrant une perte économique chiffrée à 76 millions de dollars (Lamichhane et al. 2014). Il est par ailleurs estimé que sur 15 ans (2010 à 2025), le chancre du kiwi pourrait engendrer des pertes allant jusqu'à 885 millions de dollars pour l'industrie du kiwi Néo-Zélandaise (Greer and Saunders 2012). Sur plantes annuelles, les pertes économiques sont difficilement quantifiables car les plantes sont rarement tuées (Lamichhane et al. 2015). Les dégâts occasionnés par les pathovars du complexe d'espèces *P. syringae* impactent surtout le rendement final mais il est difficile de traduire ces pertes en terme de données économiques chiffrées.

Sur les plantes annuelles, depuis le début de ce siècle, plus de 70 signalements d'épidémies dues à des bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* ont été signalés sur plus de 40 espèces végétales et sur tous les continents (Figure 4.11) (Lamichhane et al. 2015). L'incidence des maladies (nombres de cas apparus sur une population) est fréquemment comprise entre 50 et 100 % (Lamichhane et al. 2015). Par exemple, en 1996 et 1997, *P. syringae* pv. *aptata* a affecté plus de 80 % des parcelles de melon dans le sud de la France entraînant des pertes de rendement allant jusqu'à 100 % (Lamichhane et al. 2015). Entre 2004 et 2005 dans la province du Kurdistan en Iran, l'incidence de *P. syringae* pv. *lachrymans* était de 100 % dans les parcelles de concombre (Harighi 2007). En 2008 sur citrouille cultivées en Serbie, *P. syringae* pv. *syringae* a causé des épidémies de taches bactériennes sur les plantes à une incidence de la maladie de 5 à 20 % (Balaž et al. 2014).



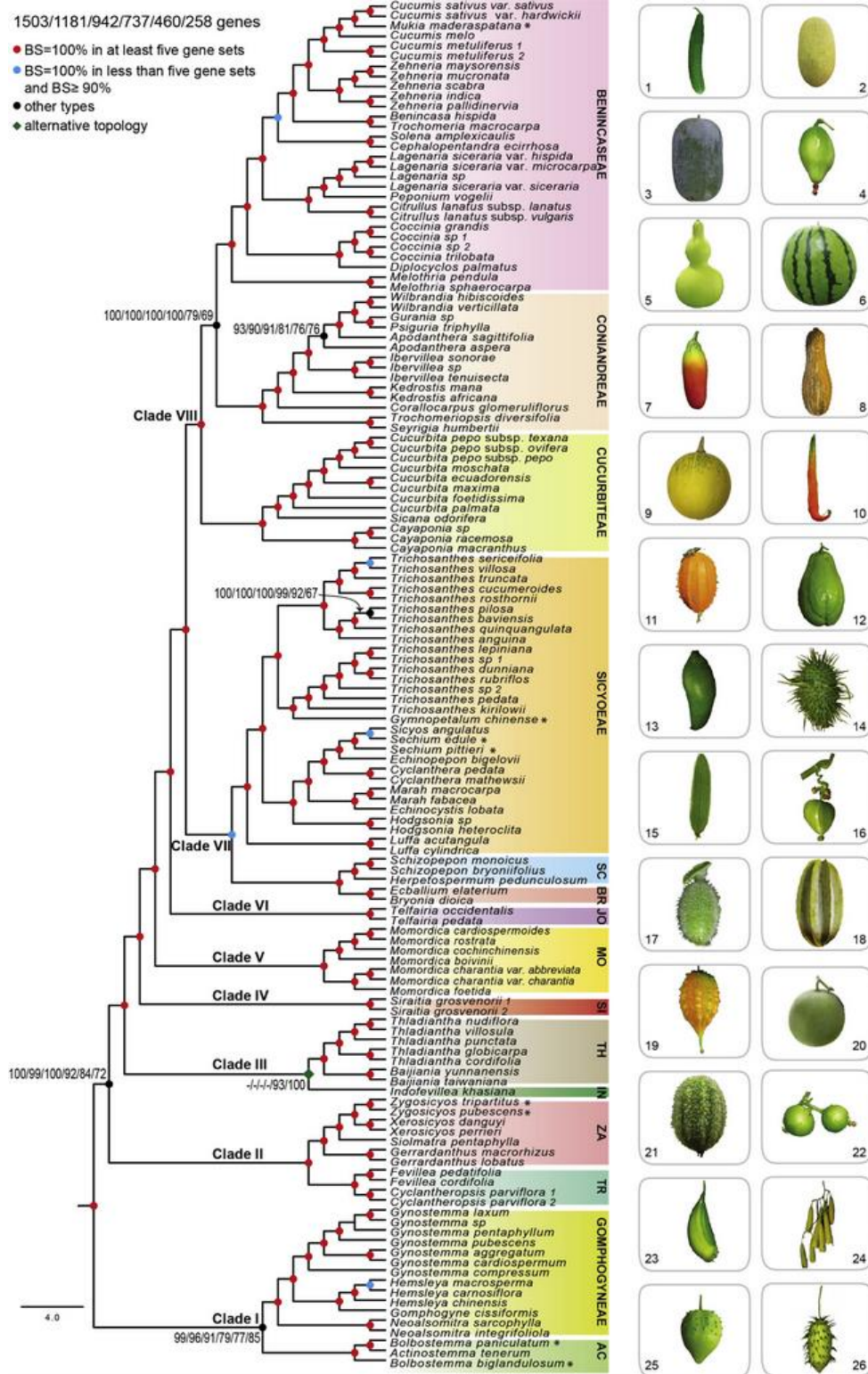


Figure 5.1. Relations phylogénétiques des cucurbitacées estimées par Astral à l'aide de six ensembles de gènes. (d'après Guo et al. 2020)

## 5. La courgette

### 5.1. Caractérisation génétique de la courgette

#### 5.1.1. La taxonomie des Cucurbitacées et de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*

La courgette, *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* L., est une plante annuelle dicotylédone qui appartient à la famille des Cucurbitacées et à la tribu des *Cucurbiteae*. La famille des Cucurbitacées est grande et contient environ 130 genres et 800 espèces différentes (Salehi et al. 2019).

#### 5.1.2. La famille des Cucurbitacées

Historiquement, la taxonomie et la systématique des Cucurbitacées s'est basée sur des critères morphologiques comme la forme des vrilles, les types de fruits, la structure des téguments de la graine et la structure des grains de pollen (Jeffrey 1980). Puis des marqueurs chloroplastiques, nucléaires et mitochondriaux ont permis une mise à jour de la classification néanmoins certaines relations génétiques inter-tribus n'étaient pas résolues (Schaefer et Renner 201; Renner et Schaefer 2016). Très récemment, les analyses faites sur des séquences de génomes complets et de transcriptomes ont permis de construire une phylogénie bien résolue des Cucurbitacées (Guo et al. 2020). La famille des Cucurbitacées contient 13 tribus dont trois (*Cucurbiteae*, *Benincaseae* et *Momordiceae*) qui contiennent des espèces cultivées pour l'alimentation humaine (Figure 5.1) (Guo et al. 2020). Ainsi, la tribu des *Cucurbiteae* contient les courgettes et les courges (*Cucurbita* sp.), la tribu des *Benincaseae* contient les melons (*Cucumis melo*), les concombres (*Cucumis sativus*), la courge cireuse (*Benincasa hispida*) et les pastèques (*Citrullus lanatus*), la tribu des *Momordiceae* contient le melon amer (*Momordica charantia*) (Guo et al. 2020). L'origine des Cucurbitacées date d'il y a environ 80 millions d'années (Guo et al. 2020). Les tribus des *Cucurbiteae* (courgettes et courges), des *Coniandreae* et des *Benincaseae* (concombres, melons, pastèque) appartiennent à un même clade (clade VIII) qui a émergé pendant l'éocène il y environ 40 millions d'années (Guo et al. 2020).

Tableau 5.1. Espèces et sous-espèces du genre *Cucurbita* (adapté d'après Kates et al. 2017 et Paris et al. 2015).

Espèce (Cultivée / Sauvage)	Sous-espèces (Cultivée / Sauvage)	Exemples de types cultivés
<i>Cucurbita pepo</i> <sup>C/S</sup>	<i>pepo</i> <sup>C</sup>	Courgette, citrouille, courge marrow et cocozelle
	<i>ovifera</i> ou <i>texana</i> <sup>C/S</sup>	Courge acorn, courge scalopp, courge straightneck et courge crookneck
	<i>ozarkana</i> <sup>S</sup>	-
	<i>fraterna</i> <sup>S</sup>	-
<i>Cucurbita maxima</i> <sup>C/S</sup>	<i>maxima</i> <sup>C</sup>	Potiron hubbard, courges kabocha, potiron géant
	<i>andreaana</i> <sup>S</sup>	-
<i>Cucurbita argyrosperma</i> <sup>C/S</sup>	<i>argyrosperma</i> <sup>C</sup>	Courge cushaw
	<i>sororia</i> <sup>S</sup>	-
<i>Cucurbita moschata</i> <sup>C</sup>	-	Butternut, courge musquée
<i>Cucurbita ficifolia</i> <sup>C</sup>	-	Courge de Siam, melon thaï
<i>Cucurbita cordata</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita digitata</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita ecuadorensis</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita foetidissima</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita lundelliana</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita okeechobeensis</i> <sup>S</sup>	<i>okeechobeensis</i> <sup>S</sup>	-
	<i>martinezii</i> <sup>S</sup>	-
<i>Cucurbita palmata</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita pedatifolia</i> <sup>S</sup>	-	-
<i>Cucurbita radicans</i> <sup>S</sup>	-	-

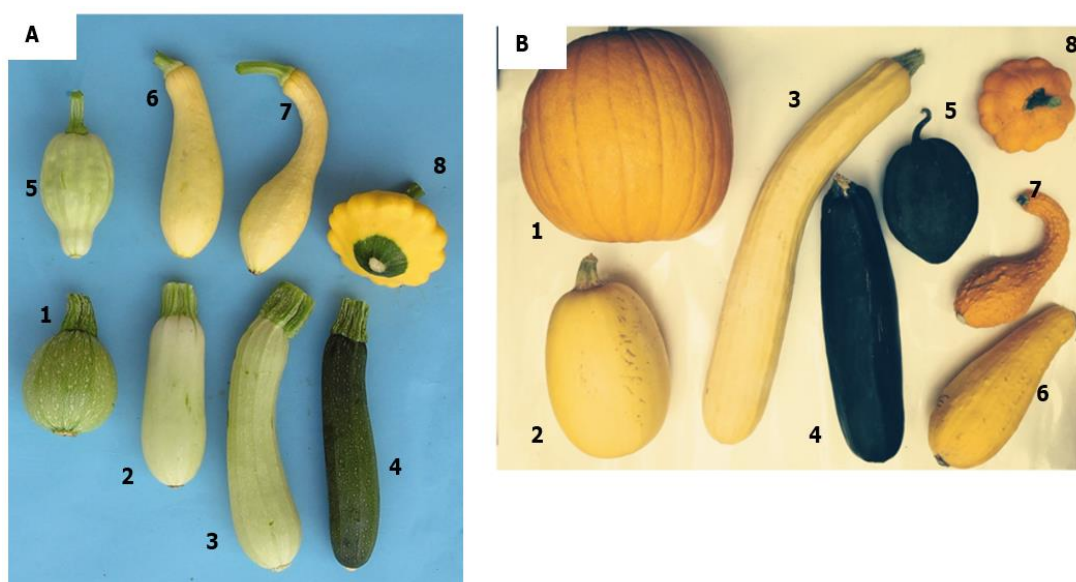


Figure 5.2. Les quatre types morphologiques cultivés décrits dans *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* (1 à 4) et dans *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (5 à 8) (A) fruits immatures (B) fruit matures. Types morphologiques de fruits : (1) citrouille (2) courge marrow (3) cocozelle (4) courgette (5) courge acorn (6) courge straightneck (7) courge crookneck (7) courge scallop. (Adapté d'après Lust et Paris 2016)

### 5.1.3. Le genre *Cucurbita*

Le genre *Cucurbita* a été décrit pour la première fois au milieu du dix-huitième siècle (Salehi et al. 2019). Le genre *Cucurbita* contient à ce jour six lignées cultivées (*C. argyrosperma*, *C. ficifolia*, *C. moschata*, *C. maxima*, *C. pepo* subsp. *pepo* et *C. pepo* subsp. *texana*) et neuf espèces sauvages (tableau 5.1) (Kates et al. 2017). Les espèces sauvages et cultivées du genre *Cucurbita* sont originaires du continent Américain. Les deux sous-espèces *pepo* et *texana* (synonyme *ovifera*) sont cultivées (Kates et al. 2017; Xanthopoulou et al. 2019). *C. pepo* subsp. *pepo* contient quatre types de fruits différenciés morphologiquement : la courgette, le cocozelle, la courge « marrow » et la citrouille (Figure 5.1) (Paris et al. 2015; Paris 2001; Xanthopoulou et al. 2019). La courgette est un fruit uniformément cylindrique et vert foncé quand il est jeune (Paris 2001). La sous-espèce *C. pepo* subsp. *texana* contient quatre autres types de fruits : la courge acorn, la courge crookneck, la courge scallop et la courge straightneck (Figure 5.2) (Paris et al. 2015; Paris 2001; Xanthopoulou et al. 2019). En plus des différences morphologiques, des différences génétiques existent entre les différents types de fruits (voir partie 5.1.5).

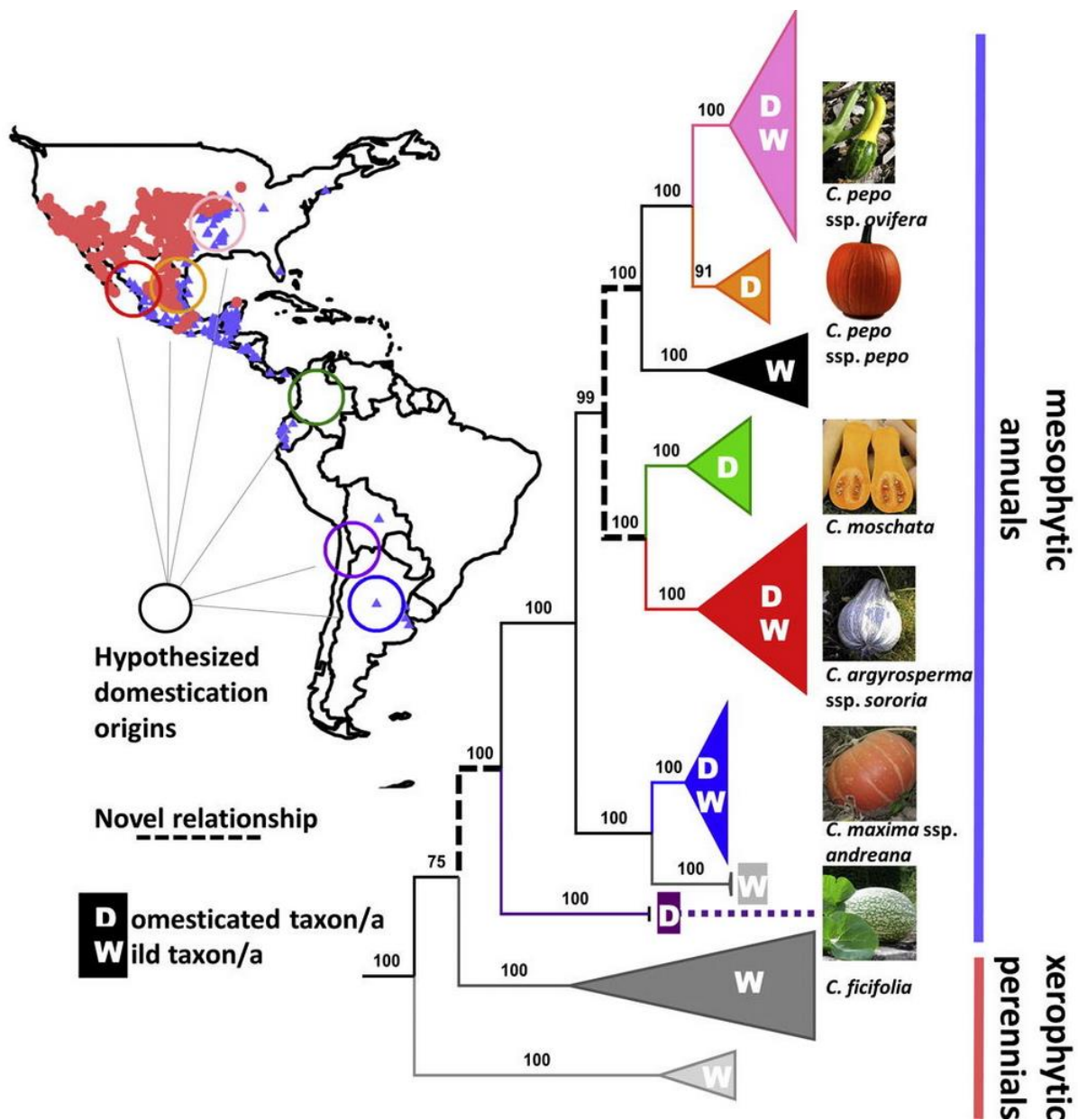


Figure 5.3. Relations génétiques entre des taxons sauvages et cultivés du genre *Cucurbita*. Le genre *Cucurbita* comprend un clade avec des espèces annuelles mésophytes (adaptées aux milieux ni trop humides ni trop secs). Ce clade contient les six lignées cultivées du genre. Un autre clade regroupe des espèces pérennes xérophytes (adaptées aux milieux secs) et ancestrales du genre. (D) pour taxons domestiqués (W) pour taxons sauvages. (Adapté d'après Kates et al. 2017).



#### 5.1.4. Origine et domestication de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*

L'origine de chacune des six lignées du genre *Cucurbita* serait indépendante et elles seraient issues d'ancêtres sauvages différents (Kates et al. 2017) (Figure 5.3). Les six lignées domestiquées proviendraient d'une radiation évolutive récente (7 millions d'années) à partir d'un ancêtre commun mésophyte d'Amérique centrale ou d'Amérique du sud (Kates et al. 2017; Khoury et al. 2020; Schaefer et al. 2009). Contrairement à de nombreuses espèces cultivées, les ancêtres de *C. pepo* subsp. *pepo* n'ont pas encore été clairement identifiés à ce jour et les taxons sauvages n'ont pas encore été découverts dans cette sous-espèce (Kates et al. 2017; Castellanos-Morales et al. 2019). Récemment, plusieurs scénarios évolutifs ont été testés à partir de séquences d'ADN de loci microsatellites et de chloroplastes issus de plusieurs taxons de *C. pepo* (Castellanos-Morales et al. 2019). Les deux scénarios les plus probables sont que (i) *C. pepo* subsp. *pepo* soit le résultat du croisement entre *C. pepo* subsp. *ovifera* et *C. pepo* subsp. *fraterna* ou (ii) que *C. pepo* subsp. *fraterna* soit l'ancêtre sauvage direct de *C. pepo* subsp. *pepo* (Castellanos-Morales et al. 2019). Les difficultés pour identifier l'ancêtre de *C. pepo* subsp. *pepo* sont notamment liées à l'expansion très rapide des populations cultivées après plusieurs domestications indépendantes et anciennes à partir de plusieurs espèces sauvages (Kates et al. 2017; Castellanos-Morales et al. 2019). Les efforts d'échantillonnage de taxons sauvages de *C. pepo* devront être poursuivis pour améliorer la résolution de la phylogénie et mieux comprendre l'histoire évolutive du genre *Cucurbita* (Castellanos-Morales et al. 2019; Kates et al. 2017). Néanmoins, ce travail est difficile compte tenu de la rareté et du déclin de ces espèces endémiques sauvages originaires du Mexique.

La domestication de *Cucurbita* (courges et citrouilles) est l'une des plus anciennes jamais enregistrées, avec des preuves archéologiques indiquant que les espèces de *Cucurbita* étaient utilisées par les humains il y a 10 000 ans au Mexique (Smith 1992). Cela représente une date antérieure de 4 000 ans par rapport à la domestication d'autres espèces cultivées originaires d'Amérique comme le maïs ou les haricots (Smith 1992). Les données archéologiques et les archives linguistiques supportent l'hypothèse que *C. pepo* ait été domestiquée à partir de deux sites géographiques indépendants. Le premier site de domestication a été estimé à 10 000 ans au Mexique dans la région d'Oaxaca et le seconde à 5 000 ans au Sud-Est des USA (Castellanos-Morales et al. 2019). Ces deux domestications indépendantes ont conduit à deux populations distinctes : *C. pepo* subsp. *pepo* et *C. pepo* subsp. *texana* (Paris et al. 2015).

Tableau 5.2. Dissimilarités moyennes calculées sur la base de marqueurs HFO-TAG entre les différents groupes et au sein d'un groupe. Effectifs utilisés : 48 accessions de *C. pepo* subsp. *pepo*, 14 accessions de *C. pepo* subsp. *texana* et 4 accessions de *Citrullus lanatus*. (Adapté d'après Paris et al. 2015)

	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	<i>C. pepo</i> subsp. <i>texana</i>	<i>Citrullus lanatus</i>
<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	9,28	11,42	16,44
<i>C. pepo</i> subsp. <i>texana</i>	-	9,44	16,00
<i>Citrullus lanatus</i>	-	-	8,62

Tableau 5.3. Dissimilarités moyennes calculées sur la base de marqueurs HFO-TAG entre les différents groupes morphologiques de *C. pepo* subsp. *pepo* et *C. pepo* subsp. *texana*. Effectifs utilisés : 11 accessions de cocozelle, 19 accessions de citrouille, 10 accessions de courge marrow, 3 accessions de courgette, 2 accessions de courge acorn, 2 accessions de courge crookneck, 2 accessions de courge straightneck et 2 accessions de courge crookneck. (Adapté d'après Paris et al. 2015)

	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i>				<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>texana</i>			
	Cocozelle	Citrouille	Courge marrow	Courgette	Courge Acorn	Courge scallop	Courge straightneck	Courge crookneck
Cocozelle	8.83	9.27	8.86	8.94	11.95	11.19	11.39	11.35
Citrouille	-	9.24	9.30	9.42	11.95	11.70	11.34	11.66
Courge Marrow	-	-	8.92	8.92	11.69	11.39	11.15	11.51
Courgette	-	-	-	6.21	11.39	11.89	10.92	12.19
Courge Acorn	-	-	-	-	7.07	11.35	9.18	10.88
Courge scallop	-	-	-	-	-	6.56	10.02	11.35
Courge straightneck	-	-	-	-	-	-	6.00	10.02
Courge crookneck	-	-	-	-	-	-	-	6.63



### 5.1.5. La diversité inter et intra spécifique de la courgette

Toutes les espèces du genre *Cucurbita* sont diploïdes et contiennent  $2n = 40$  chromosomes et la longueur du génome de *C. pepo* est estimée à 283 Mb (Gong et al. 2008; Montero-Pau et al. 2018). Différents marqueurs génétiques polymorphes sont utilisés pour étudier les relations génétiques entre les taxons de *C. pepo* dont des marqueurs d'amplification aléatoire d'ADN polymorphes (RAPD), le polymorphisme de longueurs des fragments amplifiés (AFLP), les marqueurs microsatellites (SSR, ISSR) et les oligonucléotides à haute fréquence ciblant des gènes actifs (HFO-TAG) (Paris et al. 2015). Récemment, sur la base de 539 marqueurs HFO-TAG, les relations entre 68 accessions de *C. pepo* ont été évaluées par analyses de dissimilarités moyennes (Paris et al. 2015). Les dissimilarités moyennes entre des accessions appartenant à une même sous-espèce (*C. pepo* subsp. *pepo* ou *C. pepo* subsp. *texana*) sont moins importantes que les dissimilarités moyennes entre les sous-espèces (Tableau 5.2).

Au sein des taxons de *C. pepo* subsp. *pepo*, les dissimilarités moyennes sont de 9,28 alors qu'entre les taxons de *C. pepo* subsp. *pepo* et les taxons de *C. pepo* subsp. *texana*, dissimilarités moyennes sont de 11,42 (Tableau 5.2). Entre *C. pepo* subsp. *pepo* et un taxon génétiquement éloigné (pastèque, *Citrulus lanatus*), les dissimilarités moyennes sont de 16,44 (Tableau 5.2) (Paris et al. 2015).

Au sein de *C. pepo* subsp. *pepo* les dissimilarités moyennes ont été calculées pour les quatre groupes morphologiques (courgette, citrouille, cocozelle et la courge marrow) (Paris et al. 2015). Les courgettes ont une dissimilarité moyenne de 8,94 avec les cocozelles, 9,42 avec les citrouilles et 8,92 avec les courges marrow respectivement (tableau 5.3). Au sein du groupe des courgettes, la dissimilarité moyenne est de 6,21. Lorsque les courgettes sont comparées avec les groupes morphologiques de *C. pepo* subsp. *texana*, les dissimilarités moyennes sont plus élevées avec des valeurs comprises entre 10,92 et 12,19 (Tableau 5.3) (Paris et al. 2015). D'autres méthodes ont été utilisées pour comparer la diversité génétique entre les groupes morphologiques de *C. pepo* subsp. *pepo* et *C. pepo* subsp. *texana* comme l'analyse du polymorphisme sur marqueurs AFLP (Paris et al. 2003). Ces analyses permettent de calculer la distance génétique entre les courgettes et les autres groupes morphologiques et révèlent des distances de 0,04 entre les courgettes et les cocozelles, 0,09 avec les courges marrow et 0,10 avec les citrouilles. De plus, les distances génétiques entre les courgettes et les groupes morphologiques de *C. pepo* subsp. *texana* sont plus élevées et comprises entre 0,21 et 0,23 (Paris et al. 2003).

Plus récemment, des analyses sur génomes complets de taxons de *C. pepo* ont révélé 3 823 911 séquences polymorphes distribuées dans les génomes de huit accessions contenant deux courgettes, une cocozelle, une citrouille et une courge marrow (*C. pepo* subsp. *pepo*) et une courge acorn, une courge crookneck et une courge scallop (*C. pepo* subsp. *texana*) (Xanthopoulou et al. 2019). Les résultats obtenus sont congruents avec ceux des travaux de (Paris et al. 2003). Les accessions de *C. pepo* subsp. *pepo* sont clairement séparées des accessions de *C. pepo* subsp. *texana* avec plus de 2 000 000 sites nucléotidiques polymorphes identifiés dans les séquences (Figure 5.4) (Xanthopoulou et al. 2019).

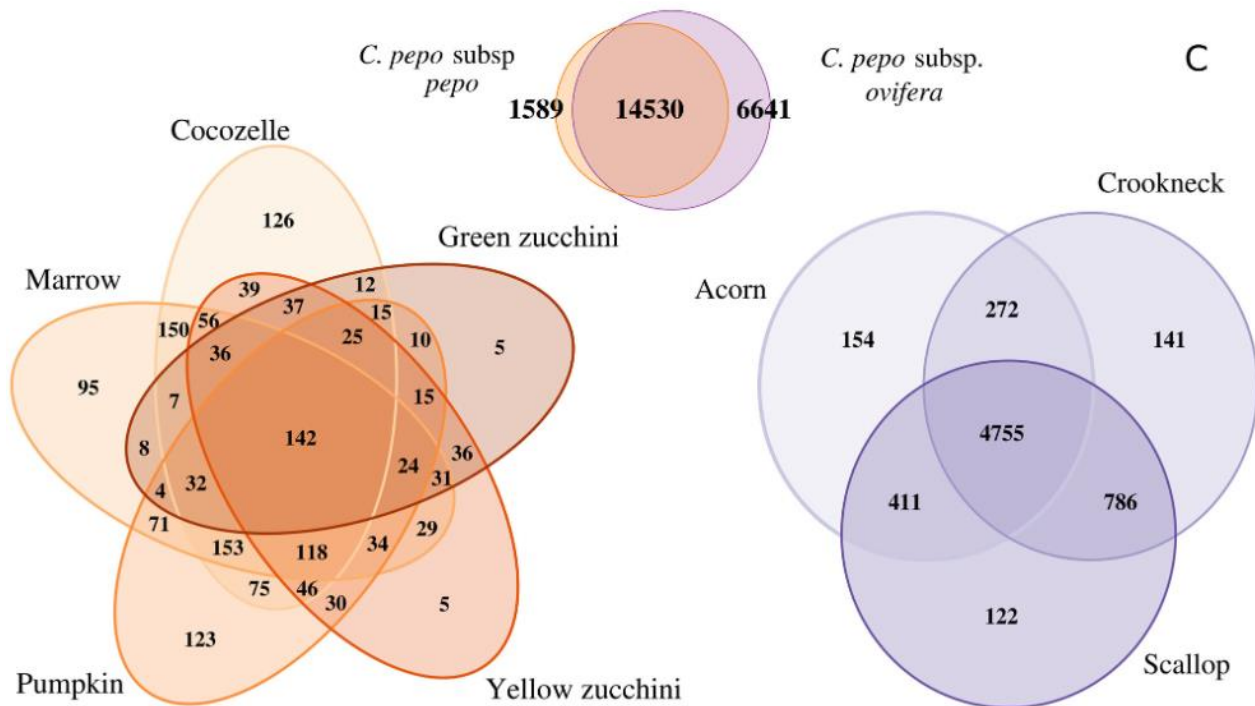


Figure 5.4. Diagrammes de Venn illustrant l’analyse du polymorphisme nucléotidique (SNP) pour huit accessions de *C. pepo* (5 accessions de subsp. *pepo* et 3 accessions de subsp. *texana*) sur la base de génomes complets. Les nombres indiqués correspondent au nombre de gènes avec des SNP. (Adapté d’après Xanthopoulou et al. 2019)

Tableau 5.4. Caractéristiques générales sur les fleurs mâles et femelles des courgettes. (d’après Nepi et Pacini, 1993)

	Male flower	Female flower
Total number of flowers during the life of a plant (mean ± s.d.)	35.5 ± 8 n = 10	4.5 ± 2 n = 10
Male-female flower ratio per plant		
Gametophyte number per flower (mean ± s.d.)	16487 ± 231 n = 10	411 ± 52 n = 20
Pollen-ovule ratio per plant		
Number of visits per flower (mean ± s.d.)	60 ± 12 n = 20	78 ± 16 n = 10
Mean time of visit per flower (s) (mean ± s.d.)	41 ± 25 n = 20	90 ± 66 n = 10
Nectar volume per flower (µl) (mean ± s.d.)	93 ± 26 n = 20	118 ± 22 n = 10

### 5.1.6. Terminologie et étymologie

La terminologie botanique et la terminologie du langage courant diffèrent et sont source de confusion pour le genre *Cucurbita*. (i) D'une part, certains noms génériques désignent plusieurs espèces différentes. Par exemple, le terme courge (squash en anglais) est générique et désigne plusieurs espèces végétales incluant toutes les sous-espèces de *C. pepo*, *C. maxima* et *C. moschata* (Whitaker and Bohn 1950). Le mot courgette, au sens générique, a parfois été utilisé de manière vague pour désigner tous les jeunes fruits de *C. pepo* subsp. *pepo* ainsi que les fruits d'autres espèces de *Cucurbita* (Lust and Paris 2016). Or botaniquement, la courgette désigne uniquement un type morphologique particulier de *C. pepo* subsp. *pepo*. (ii) D'autre part, il n'existe pas toujours d'équivalent Français/Anglais pour tous les termes utilisés pour décrire les *Cucurbita* spp. Par exemple, le mot pumpkin désigne en anglais toutes les courges du genre *Cucurbita* dont le fruit a une forme ronde alors qu'en Français, nous utilisons le terme citrouille mais également les termes potiron et potimarron pour désigner tout ce qui est appelé pumpkin en anglais. Par ailleurs, le terme pumpkin au sens botanique se réfère à un type morphologique particulier de la sous-espèce *C. pepo* subsp. *pepo* (Lust and Paris 2016).

La courgette est également appelée courgette en Anglais Britannique et plus couramment zucchini en anglais Américain. Le mot zucchini est un diminutif pluriel italien de zucca, qui était à l'origine appliqué à la Calebasse ou à la gourde (*Lagenaria siceraria*) (Lust and Paris 2016). En Français, le mot courgette est le dérivé du mot courge provenant du latin *Cucurbita*. Le suffixe -ette a une valeur de diminutif et se réfère donc à quelque chose de petit.

## 5.2. Caractérisation botanique, écologique et biochimique de la courgette

### 5.2.1. Caractéristiques botaniques

La courgette est une plante herbacée annuelle grimpante ou rampante non ramifiée à port dressé. Les feuilles alternes sont simples à palmatilobées et pétiolées. Les espèces de *Cucurbita* ont des tiges, des pétioles et des feuilles épineuses en raison de nombreux trichomes (Zajączkowska et al. 2015). Les feuilles sont grandes, parfois lobées ou tachetées, et des vrilles en forme de spirale sont fréquemment observables à l'aisselle des feuilles (Salehi et al. 2019).

La courgette est une plante monoïque et les fleurs sont unisexuées (mâle ou femelle). La fleur mâle porte l'androcée synanthère qui est l'ensemble des étamines soudées à la base de l'anthere. Chaque fleur mâle est en capacité de libérer environ 16 500 grains de pollen (Nepi and Pacini 1993). La viabilité du pollen de courgette est courte et décroît très rapidement après 6 h d'ouverture de la fleur mâle (Figure 5.5) (Nepi and Pacini 1993). Le gynécée contient un ensemble de trois carpelles fermés et soudés entre eux. Les loges carpellaires désignent l'ensemble des carpelles contenant les ovules insérés au niveau du placenta (placentation axile).

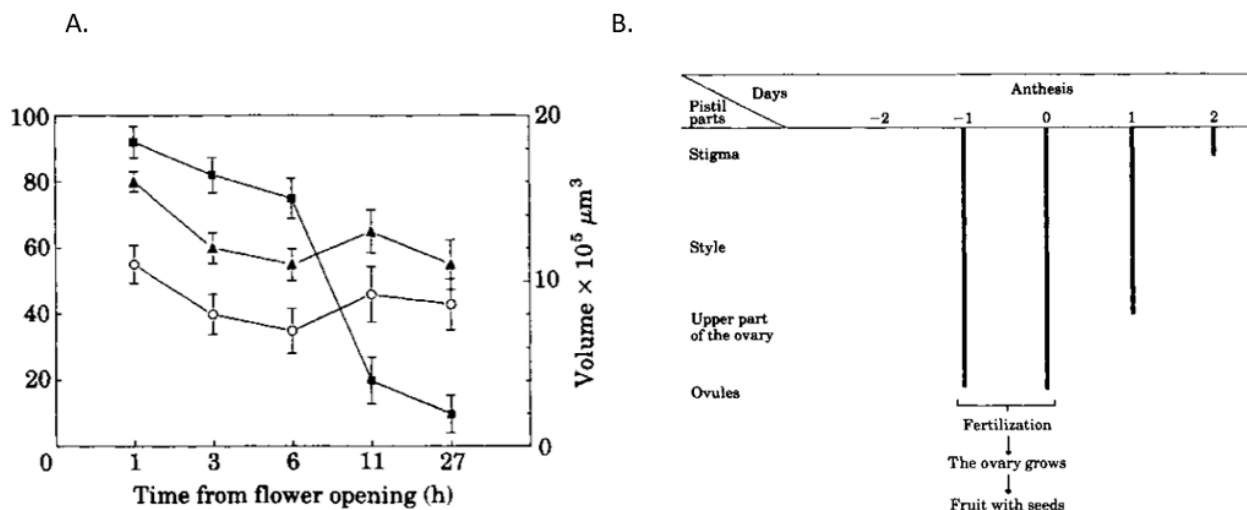


Figure 5.5. Viabilité du pollen (A) et réceptivité du pistil (B). (A) La courbe avec les carrés pleins représente la viabilité du pollen, la courbe avec les triangles pleins représente le volume du pollen et la courbe avec les cercles vides représente la teneur en eau du pollen. (à traduire en Français, D'après Nepi et Pacini)

### Optimum écologique

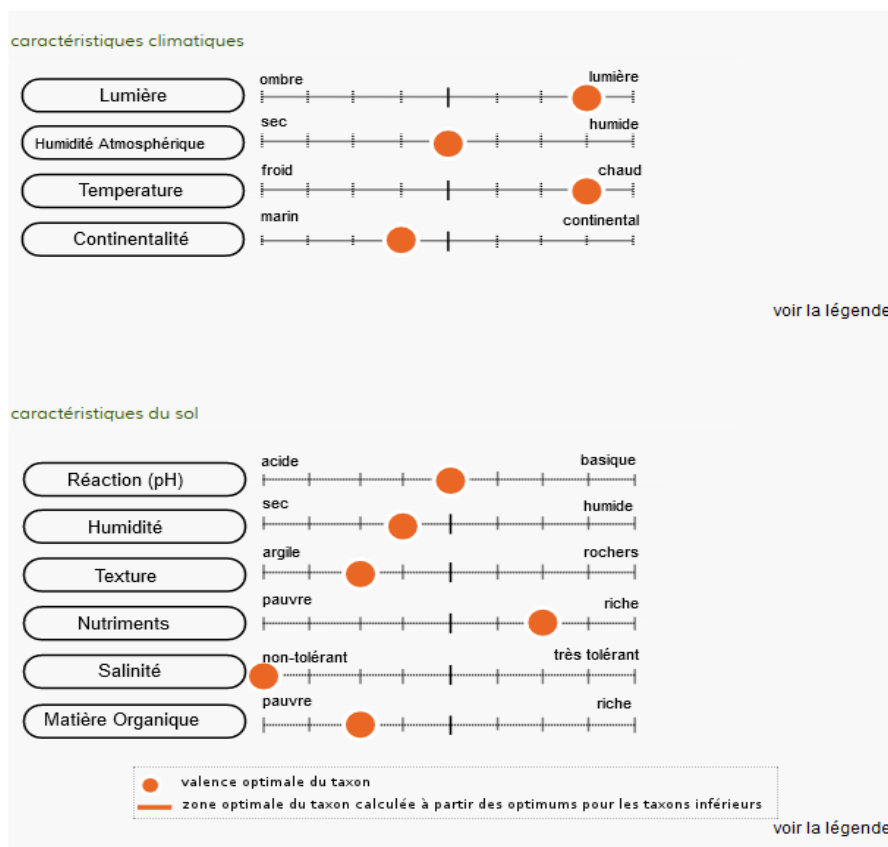


Figure 5.6. Optimum écologique de la courgette (*C. pepo* subsp. *pepo*) (d'après Tela Botanica <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-20235-synthese> consulté le 08/02/2021).

Les fleurs femelles de courgette sont épigynes, c'est-à-dire que leur ovaire infère est inclus dans le réceptacle floral. Chaque fleur de courgette contient environ 425 ovules (Nepi and Pacini 1993). Le stigmate est réceptif au pollen pendant quatre jours néanmoins l'ovule est fécondable seulement pendant deux jours (Figures 5.5) (Nepi and Pacini 1993). Les fleurs femelles et les fleurs mâles s'ouvrent entre 5 h et 6 h du matin et se ferment la même journée entre 11 h 30 et 12 h 30. La fécondation s'effectue par les insectes (exclusivement les abeilles) pendant cette période lors de l'anthèse (Nepi and Pacini 1993).

La courgette est une baie cortiquée (péricarpe coriace et imperméable) que l'on appelle plus largement chez les Cucurbitacées une péponide. Chez la courgette les fruits sont syncarpés puisque les carpelles sont soudés entre eux. La maturation de l'ovaire donne le péricarpe composé de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe. La graine se compose d'un embryon (oosphère fécondée), de tissus de réserves (cotylédons) et d'une enveloppe lignifiée (testa) (voir partie 2.1). La graine de courgette est exalbuminée (pas d'albumen), les cotylédons et l'embryon se développent au détriment du périsperme. Dans le fruit, la graine est rattachée au placenta par le funicule. Le micropyle est l'ouverture dans les téguments de l'ovule qui permet la fécondation (Salehi et al. 2019).

### 5.2.2. Paramètres écologiques de la culture de la courgette

Les espèces de *Cucurbita* sont cultivées dans toutes les régions tropicales, subtropicales et tempérées de la planète (Salehi et al. 2019). Les espèces du genre *Cucurbita* poussent dans des habitats diversifiés, allant des environnements secs à humides et elles sont trouvées à dans les prairies, les champs, sur les rives des rivières ou des lacs et dans les déserts pour certaines espèces (Salehi et al. 2019). La courgette (*C. pepo* subsp. *pepo*) est une espèce mésophile qui apprécie les températures modérées (Kates et al. 2017; Paris 1996). En général, les espèces de *Cucurbita* préfèrent les climats chauds et les températures comprises entre 18 et 27°C (Salehi et al. 2019). Ainsi, une longue saison chaude est importante pour obtenir une production de qualité. Pour la germination des graines, des températures du sol supérieures à 16 °C sont essentielles et il faut attendre environ 14 jours pour que les vraies feuilles émergent de la culture à cette température (Salehi et al. 2019). Un environnement lumineux est également nécessaire à cette plante (Figure 5.6). Les espèces de *Cucurbita* peuvent être cultivées dans une large gamme de variétés de sol, mais elles se plaisent davantage dans un sol fertile bien drainé favorable à leur développement racinaire (Salehi et al. 2019). Le pH idéal du sol est compris entre 6,0 et 6,5 mais la culture peut résister à la fois à des sols légèrement acides ou alcalins.

Tableau 5.5. Composition biochimique de trois espèces de *Cucurbita* (d'après Salehi et al. 2019)

Percentage (%)	<i>Cucurbita moschata</i>			<i>Cucurbita pepo</i>			<i>Cucurbita maxima</i>		
	Flesh	Peel	Seed	Flesh	Peel	Seed	Flesh	Peel	Seed
Carbohydrate	4.34	9.63	14.02	2.62–48.40	4.37–19.45	6.37–37.9	13.35	20.68	12.90–24.45
Protein	0.30–1.89	1.13–4.45	29.81	0.20–15.50	0.92–23.95	27.48–38.0	1.13	1.65	14.31–27.48
Lipid/Oil	0.04–0.13	0.31–0.66	28.7–45.67	0.055–0.18	0.47–6.57	21.9–54.9	0.42	0.87	30.7–52.43
Fiber	0.74–1.24	0.13–33.92	10.85	0.37–11.25	1.23–29.62	1.00–14.84	1.09	2.23	2.55–16.15
Ash	0.70–1.09	1.13–1.39	5.31	0.34–06.64	0.63–10.65	3.0–5.50	1.05	1.12	3.60–4.42
Moisture	89.61–94.23	80.04–88.47	5.18	18.03–96.77	9.76–93.59	1.80–7.40	84.04	75.67	2.75–3.08
<b>Minerals (µg/g)</b>									
<b>Macroelements</b>									
K	30,170.31–49,416.70	17,860.27–30,765.8	NQ		160	2372.4	NQ	NQ	358.67
P	2046.99–3553.36	6065.97–11,312.84	NQ		11.38	476.8	NQ	NQ	2241.45
Ca	3113.37–9854.33	4350.13–6865.78	NQ	3662.0	5571.0	97.8–420.5	NQ	NQ	294.74
Mg	1214.01–1615.07	2518.87–4927.18	NQ		190	674.1	NQ	NQ	348.71
<b>Microelements</b>									
Na	532.11–785.91	616.67–772.32	NQ		159	1703.5	NQ	NQ	296.90
Fe	29.69–33.48	53.18–84.09	NQ		91.33	247.30	37.5–149.64	NQ	NQ
Zn	18.65–26.92	18.82–49.01	NQ	320.50	42.92	89.29–141.4	NQ	NQ	39.85
Cu	7.40–10.42	2.78–8.15	NQ	16.25	12.91	24.49	NQ	NQ	ND
Se	NQ	NQ	NQ	0.0140	0.0127	12.40	NQ	NQ	NQ
Co	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	21.7	NQ	NQ	ND
Mn	0.51–6.90	2.35–14.8	NQ		0.5	0.6	NQ	NQ	17.93
Ni	NQ	NQ	NQ		0.5	NQ	NQ	NQ	NQ
Pb	NQ	NQ	NQ		0.29	NQ	NQ	NQ	NQ
Nitrate	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	22.7	NQ	NQ	NQ

\* Results expressed in dry basis; ND: Not detected; NQ: Not quantified.

Tableau 5.6. Composition en acides gras des graines de trois espèces de *Cucurbita* (d'après Salehi et al. 2019)

Fatty acid (%)	<i>Cucurbita moschata</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Cucurbita maxima</i>
Myristic acid (C14:0)	ND	0.1–0.23	0.16
Palmitic acid (C16:0)	12.78–20.74	9.5–14.5	10.84–15.97
Palmitoleic (C16:1n7)	NQ	0.58	NQ
Heptadecanoic acid (C17:0)	ND	ND	0.18
Stearic acid (C18:0)	7.33–7.47	03.1–8.67	4.68–11.2
Vaccenic acid (C18:1n7)	NQ	01.8	NQ
Oleic acid (C18:1n9)	22.66–31.34	21.0–46.9	14.83–44.11
Linoleic acid (C18:2)	35.72–48.52	0.17–60.8	34.77–56.60
Linolenic (C18:3)	ND	ND–0.68	0.24
Arachidic acid (C20:0)	ND	0.39	0.36
Gadoleic acid (C20:1n–9)	ND	00.1–1.14	0.07
Arachidonic acid (C20:4)	NQ	00.5	0.41
Behenic acid (C22:0)	ND	0.37	0.09
Saturated	20.11	18.69–19.35	17.47–21.07
Mono-unsaturated	31.34	32.40	14.90–44.12
Poly-unsaturated	35.72	36.40	34.78–56.84
Total unsaturated	67.06	7.6–80.65	71.74–78.90

\* Results expressed in dry base of seeds; ND: Not detected; NQ: Not quantified.

### 5.2.3. Caractéristiques biochimiques de la courgette

Les courgettes sont riches en composés nutritionnels notamment en carbohydrates, protéines, minéraux, acides gras et acides aminés (Tableau 5.5 et Tableau 5.6) (Salehi et al. 2019; Kim et al. 2012). Comparées aux graines de *C. moschata*, les graines de *C. pepo* et *C. maxima* contiennent un niveau élevé de carbohydrates (Salehi et al. 2019). Les graines de courgette contiennent une quantité élevée de protéines et d'acides gras, allant respectivement de 27,48% à 38,0% et de 21,9% à 54,9%. De plus, les graines de courgette contiennent 17 acides aminés différents parmi les 20 acides aminés constituant les protéines nécessaires à la santé humaine (Salehi et al. 2019; Kim et al. 2012).

Certains composés produits par *C. pepo* ont des propriétés antibactériennes et antifongiques (Chonoko and Rufai 2011; Salehi et al. 2019). Par exemple, l'éthanol extrait de la peau du fruit de *C. pepo* est actif contre *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhi* (Chonoko and Rufai 2011). L'huile extraite des graines de *C. pepo* possède des propriétés antimicrobiennes vis-à-vis de *S. aureus* (Sohail et Masud 2014). Sur une espèce proche de la courgette, les graines de *C. moschata* montrent une activité antimicrobienne contre les bactéries *S. aureus* et *Bacillus subtilis* et la peau du fruit vis-à-vis des champignons *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus* (Abd El-Aziz and Abd El-Kalek 2011).

## 5.3. Production de semences de courgette et données économiques

### 5.3.1. La production de semences hybrides de courgette

Les semences de courgettes hybrides sont multipliées à partir du croisement de deux lignées parentales pures. Le semis se fait à partir du 15 mai en France, dès que le sol est suffisamment réchauffé (température du sol d'environ 18°C) et qu'il n'y a plus de risque de gel (FNAMS, 2003). Pour la production d'un hybride, la lignée mâle est semée quelques jours avant la lignée femelle afin de synchroniser leur floraison puisque les fleurs femelles apparaissent avant les fleurs mâles. Les lignées mâles et les lignées femelles sont semées suivant un schéma d'implantation précis, généralement deux lignes femelles et une ligne mâle ou quatre lignes femelles et deux lignes mâle. La densité du semis standard est de cinq plants au mètre linéaire. Il est généralement conseillé d'écartier les lignes femelles de 50 à 80 cm et de 1 m 20 entre les lignes de plantes mâles et les lignes de plantes femelles (FNAMS, 2003).

La période de pollinisation a lieu une soixantaine de jours après le semis (FNAMS, 2003). Les premières fleurs femelles apparaissent généralement une quarantaine de jours après semis au stade 5<sup>ème</sup> ou 6<sup>ème</sup> feuille, néanmoins celles-ci avortent et ne sont pas exploitées pour la multiplication des semences (FNAMS, 2003). Pour éviter l'autopollinisation des plantes de la lignée femelle et obtenir des hybrides uniquement avec le pollen des lignées mâles, une étape de castration est essentielle pour la production de semences hybrides (FNAMS, 2003). Cette étape consiste à éliminer toutes les fleurs mâles justes avant la floraison des fleurs femelles de la lignée femelle. La castration est réalisée manuellement en agriculture biologique ou par traitement chimique en agriculture conventionnelle (FNAMS, 2003).



Production/Yield quantities of Pumpkins, squash and gourds in World + (Total)

1994 - 2019

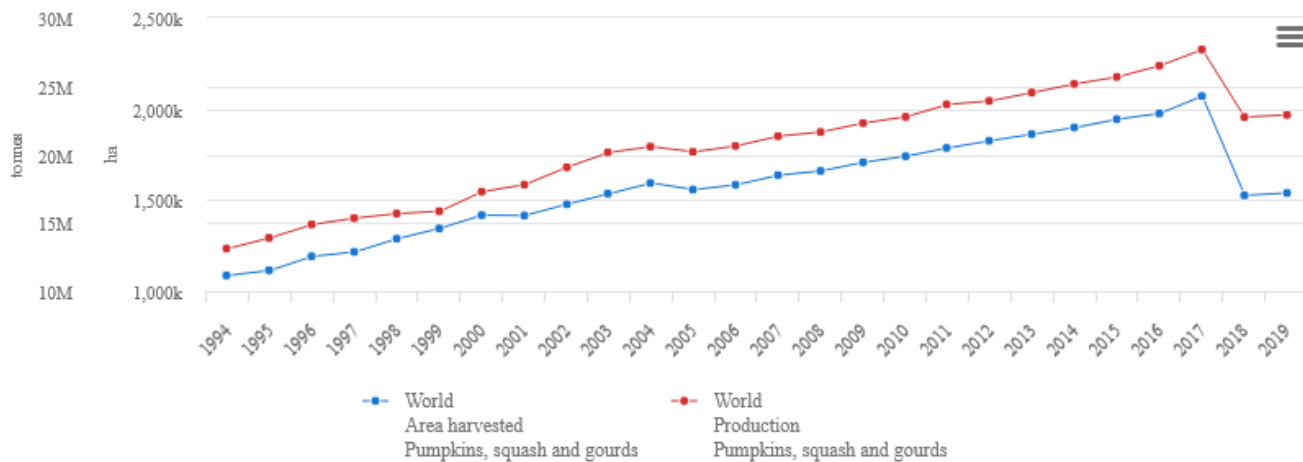


Figure 5.7. Evolution de la production mondiale de courge entre 1994 et 2019.

(FAO, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> consulté le 08/02/2020)

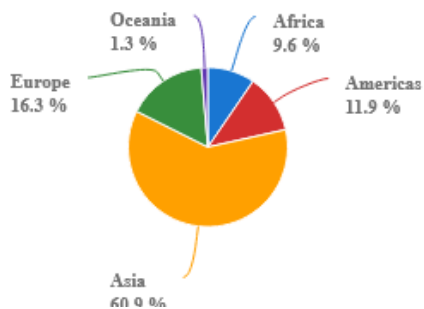
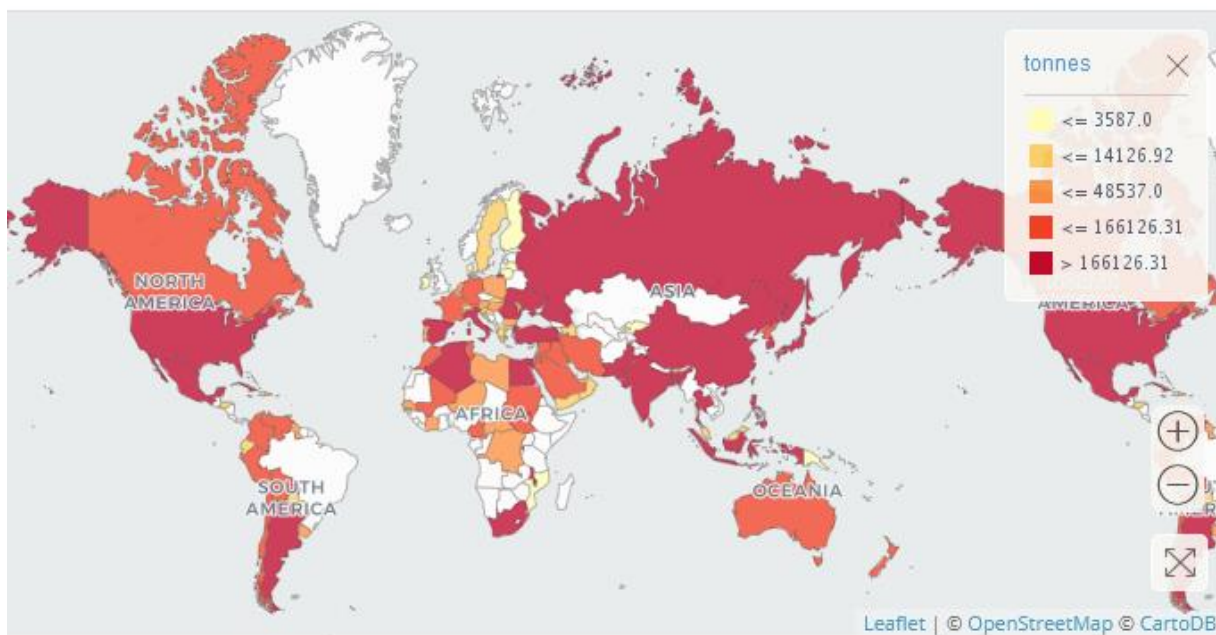


Figure 5.8. Répartition de la production de courge dans le monde. (FAO,

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> consulté le 08/02/2020)



La pollinisation est strictement entomophile et nécessite l'implantation de quatre ruches par hectare en plein champ. Sous abri, la pollinisation est généralement effectuée manuellement. Chaque plante de la lignée femelle gardera un à deux fruits et les autres fleurs femelles produites au cours du cycle cultural avorteront naturellement (FNAMS, 2003). Un fruit est mûr environ 70 jours après la pollinisation. A maturité, la graine se détache toute seule des tissus du fruit (FNAMS, 2003). La récolte se fait mécaniquement ou manuellement. Dans le cas d'une extraction mécanique, une batteuse spécifique récolte et bat les fruits directement dans les parcelles. Dans le cas d'une récolte manuelle, les graines sont généralement extraites dans une station avec une machine sur un poste fixe. Pour les deux méthodes, les graines sont récoltées avec la pulpe du fruit puis il y a une étape de fermentation dans l'eau comprise entre 24 h et 36 h pour détruire toutes les fibres autour des graines. Les graines sont ensuite lavées et séchées sous un flux d'air chaud pendant 10 h à 15 h pour stabiliser l'humidité d'un lot de semences à 13 % (FNAMS, 2003). La maîtrise de cette étape est indispensable pour éviter le développement de champignons saprophytes pendant la conservation des graines.

### 5.3.2. Données économiques et utilisations de *Cucurbita pepo* dans le monde

#### a) Données économiques

Il est estimé que 602 kilos de courges (*C. pepo*, *C. maxima* et *C. moschata*) sont consommées chaque seconde dans le monde (<https://www.planetoscope.com/agriculture-alimentation/fruits-legumes>, consulté le 06/02/2020). En 2019, environ 23 millions de tonnes de courges ont été produites dans le monde d'après les données de la FAO (Figure 5.7). La Chine, l'Inde et les Etats-Unis sont les plus gros producteurs de courges dans le monde (Figure 5.8). D'après la FAO, en 2019, la Chine a produit 8,4 millions de tonnes de courges, les USA 610 000 tonnes et la France 248 110 tonnes. Parmi les courges, en France, 111 000 tonnes de courgettes ont été produites en 2019 (données France Agrimer 2020).

#### a) Utilisations

Les courgettes et les autres *C. pepo* sont cultivées dans le monde pour leurs fruits comestibles mais aussi pour les fruits ornementaux ainsi que pour leurs avantages thérapeutiques (Salehi et al. 2019). Les fruits de *C. pepo* sont cuisinés partout dans le monde sous différentes formes : tartes, pain, biscuits, cheesecake, desserts, beignets, crème glacée, lasagne, crêpes, pudding, beurre de citrouille, salades, soupes et farces (Salehi et al. 2019). Les graines riches en huile et les fleurs de courges sont également consommées et très appréciées dans certains pays comme le Mexique (Salehi et al. 2019). Les *C. pepo* ornementales représentent aussi un large marché économique dans certains pays. Par exemple, aux USA, les dépenses pour l'achat de citrouilles ornementales d'Halloween a été estimé à environ 700 millions de dollars en 2020 (<https://www.statista.com/statistics/922599/us-halloween-season-jack-o-lantern-expenditure/> consulté le 07/02/2021). Enfin, *C. pepo* possède des propriétés thérapeutiques importantes et intéressantes pour la santé humaine. Par exemple, le tocopherol contenu dans les graines de *C. pepo* a des propriétés anti glycémiques et anti-oxydantes intéressantes pour développer des traitements préventifs contre le diabète de type sucré (Bharti et al. 2013). Les graines de *C. pepo* possèdent également des propriétés antiparasitaires, antifongiques et antibactériennes (Alhawiti et al. 2019).

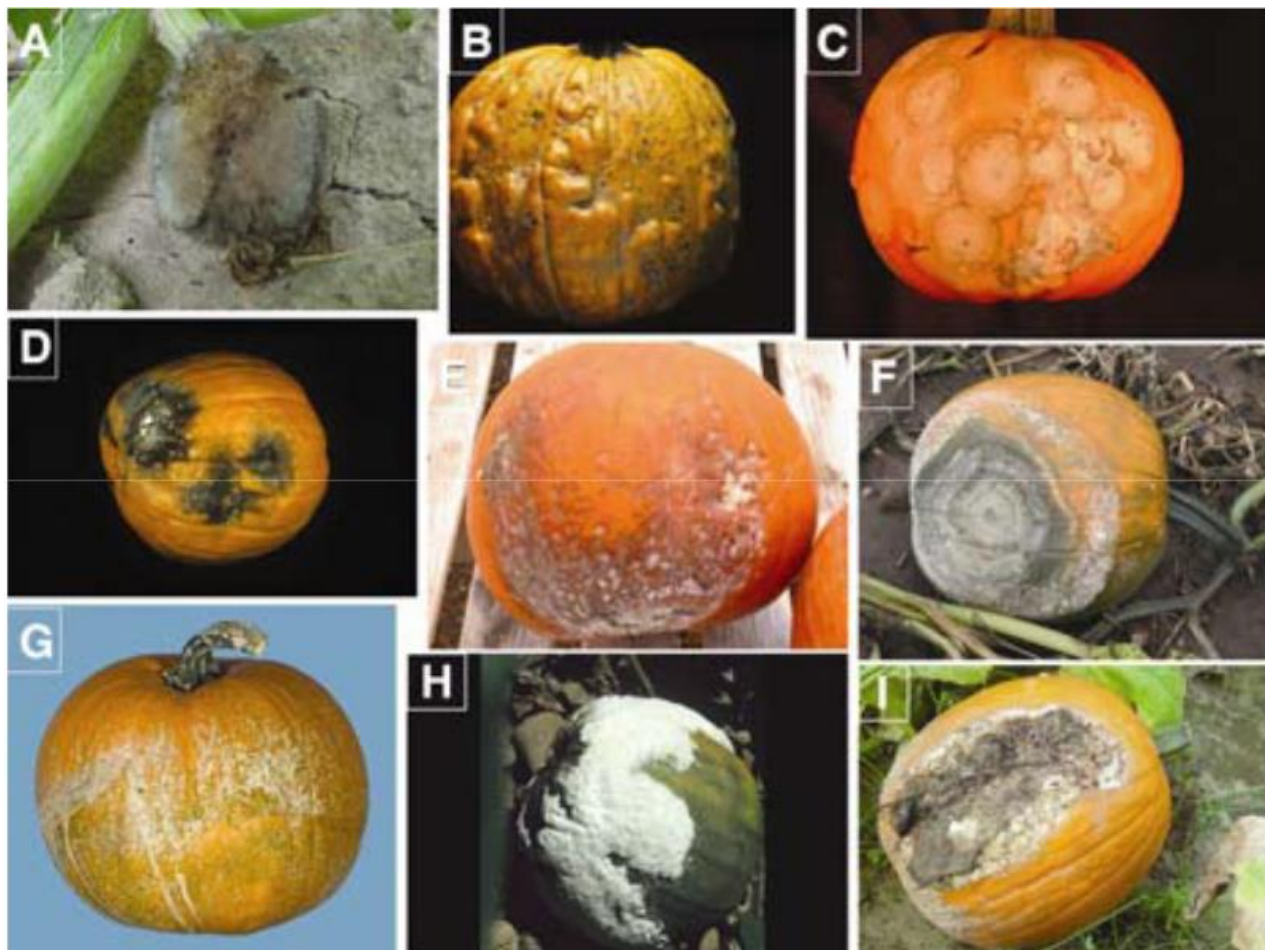


Figure 5.9. Symtômes sur citrouille (*Cucurbita pepo*) causés par divers champignons et oomycètes pathogènes. (A) *Choanephora cucurbitarum* (B) *Cladosporium cucumerinum* (C) *Colletotrichum orbiculare* (D) *Didymella bryoniae* (E) *Fusarium* sp. (F) *Phytophthora capsici* (oomycète) (G) *Plectosporium tabacinum* (H) *Pythium* spp. (oomycète) (I) *Sclerotium rolfsii*. (d'après Babadoost et Zitter, 2009)

## 5.4. Les principales maladies infectieuses de la courgette

### 5.4.1. Les champignons

Les champignons phytopathogènes causent d'importantes maladies sur *C. pepo*. Les maladies fongiques les plus importantes sont la fusariose (*Fusarium* spp.), la pourriture noire (*Didymella bryoniae*) et la pourriture sclérotinienne (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Figure 5.9) (Babadoost and Zitter 2009).

Plusieurs espèces de *Fusarium* provoquent des pourritures sur les fruits de courgette et sur les racines dont *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. acuminatum*, *F. graminearum* et *F. solani* (Elmer 1996; Jamiolkowska et al. 2011). *F. solani* f. sp. *cucurbitae* est un champignon phytopathogène majeur qui cause des pourritures des fruits et du collet de plusieurs espèces de *Cucurbita* dans de nombreux pays du monde (Pérez-Hernández et al. 2017). Le champignon *Didymella bryoniae* cause des pourritures noires sur fruits et des chancres gommeux sur les tiges de courgette et de d'autres Cucurbitacées (Santos et al. 2009). Enfin, la sclérotiniose de la courgette causée par *Sclerotinia sclerotiorum* impacte les plantules, les plantes et les fruits en conservation. Ce champignon a une gamme d'hôtes très étendue et infecte plus de 408 espèces végétales (Ficker 2019). D'autres champignons peuvent s'attaquer à *C. pepo* dont *Choanephora cucurbitarum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Plectosporium tabacinum*, *Podosphaera xanthii*, *Sclerotium rolfsii* et *Septoria cucurbitacearum* et cette liste n'est pas exhaustive (Babadoost and Zitter 2009). En France, plus de 15 champignons différents sont rapportés comme pathogènes de la courgette et des courges (Ephytia, consulté le 09/02/2021).

Les champignons pathogènes de la courgette dont *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, *Didymella bryoniae* et *Sclerotinia sclerotiorum* sont transmissibles par les semences (Hausbeck and Lamour 2004; Mehl and Epstein 2007; Sudisha et al. 2006; Lee et al. 1984; Abushaala et al. 2016). Des tests de détections moléculaires des champignons ont été mis au point pour contrôler les lots de semences avant commercialisation (Moumni et al. 2019; Ling et al. 2010; Kumar et al. 2020; Mancini et al. 2016). Les méthodes de lutte contre les maladies fongiques font principalement appel à la prophylaxie (gestion de l'humidité, des débris végétaux, cycles de rotation, solarisation, utilisation semences non-contaminées) et à la lutte chimique bien que celle-ci soit réglementée dans certains pays et qu'elle ne s'avère par toujours efficace en cas de résistantes fongiques. De plus, il existe des variétés résistantes à certains champignons phytopathogènes (Cohen et al. 2003).





Figure 5.10. Symptômes sur feuilles de courgette (*Cucurbita pepo*) causés par différents virus. En haut de gauche à droite : virus de la mosaïque jaune de la courgette (ZYMV), virus de la mosaïque de la pastèque (WMV), virus de la jaunisse des Cucurbitacées (CABYV). En bas de gauche à droite : virus de la mosaïque du concombre (CMV), virus de la tache angulaire de la papaye (PRSV) et virus de New Delhi responsable de la courbure des feuilles de tomate (ToLCNDV). Les photographies (H. Lecoq - INRA) ont été téléchargées sur le site ephytia (<http://ephytia.inra.fr/>, consulté le 09/02/2021)

### 5.4.2. Les virus

Les maladies virales de la courgette sont causées par différents genres de virus dont les *Potyvirus*, les *Begomovirus*, les *Polerovirus*, les *Cucumovirus* et les *Crinivirus*. Les virus les plus dommageables sur la courgette sont le virus de la mosaïque jaune de la courgette (ZYMV), le virus de la mosaïque de la pastèque (WMV), le virus de la jaunisse des Cucurbitacées (CABYV), le virus de la mosaïque du concombre (CMV), le virus de la tache angulaire de la papaye (PRSV) et le virus de la pseudo-jaunisse de la betterave (BPYV). Ces virus induisent différents types de symptômes sur les courgettes tels que des jaunisses, des taches chlorotiques, des décolorations, des blocages de croissance, des déformations et des marbrures (Figure 5.10). Très récemment, le virus de New Delhi responsable de la courbure des feuilles de tomate (ToLCNDV) est apparu en Europe et cause des viroses sur la courgette et d'autres Cucurbitacées (Juárez et al. 2013; Kil et al. 2020; Orfanidou et al. 2019; Trisciuzzi et al. 2018). Il a été découvert pour la première fois sur courgette en France en septembre 2020 (<https://www.anses.fr/> consulté le 09/02/2021). Le virus ToLCNDV réglementé de quarantaine au niveau Européen et figure dans la liste d'alerte de l'EPPO (<https://www.eppo.int/>, consulté le 09/02/2021).

Les viroses des courgettes peuvent être transmises par des insectes vecteurs. Par exemple, le virus ZYMV est transmis par différentes espèces de pucerons (Katis et al. 2006). Le virus CABYV est également transmis par des pucerons dont *Aphis gossypii* (Carmo-Sousa et al. 2016). Le virus BPYV est quant à lui transmis par l'aleurode des serres *Trialeurodes vaporariorum* (Wintermantel 2004). Les moyens de lutte contre les virus visent notamment à réduire les populations des insectes vecteurs par lutte chimique ou par des méthodes prophylactiques. Le déploiement de variétés résistantes aux virus est également possible. Par exemple, des variétés OGM résistantes aux virus WMV et ZYMV ont été développées dans certains pays (Fuchs and Gonsalves 1995). Par ailleurs, des gènes de résistance au ZYMV ont été découverts dans des accessions de *C. moschata*, néanmoins leur introduction par croisement et leur maintien dans le germplasm de *C. pepo* représentent encore un défi (Capuozzo et al. 2017).

La semence asymptomatique est également un vecteur de certains de ces virus comme le ZYMV et ToLCNDV (Tóbiás and Palkovics 2003; Simmons et al. 2011; Kil et al. 2020). Ainsi, la détection des virus dans les lots de semences de courgette permet d'écarter les lots contaminés de la vente (Kaur et al. 2020). Une qPCR multiplex a été mise au point pour détecter simultanément plusieurs virus (dont ZYMV, PRSV, WMV) transmis par les semences de Cucurbitacées (Kwon et al. 2014).

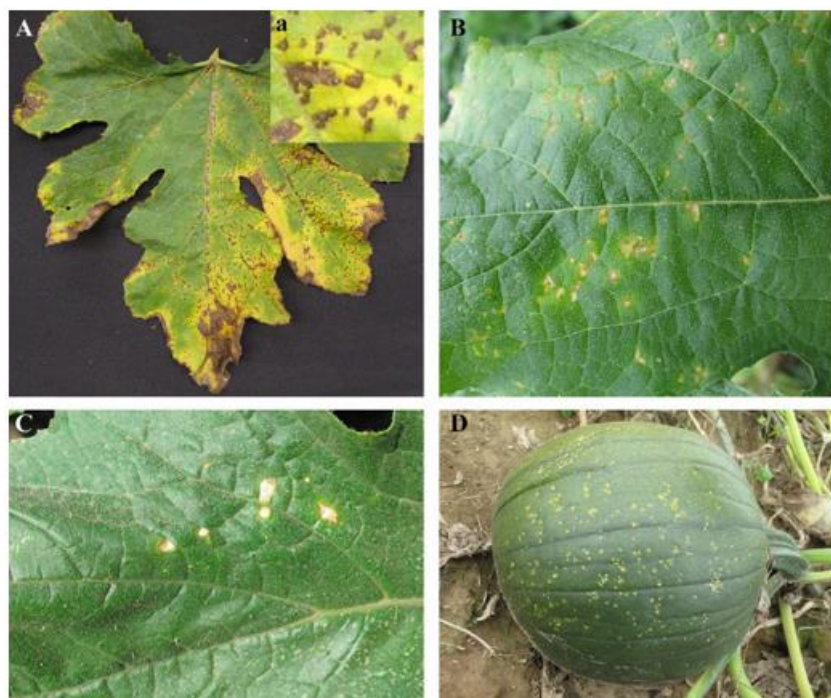


Figure 5.11. Symptômes causés par *Xanthomonas cucurbitae* sur *Cucurbita pepo* sur (A, B, C) feuilles (D) fruit. (d'après Ravanlou et Babadoost 2015)

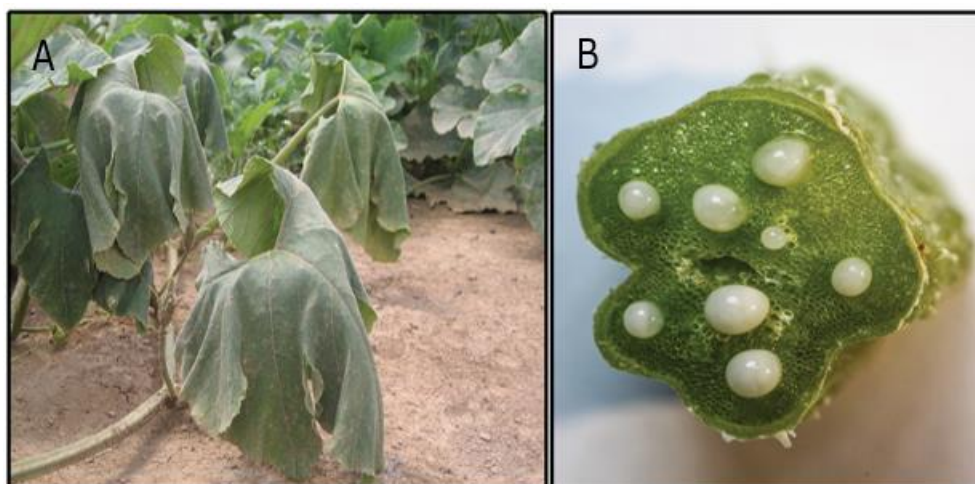


Figure 5.12. Symptômes de flétrissement des feuilles (A) et de « oozing » des vaisseaux du xylème (B) causés par *Erwinia tracheiphila* sur *Cucurbita pepo*. (d'après Shapiro et al. 2018)



Figure 5.13. Pourriture molle causée par *Pectobacterium brasiliensis* sur courgette (A) et citrouille (B) (d'après Oulghazi et al. 2021)



### 5.4.3. Les bactéries

Les courgettes et *C. pepo* sont sensibles à plusieurs maladies bactériennes. La maladie des taches bactériennes des *Cucurbita* spp. causées par *X. cucurbitae* a été signalée partout dans le monde dont aux Etats-Unis (Babadoost and Ravanlou 2012; Gitaitis et al. 1991), en Europe (Altin et al. 2020), en Asie (Lamichhane et al. 2010) ou encore à la Réunion (Pruvost et al. 2008). Par ailleurs, cette bactériose est également décrite sur d'autres cucurbitacées comme la pastèque ou le concombre (Pruvost et al. 2009; Dutta et al. 2012b; Jarial et al. 2015a). Les pertes économiques causées par les épidémies de *X. cucurbitae* peuvent être importantes. Par exemple dans le Kent au Canada, des épidémies récentes ont engendré des pertes sur 60 % des fruits de *C. pepo* cultivés (Trueman et al. 2014). Dans l'Illinois, des pertes de rendements allant jusqu'à 90 % ont été rapportées entre 2010 et 2011 sur cultures de *C. pepo* et *C. maxima* (Babadoost and Ravanlou 2012). Cette bactérie engendre des symptômes nécrotiques sur les feuilles puis se propage sur les tiges, les vrilles, des fleurs et les fruits dans des conditions chaudes et humides (Figure 5.11). Sur les fruits de *C. pepo*, des taches nécrotiques peuvent être observées à la surface et dans les cas les plus sévères des pourritures conduisent à la perte des fruits avant ou après récolte (Jarial et al. 2015a). La bactérie *X. cucurbitae* est transmissible par les semences et peut survivre dans le sol et les résidus de culture (Jarial et al. 2015a). Pour décontaminer les lots de semences infestés par *X. cucurbitae*, la thérapie semble être une méthode efficace (55°C pendant 15 min) (Babadoost and Zhang 2020) ainsi que des traitements chimiques à base de d'oxychlorure de cuivre et de streptomycine (Jarial et al. 2015b).

Le flétrissement de la courgette et des Cucurbitacées est causé par *E. tracheiphila*. Cette maladie cause des dommages importants sous climat tempéré dans l'Est de l'Amérique du Nord (Shapiro et al. 2018). Cette bactérie est vasculaire et bloque le flux de la sève dans le xylème ce qui engendre un flétrissement généralisé de la plante et sa mort en deux ou trois semaines (Figure 5.12) (Shapiro et al. 2018). La maladie causée par cette bactérie peut entraîner des pertes jusqu'à 80 % dans les parcelles de Cucurbitacées (Rojas et al. 2015). Cette bactérie est transmise par des insectes vecteurs de la famille des chrysomèles à partir des fleurs ou des blessures (Shapiro et al. 2015). L'un des moyens pour limiter l'apparition et la propagation de cette maladie est de lutter contre les insectes vecteurs par traitements insecticides, par le déploiement de pièges et de barrières physiques ou par bio-contrôle *via* les insectes parasites des chrysomèles (Rojas et al. 2015).

La bactérie *Serratia marcescens* est également transmise par un insecte (*Anasa tristis*) et colonise le phloème des Cucurbitacées induisant la maladie de la nervation jaune (Bruton et al. 2003). Cette maladie entraîne des pertes économiques importantes aux USA sur *C. pepo* mais aussi sur melon et pastèque (Bruton et al. 2003; Besler and Little 2015). Cette bactérie a également été rapporté récemment sur courgettes en Iran (Sedighian et al. 2018). Les plantes malades présentent un rabougrissement général, un jaunissement et un déclin progressif commençant 10 à 14 jours avant la récolte (Bruton et al. 2003).

*Pectobacterium brasiliensis* cause des épidémies de pourritures molles sur courgette (Figure 5.13) (Oulghazi et al. 2021). En 2015, l'incidence de cette maladie a été estimée à 80% dans certaines parcelles de cultures de courgettes Brésilienne (Moraes et al. 2016). En 2014, *P. brasiliensis* a également été rapportée en Europe sur culture de *C. pepo* avec une incidence de 50 % dans des parcelles autrichiennes (Gottsberger and Huss 2016).



Figure 5.14. Nécroses des feuilles (A), lésions en « œil de bœuf » (B) et lésions verruqueuses (C) causées par *P. syringae* pv. *aptata* sur *Cucurbita pepo*. (d'après Tymon et Inglis 2017)



Figure 5.15. Nécroses des feuilles causées par *P. syringae* sur jeune plante de *Cucurbita pepo*. (d'après Newberry et al. 2016)

Récemment cette bactérie a également été observée en Serbie sur cultures de pastèques et de *C. pepo* (Zlatković et al. 2019).

La bactérie *A. citrulli* est pathogène de la pastèque mais également de *C. pepo*. Elle induit des nécroses sur les feuilles et les fruits ainsi que des pourritures sur les fruits (Langston et al. 1999). Cette maladie sur *C. pepo* a été rapportée au Etats-Unis mais pas en Europe bien que *A. citrulli* ait été détectée sur pastèque en Hongrie et en Grèce (Palkovics et al. 2008; Holeva et al. 2010). Les souches d'*A. citrulli* sont classées en deux groupes distincts avec des spécificités d'hôtes différentes en lien avec leurs SST3 (Yan et al. 2017; Eckshtain-Levi et al. 2014; Zhao et al. 2020). L'un des groupes (groupe I) contient des souches qui sont modérément pathogènes sur différentes Cucurbitacées, dont la pastèque, le melon et la courgette alors que le second groupe (groupe II) contient des souches très agressives de la pastèque uniquement (Walcott et al. 2004; Yan et al. 2017). Comme pour la pastèque, *A. citrulli* est transmissible par les semences de *C. pepo* (Hopkins and Thompson 2002). La décontamination des graines de *C. pepo* infestées par *A. citrulli* est difficile. Par exemple, en thermothérapie, il n'est pas possible de décontaminer les graines infestées sans impacter la qualité germinative des graines (Kubota et al. 2012). De plus, une désinfection chimique suivie d'un traitement à l'air chaud permet la désinfection complète des graines de *Cucurbita* mais induit une inhibition de la germination (Kubota et al. 2013).

Plusieurs souches du complexe d'espèces *P. syringae* sont pathogènes de *C. pepo*. Le pathovar *P. amygdali* pv. *lachrymans* appartient au phylogroupe 3 et cause des taches angulaires sur concombre mais est également pathogène sur les courges (Bradbury 1986 ; Shila et al. 2013 ; Scortichini 1992). Dans le phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae*, plusieurs souches pathogènes de *C. pepo* ont été décrites. Le pathovar *P. syringae* pv. *apata*, est responsables d'épidémies sur melon mais est également pathogène de *C. moschata* et de *C. pepo* (Morris et al. 2000 ; Sedighian et al. 2014 ; Inglis et Tymon 2019). Sur *C. pepo*, des souches de *P. syringae* pv. *apata* causent des épidémies dans l'Etat de Washington et induisent des nécroses et des chloroses sur les feuilles ainsi que des lésions en forme « d'œil de bœuf » à la surface des fruits cultivés (Figure 5.14) (Tymon and Inglis 2017 ; Inglis and Tymon 2019). Les fruits infectés se conservent beaucoup moins bien lors du stockage et pourrissent (Inglis et Tymon 2019). En Serbie, des souches du pathovar *P. syringae* pv. *syringae* causent des taches foliaires sur *C. pepo* avec une incidence de 5 à 20 % (Balaž et al. 2014). Diverses souches non affiliées à des pathovars sont pathogènes de courges, melons et pastèques et induisent des symptômes foliaires, des retards de développement et de fructification (Figure 5.15) (Newberry et al. 2016a, 2017a, 2019). Ces souches ont causé des épidémies aux USA, notamment en Floride et en Géorgie où il a été estimé que plus 3 000 hectares de Cucurbitacées avaient été touchés par la maladie entre 2013 et 2014 (Newberry et al. 2017a). Ces bactéries appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* sont transmissibles par les semences (Shila et al. 2013; Newberry et al. 2017a; Iacobellis et al. 2013; Inglis and Tymon 2019). Enfin, *Pseudomonas cichorii* cause une maladie foliaire sur *C. pepo* induisant des nécroses et des taches grasses (Newberry et al. 2016b). Cette maladie a été observée une fois dans une parcelle dans le Tennessee avec une incidence de 25 à 50 % (Newberry et al. 2016b).



## Objectifs et axes de recherche

La nervation blanche des plantules de courgette est causée par des bactéries transmises par les semences et appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* (Manceau et al. 2011). Des contrôles sanitaires basés sur des outils moléculaires effectués sur les semences de courgette permettent de détecter les lots contaminés par les bactéries afin de les écarter de la commercialisation (Manceau et al. 2011). Pour les lots détectés contaminés, des processus de désinfection permettent de les assainir. Bien que ces mesures permettent de lutter contre les bactéries responsables de la nervation blanche de la courgette, plusieurs problèmes se posent. D'abord, de nombreux lots de semences produits à une échelle mondiale sont contaminés et cette tendance tend à croître au cours du temps. Ce constat entraîne donc des volumes importants à traiter pour la décontamination, ce qui est chronophage et coûteux. De plus, certains lots de semences sont récalcitrants après plusieurs traitements de décontamination successifs, par conséquent, ils ne peuvent pas être vendus et représentent une perte financière directe.

Au début de ce travail de thèse, les connaissances sur les bactéries responsables de la nervation blanche de la courgette étaient encore limitées. La caractérisation des agents phytopathogènes responsables de cette maladie était insuffisante. Lors de mon travail de Master 2, des résultats préliminaires avaient montré que les souches responsables de cette maladie appartenaient toutes au phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae* mais qu'elles se répartissaient majoritairement en deux groupes génétiques distincts. La confrontation de ces résultats avec les bases de données internationales montrait que l'un de ces groupes contenait également des souches isolées à partir de symptômes sur diverses cucurbitacées adultes. Plusieurs questions ont été formulées suite à ce travail : Existait-il des différences dans la capacité des souches de ces deux groupes à causer des symptômes sur différentes cucurbitacées ? Quelle était leur occurrence dans les semences de courgette et leurs particularités épidémiologiques ? Avaient-elles les mêmes modes de contamination des graines ?

Afin de répondre à ces différentes questions visant à mieux connaître les bactéries responsables de la nervation blanche transmises par les semences de courgette ainsi que le cycle épidémiologique de la maladie, les objectifs de ma thèse étaient de caractériser les agents responsables de la nervation blanche de la courgette et de comprendre comment ils contaminent les graines.

Pour répondre à ces objectifs, trois axes de recherche ont été définis : (i) Caractériser génotypiquement et phénotypiquement les souches responsables de la nervation blanche de la courgette. (ii) Développer un outil moléculaire de détection et d'identification et un schéma de typage qui permette un suivi épidémiologique des différentes bactéries responsables de la nervation blanche de la courgette. (iii) Identifier les contaminations dans les lots de semences, rechercher des sources d'inoculum potentielles dans les parcelles de production des semences et évaluer les voies de transmission des bactéries aux graines en conditions expérimentales.

Chacun de ces axes de recherche est développé sous la forme d'un chapitre dans la section des résultats.



## **CHAPITRE 2.**

# **Caractérisation des souches responsables de la nervation blanche de la courgette**





## **Caractérisation des souches responsables de la nervation blanche de la courgette.**

Le chapitre 2 présente mes travaux sur la caractérisation phylogénétique, génomique et phénotypique des souches responsables de la nervation blanche de la courgette. Pour cela, j'ai étudié une collection de 58 souches isolées de lots semences de courgettes. Lors de mon stage de Master 2, des résultats préliminaires avaient montré que les souches de cette collection appartenaient toutes au phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae* sur la base d'une analyse de séquences multi-loci (MLSA) conduite sur quatre gènes de ménage. Les souches de la collection se répartissaient majoritairement en deux groupes dont un qui contenait également d'autres souches isolées de Cucurbitacées (melon, pastèque et courge) et responsables d'autres maladies aux USA. Ce premier travail a alors été complété par i) l'analyse des séquences génomiques de souches représentant ces deux groupes afin d'identifier des marqueurs phylogénétiques et/ou en lien avec les facteurs de virulence pour différencier ces deux groupes ; ii) la caractérisation de leur pouvoir pathogène sur courgette et sur diverses Cucurbitacées. Ces travaux étaient indispensables pour caractériser précisément les agents causaux de la nervation blanche et pouvoir engager ensuite des travaux d'épidémiologie.

Le chapitre 2 présente les résultats de cette étude sous la forme d'un article publié en avril 2020 dans le journal « *Phytopathology* ».

Implication personnelle : J'ai participé à l'élaboration du protocole expérimental, j'ai conduit les expérimentations et analysé les résultats. Sauf pour l'analyse des génomes qui a été réalisée principalement par Armelle D. collaboration avec Martial B. J'ai rédigé l'article en collaboration avec les co-auteurs.



## Zucchini Vein Clearing Disease Is Caused by Several Lineages Within *Pseudomonas syringae* Species Complex

Caroline Lacault, Martial Briand, Marie-Agnès Jacques,† and Armelle Darrasse†

Agrocampus-Ouest, INRAE, Université d'Angers, IRHS, 49071, Beaucouzé, France

Accepted for publication 27 December 2019.

### ABSTRACT

Zucchini (*Cucurbita pepo*) is worldwide affected by *Pseudomonas syringae*, inducing vein clearing, stunting, and necroses during plantlet development. A collection of 58 *P. syringae* strains isolated from diseased zucchini plantlets was characterized by multilocus sequence analysis (MLSA). A subset of 23 strains responsible for vein clearing of zucchini (VCZ) was evaluated for pathogenicity on zucchini, and their genomes were sequenced. The host range of six VCZ strains was evaluated on 11 cucurbit species. Most VCZ strains belong to clades 2a and 2b-a within phylogroup 2 of *P. syringae* species complex and are closely related to other strains previously isolated from cucurbits. Genome analyses revealed diversity among VCZ strains within each clade. One main cluster, once referred to by the invalid pathovar name (*peponis*), gathers VCZ strains presenting a narrow host range including zucchini and squashes. Other VCZ

strains present a large host range including zucchini, squashes, cucumber, melons, and in some cases watermelon. The VCZ strain pathogenic features are strongly associated with type III effector repertoires. The presence of *avrRpt2* and absence of *hopZ5* are associated with a narrow host range, whereas the presence of *hopZ5* and absence of *avrRpt2* are most generally associated with a large host range. To better detect the different clusters identified with whole genome sequence and pathogenicity analyses, we used a specific-*k*-mers approach to refine the MLSA scheme. Using this novel MLSA scheme to type *P. syringae* isolates from diseased cucurbits would give insight into distribution of worldwide strains and origin of epidemics.

**Keywords:** bacterial seedborne disease, *Cucurbita pepo*, cucurbits, ecology and epidemiology, etiology, *Pseudomonas syringae*

In 2004 diseased plantlets of zucchini (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) were observed in plant growers' facilities in Europe. Diseased plants show cotyledon and leaf necroses, vein clearing, and stunting. This disease is observed on plantlets and affects plant development at early stages, but to date no symptoms have been observed on fruits. One causal agent has been identified as belonging to the *Pseudomonas syringae* species complex and was provisionally named *P. syringae* pv. *peponis* (Manceau et al. 2011). This pathogenic bacterium was shown to be seed-transmitted (Manceau et al. 2011). Climatic conditions drastically influence symptom expression at early stage development; for example, low temperatures are associated with greater disease severity. Because most generally efficient chemical options are not available for bacterial threats, more knowledge about *P. syringae* responsible for vein clearing on zucchini (VCZ) is essential to implement appropriate control strategies.

The *P. syringae* species complex comprises 19 phylogenomic species based on average nucleotide identity (ANI) (Gomila et al. 2017), some of which are formally described (*P. amygdali*, *P. asturiensis*, *P. avellanae*, *P. cannabina*, *P. caricapapayae*, *P. caspiana*, *P. cerasi*, *P. cichorii*, *P. congelans*, *P. syringae*, and *P. viridiflava*). Moreover, *P. coronafaciens* has been proposed recently by Dutta et al. (2018). However, some of the crop pathogenic species are not easy to refer to because recombination between lineages is sufficiently high to blur the taxonomic boundaries (Baltrus et al. 2017; Dillon et al. 2019a). Many studies

devoted to classifying pathogenic strains of *P. syringae sensu lato* refer to phylogroups. Thirteen phylogroups (i.e., some phylogroups cluster several phylogenomic species) generally subdivided into clades were defined in the *P. syringae* species complex based on multilocus sequence analysis (MLSA) (Berge et al. 2014), and >60 pathovars were described based on pathogenicity (Young 2010). Indeed, a pathovar is defined as a group of strains showing the same or similar characteristics at an infra-subspecific level but presenting a distinctive pathogenicity, which means a unique host range or unique symptomatology (Dye et al. 1980).

Various pathogenic *P. syringae sensu lato* have been reported on cucurbits. *P. amygdali* pv. *lachrymans* causes angular leaf spots on cucumber (Bradbury 1986) and other cucurbits (Hopkins and Schenck 1972; Shila et al. 2013). Other strains of *P. syringae* that were named pathovar *lachrymans* cause different symptoms on cucumber and belong to the phylogenomic species *P. tomatato* within the phylogroup 1 (Gomila et al. 2017; Słomnicka et al. 2018). Diverse strains isolated from melons and squashes within phylogroup 2 belong to *P. syringae* pv. *aptata*, which was initially described as pathogenic on sugar beet (Morris et al. 2000; Sedighian et al. 2014). Other strains of *P. syringae sensu lato* genetically different from the two previously mentioned pathovars were shown to induce bacterial leaf spots on adult watermelon, melon, and squash (Newberry et al. 2016, 2017, 2018, 2019; Tian et al. 2017) and bacterial warts on pumpkin fruits (Tymon and Inglis 2017). Most of these cucurbit pathogenic strains are phylogenetically diverse (Newberry et al. 2016, 2017, 2018, 2019). These strains belong to different species, including *P. cerasi* (Kaluźna et al. 2016), which corresponds to phylogroup 2a (Berge et al. 2014); *P. syringae* (corresponding to phylogroup 2b, Berge et al. 2014); the unnamed group A *sensu* Gomila et al. (2017; also named phylogroup 2d, Berge et al. 2014); and the phylogroup 2b-a, issued from the recombination of *P. syringae* and *P. cerasi* (Newberry et al. 2019). In other words, these strains belong to different clades (i.e., 2a, 2b, 2b-a, and 2d) within the phylogroup 2 of the *P. syringae* species complex. The phylogroup 2 appears to be the most ubiquitous group and comprises

†Corresponding authors: A. Darrasse; [armelle.darrasse@inrae.fr](mailto:armelle.darrasse@inrae.fr), and M.-A. Jacques; [mario-agnes.jacques@inrae.fr](mailto:mario-agnes.jacques@inrae.fr)

\*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates that four supplementary figures and three supplementary tables are published online.

The author(s) declare no conflict of interest.

© 2020 The American Phytopathological Society





numbers of pathogenic strains with narrow or wide host range but also strains recovered from the environment, pathogenic or not (Baltrus et al. 2017; Berge et al. 2014; Monteil et al. 2013; Morris et al. 2000).

Cucurbitaceae is a family of plants including economically important crops such as cucumbers (*Cucumis sativus* L.), melons (*Cucumis melo* L.), watermelons (*Citrullus lanatus*), and squashes. *Squash* is a generic name for various plant species including *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima*, and *Cucurbita moschata*. Zucchini together with pumpkin, vegetable marrow, and cocozelle form *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*. Acorn, scallop, straightneck, and crookneck form *Cucurbita pepo* subsp. *texana* (Paris 1989; Paris et al. 2015). Genetic relationships between many *Cucurbita pepo* were inferred from the calculation of average dissimilarity values using DNA markers (Paris et al. 2015). These results indicate that zucchini and pumpkin from the same subspecies are genetically close, whereas zucchini and straightneck are more distant.

Pathogenicity assays are essential to determine epidemic potential of phytopathogenic bacteria. Such assays constitute a prerequisite to designate pathovars distinguished by distinct host range and symptoms (Bull et al. 2008). Host range and virulence of *P. syringae sensu lato* are shaped by virulence factors such as type III effectors (T3Es) and phytotoxins (Silby et al. 2011; Xin et al. 2018). T3Es are secreted via the type III secretion system to specifically target host proteins or DNA sequences inside plant cells and alter physiological processes to the benefit of the pathogens (Feng and Zhou 2012). The *P. syringae* content of T3Es evolves, and T3Es can be acquired via horizontal transfer as response to host-mediated selection (Baltrus et al. 2011; Dillon et al. 2019a, b).

Several methods based on genomic DNA sequences are used to study organism phylogeny and update taxonomy. MLSA is very useful to assign strains to previously described taxa and reveal phylogenetic relationships between strains (Jacques et al. 2012, 2016, Young 2010). This portable and easy-to-use method is based on four or more housekeeping genes. Within the *P. syringae* species complex, a classic MLSA scheme initially proposed by Sarkar and Guttman (2004) and refined by Hwang et al. (2005) is often used to describe genetic structure of strain groups and to assign unknown strains to the correct genetic group and pathovar within the *P. syringae* species complex (Bull et al. 2011; Cuntly et al. 2015; Ferrante and Scortichini 2015; Martín-Sanz et al. 2013; Newberry et al. 2016; Słomnicka et al. 2015). Furthermore, several methods based on whole genome sequence comparisons are currently used to infer closely related bacteria relationships, such as the average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) (Konstantinidis and Tiedje 2005). Other methods, based on the number of words of length  $k$  ( $k$ -mers) shared between genome sequences, could be used as proxy for species delimitation (Briand et al. 2019). In addition, distribution of  $k$ -mers in a specific genomic group could provide a list of markers for the identification of bacterial strains (Denancé et al. 2019).

To gain knowledge on bacteria causing VCZ and to define appropriate field management strategies, we developed a three-step approach. Our first aim was to correctly allocate the VCZ strains in the *P. syringae* species complex and infer how these strains are related to other *P. syringae* isolated from cucurbits with MLSA and a whole-genome studies. Second, different pathogenicity assays were designed to finely phenotype strains on their host of origin (zucchini) but also on diverse cucurbit genotypes. Third, based on draft genome sequences, some specific T3Es were highlighted for their potential link with host range specialization, and a new MLSA scheme dedicated to this group of pathogens was developed. This work allows better evaluation of the epidemic potential of VCZ strains.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strain collection.** Fifty-eight strains were isolated from zucchini seedlings (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) with symptoms

of vein clearing issued from seed lots harvested in different geographic locations between 2002 and 2015 (Table 1). Bacterial strains were stored in a  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer in 40% glycerol solution and were routinely cultivated at  $28^{\circ}\text{C}$  on 3 g/liter of tryptone soya broth, 15 g/liter of agar. All these strains induced typical VCZ symptoms (necrosis, vein clearing, and stunting) on zucchini after inoculation by rubbing the cotyledons.

**Housekeeping gene sequencing.** Amplicons were obtained from fresh pure cultures (overnight growth at  $28^{\circ}\text{C}$  on 3 g/liter of tryptone soya broth, 15 g/liter of agar) using primers developed by Hwang et al. (2005) for the four following housekeeping genes: *gapA* (encoding the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A), *gltA* (encoding the citrate synthase), *gyrB* (encoding the B subunit of DNA gyrase), and *rpoD* (encoding the RNA polymerase sigma70 factor RpoD). Briefly, PCRs were performed in a 50- $\mu\text{l}$  reaction mixture containing 0.2  $\mu\text{l}$  of reaction buffer, 0.2  $\mu\text{M}$  dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer, and 10  $\mu\text{l}$  of boiled bacterial cells. The amplification program consisted of 35 cycles of denaturation at  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s, annealing at  $55^{\circ}\text{C}$  (*gapA*) or  $64^{\circ}\text{C}$  (*gltA*, *gyrB*, and *rpoD*) for 30 s, extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min 30 s, and a final extension for 7 min at  $72^{\circ}\text{C}$ . Sanger sequencing was performed on forward and reverse strands.

**Sequence acquisition and alignment.** Forward and reverse nucleotide sequences were assembled and aligned according to the reading frame of a complete gene sequence and trimmed with Bionumerics, version 7.6 and Geneious, version 9.1.7. Sequences were trimmed to obtain fragments of 474 bp (*gapA*), 528 bp (*gltA*), 507 bp (*gyrB*), and 498 bp (*rpoD*) and eventually concatenated according to the alphabetical order in a 2,007-bp-long sequence.

**MLSA.** Phylogenetic analyses were first performed on individual partial gene sequences of *gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD* and then on the concatenated dataset to obtain one single fragment of 2,007 bp. These sequences were analyzed together with publicly available sequences from 22 strains representing the main phylogroups and clades (Berge et al. 2014) of the *P. syringae* species complex and from 17 *P. syringae* strains (13-509A, Ps711, 13-140A, 13-C2, 14-32, 14-410, 14-Gil, Zum3584, 200-1, Bs2121, Zum3984, 03-19A, Bs13-139B, 13-429, Ps03-A13, PsBS3058, and Ps02-B3) isolated from various cucurbits (Newberry et al. 2016, 2019) (Supplementary Table S1). Sequences from strain CFBP 2107 (*P. viridiflava*) were used to root the trees.

For the novel MLSA scheme proposed in this study, the analysis of the four gene sequences previously mentioned (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD*) and genes identified in this study *P<sub>syr3420</sub>*, *P<sub>syr4880</sub>*, and *P<sub>syr3208</sub>* led to the acquisition of one unique fragment of 4,431 bp. Sequences were recovered from the genome sequences of a strain subset from our collection (23 VCZ strains), a subset of 14 strains isolated from cucurbits by Newberry et al. (2019), and 22 diverse strains from phylogroup 2 (Supplementary Table S1).

The Shimodaira–Hasegawa (SH) (Shimodaira and Hasegawa 1999) test implemented in the DnaML program from PHYLIP, Phylogeny Inference Package, version 3.69 (Felsenstein 1989) was used to test whether tree topologies fell within the same confidence limits. Maximum likelihood trees were generated with MEGA 7 (Kumar et al. 2016) via the Tamura–Nei model with gamma distributed with invariant sites (G + I) and 1,000 bootstrap replicates.

**Genome sequencing.** A subset of 23 VCZ strains were chosen to maximize their genetic diversity and their geographic origin (P99, P121, P123, P12855, P84, P12831, P139, P12857, P127, P79, P22, P12854, P12832, P113, P5, P118, P66, P77, P78, P87, P89, P73, and P108). The pathotype strain of *P. syringae* pv. *dysoxyli* (strain CFBP 2356) was also included in this study. Genomic DNAs of these strains were obtained using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The genomic DNA quality was checked





with NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (the NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and quantified using a Qubit fluorometer (Invitrogen). Sequencing libraries were prepared using TruSeq DNA PCR-Free kits (Illumina). DNAs of P66 and P99 strains were paired-end sequenced ( $2 \times 300$  bp) using the Illumina MiSeq v3 (ANAN platform, SFR QuaSav, Angers, France). DNAs of the other VCZ strains and strain CFBP 2356 were paired-end sequenced ( $2 \times 150$  bp) using the Illumina HiSeq X-Ten (Beijing Genomics Institute, China).

**Genome sequence analysis.** Genome assembly was performed with SOAPdenovo version 2.04, SOAPGapCloser version 1.12 (Luo et al. 2012), and Velvet version 1.2.02. (Zerbino and

Birney 2008) Genome sequences were annotated with EuGene-PP (Sallet et al. 2014). A dataset of 116 genome sequences (Supplementary Table S1) composed of 23 genome sequences from strains responsible for VCZ, a collection of 14 genome sequences (13-509A, Ps711, 13-140A, 13-C2, 14-32, 14-410, 14-Gil, Zum3584, 200-1, Bs2121, Zum3984, 03-19A, Bs13-139B, and 13-429) of *P. syringae* isolated from cucurbits (Newberry et al. 2019), the genome sequence of CFBP 2356 (*P. syringae* pv. *dysoxyl*), and 78 genome sequences available in NCBI (to represent *P. syringae* diversity from phylogroup 2) was used for phylogenetic analyses. To assess relationships between genome sequences, the ANIb (Konstantinidis and Tiedje 2005) and percentage of shared 15-mers (Briand et al. 2019) were used. ANIb

TABLE 1. The 58 vein clearing of zucchini (VCZ) strains used in this study

VCZ strain number	Origin	Year	Host	Genome accession numbers
P1	France	2005	Zucchini	
P100	na <sup>a</sup>	2011	Zucchini	
P101	na	2011	Zucchini	
P102	na	2011	Zucchini	
P104	na	2011	Zucchini	
P108	Chile	2011	Zucchini	VLIA00000000
P112	Chile	2011	Zucchini	
P113	Thailand	2011	Zucchini	VLIC00000000
P115	China	2011	Zucchini	
P118	France	2013	Zucchini	VLID00000000
P119	France	2013	Zucchini	
P12	France	2006	Zucchini	
P120	France	2013	Zucchini	
P121	Chile	2013	Zucchini	VLIE00000000
P123	China	2013	Zucchini	VLIF00000000
P125	China	2013	Zucchini	
P127	India	2013	Zucchini	VLIG00000000
P12831	France	2005	Zucchini	WJPZ00000000
P12832	France	2006	Zucchini	VLHX00000000
P12833	France	2005	Zucchini	
P12836	France	2005	Zucchini	
P12854	France	2002	Zucchini	VLHY00000000
P12855	Chile	2007	Zucchini	VLHZ00000000
P12856	France	2005	Zucchini	
P12857	France	2007	Zucchini	VLIB00000000
P130	Thailand	2013	Zucchini	
P131	China	2013	Zucchini	
P133	Thailand	2013	zucchini	
P136	India	2014	Zucchini	
P137	France	2014	Zucchini	
P138	France	2015	Zucchini	
P139	China	2015	Zucchini	VLIH00000000
P14	na	2008	Zucchini	
P22	USA	2009	zucchini	WJPQ00000000
P24	France	2008	Zucchini	
P4	France	2005	Zucchini	
P5	France	2008	Zucchini	WJPR00000000
P55	Chile	2009	Zucchini	
P56	na	2009	Zucchini	
P62	France	2010	Zucchini	
P65	na	2010	Zucchini	
P66 (CFBP 8692)	Thailand	2010	Zucchini	WJSF00000000
P68	USA	2010	Zucchini	
P69	USA	2010	Zucchini	
P70	Thailand	2010	Zucchini	
P71	na	2010	Zucchini	
P72	na	2010	Zucchini	
P73	USA	2010	Zucchini	WJPS00000000
P77	France	2010	Zucchini	WJPT00000000
P78	France	2010	Zucchini	WJPU00000000
P79	France	2010	Zucchini	WJPV00000000
P84	China	2010	Zucchini	WJPW00000000
P87	China	2011	Zucchini	WJPX00000000
P88	China	2011	Zucchini	
P89	France	2011	Zucchini	WJPY00000000
P90	USA	2011	Zucchini	
P94	na	2011	Zucchini	
P99 (CFBP 8693)	France	2005	Zucchini	WJSE00000000

<sup>a</sup> na, not available.



values were obtained with the online version of pyani (<https://github.com/widdowquinn/pyani>), and percentage of shared *k*-mers and distance matrices were calculated with Ki-S, as were dendrograms (<https://iris.angers.inra.fr/galaxypub-cfbp>) (Briand et al. 2019). Specific *k*-mers in predicted coding sequences (CDSs) of each genomic group were identified with SkIf (Denancé et al. 2019). SkIf was also used to identify sequences shared by all VCZ strains and absent in the predicted proteins of other closely related pathovars. Homology groups were identified in predicted proteomes by an OrthoMCL analysis (80% identity on 80% length) using the Family-Companion tool (<http://family-companion.toulouse.inrae.fr/>) (Cottret et al. 2018). Finally, the T3E repertoire of each strain was predicted through tBLASTN search (identity >80% on ≥80% of CDS length) on 138 amino acid sequences of T3Es (Hops database at <http://www.pseudomonas-syringae.org/>). Putative frameshift mutations were checked by aligning each T3E sequence with the corresponding curated reference sequence with MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet et al. 1999).

**Pathogenicity tests on zucchini.** To characterize the pathogenicity of strains on their host of origin (zucchini), a cotyledon rubbing test and two seed soaking tests were run on *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Tosca' and 'Opale'. For each test, 23 strains responsible for VCZ (P99, P121, P123, P12855, P84, P12831, P139, P12857, P127, P79, P22, P12854, P12832, P113, P5, P118, P66, P77, P78, P87, P89, P73, and P108), and four controls were inoculated. Water was used as negative control, CFBP 5427 (*P. syringae* pv. *aptata*) and CFBP 6463 (*P. amygdali* pv. *lachrymans*) were used as pathogenic controls on zucchini, and CFBP 2356 (*P. syringae* pv. *dysoxyli*), which is a woody plant pathogen, was used as negative control.

In the cotyledon rubbing test, five plantlets at the cotyledon stage were inoculated per strain and cultivar by rubbing the cotyledon surface three times with a finger soaked in bacterial suspensions calibrated at  $1 \times 10^8$  cfu/ml. Plantlets were produced in a greenhouse from healthy seeds for 7 days in pots containing Klassman substrate and watered as needed for optimal growth. Inoculated plantlets were incubated in a growth chamber (18°C night, 25°C day, 14 h daylight, relative humidity near 100%), and the health status of each plantlet was recorded 8 days postinoculation (dpi). Plantlets were qualitatively rated, and the number of plantlets with necrosis on leaves, vein clearing on leaves, and stunting was counted.

For the two seed soaking tests, 10 seeds per strain and per zucchini cultivar (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Tosca' and 'Opale') were inoculated by a 30 min soaking in a fresh bacterial suspension calibrated at  $1 \times 10^6$  cfu/ml or  $1 \times 10^7$  cfu/ml. Then, seeds were dried under a laminar flow in individual Petri dishes containing filter paper for 2 h. Each dried seed was sown in an individual small pot containing Klassman substrate and was watered. Pots were incubated in a climatic chamber (18°C night, 25°C day, 14 h daylight, relative humidity near 100%). Health status of each plantlet was evaluated 8 days after sowing for both inoculum doses and ≤14 days for test with a  $1 \times 10^7$  cfu/ml inoculum concentration. Plantlets were considered healthy when no macroscopic symptom was visible and diseased when plantlets presented at least one of the following symptoms: necrosis on cotyledons, vein clearing of the first leaf, or stunting.

**Pathogenicity tests on different cucurbit species.** To evaluate the host range of the VCZ strains, pathogenicity tests were run on a collection of 11 cucurbit genotypes. Six squashes including zucchini (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Opale' and 'Tosca'), a straightneck squash (*Cucurbita pepo* subsp. *texana* 'Cheetah'), a pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Mischief'), a French pumpkin (*Cucurbita maxima* 'Rouge Vif d'Etampes'), and a butternut (*Cucurbita moschata* 'Sibelle') were tested. Three melon varieties including a cantaloupe (*Cucumis melo* var. *cantalupis* 'Perseus'), a Galia melon (*Cucumis melo* var. *galia* 'Citrex'), and a Canary melon (*Cucumis melo* var. *inodorus* 'Helios'); a cucumber (*Cucumis sativus* 'Dahab'); and a watermelon (*Cucumis lanatus*

'Livia') were tested. Seeds were sown individually in pots containing Klassman substrate and germinated in a greenhouse until the first true leaf stage. The day before inoculation, plantlets were moved for acclimation to inoculation cages in growth chamber (18°C night, 25°C day for 14 h). Each inoculation cage contained five plantlets of each cucurbit genotype. Six strains responsible for VCZ (P99, P79, P66, P73, P77, and P108) and three controls including water, CFBP 5427 (*P. syringae* pv. *aptata*), and CFBP 6463 (*P. amygdali* pv. *lachrymans*) were evaluated. The assay was independently done twice for each genotype (except for *Cucurbita pepo* subsp. *texana* 'Cheetah'). Bacterial suspensions were prepared from fresh cultures and calibrated at  $1 \times 10^7$  cfu/ml. Each strain was sprayed until runoff on each plantlet. Plantlets were incubated for 7 days (18°C night, 25°C day for 14 h and near 100% relative humidity). Pathogenicity was qualitatively rated as (0) when a plantlet was asymptomatic and (1) when plantlets presented necrosis. First leaves were collected for photography on a light table.

**Test of hypersensitive response.** Ability of strains P99, P66, P108, and P12857 to elicit a hypersensitive response (HR) was tested on melons (*Cucumis melo* var. *galia* 'Citrex', *Cucumis melo* var. *cantalupis* 'Perseus', *Cucumis melo* var. *inodorus* 'Helios'), cucumber (*Cucumis sativus* 'Dahab'), and watermelon (*Citrullus lanatus* 'Livia'). Additionally, strains P79, P77, and P73 were tested on watermelon. These strains were chosen based on phylogenetic position and to represent different pathogenicity groups. Pathogenicity controls were CFBP 5427 (*P. syringae* pv. *aptata*) on melons, CFBP 6463 (*P. amygdali* pv. *lachrymans*) on cucumber, and CFBP 4459 (*Acidovorax citrulli*) on watermelon. HR control was given by strain CFBP 2356 (*P. syringae* pv. *dysoxyli*) because this strain is nonpathogenic on cucurbits. Water was used as a negative control. At the time of inoculation, fresh inocula calibrated at  $1 \times 10^8$  cfu/ml were infiltrated with a needle in the limb of the second leaf of 3-week-old plantlets produced in Klassman substrate in a greenhouse. The HR characteristics (rapid death of cells in the infiltration area) were visually evaluated at 48 and 72 h after inoculation on each inoculated leaf. Dried brown necrosis limited to the infiltrated area corresponded to HR, whereas spreading lesions that eventually collapsed with a water-soaked aspect corresponded to disease.

**Nucleotide sequence accession numbers.** The GenBank accession numbers for the partial sequences used in this study are MN176747 to MN176804 for *gapA*, MN176805 to MN176862 for *gltA*, MN176863 to MN176920 for *gyrB*, and MN176921 to MN176978 for *rpoD*. Genomic sequences of VCZ strains sequenced in this study were deposited in NCBI; accession numbers are listed in Table 1. The genomic sequence of *P. syringae* pv. *dysoxyli* CFBP 2356 sequenced in this study was deposited in NCBI (accession number VLHW00000000).

## RESULTS

**Phylogenetic analyses of VCZ strains.** All strains responsible for VCZ belonged to phylogroup 2 of the *P. syringae* species complex (Fig. 1A). The maximum likelihood tree clearly showed that all VCZ strains grouped in the same branch, as did type strains and pathotype strains of phylogroup 2 (Fig. 1A). Other strains of *P. syringae sensu lato* isolated from various cucurbits (Newberry et al. 2016, 2019) also grouped in the same cluster. VCZ strains were genetically different from strain NM002 of *P. amygdali* pv. *lachrymans*, which is a pathovar previously reported as pathogenic on various cucurbits (Bradbury 1986) and belonging to phylogroup 3 (Słomnicka et al. 2018).

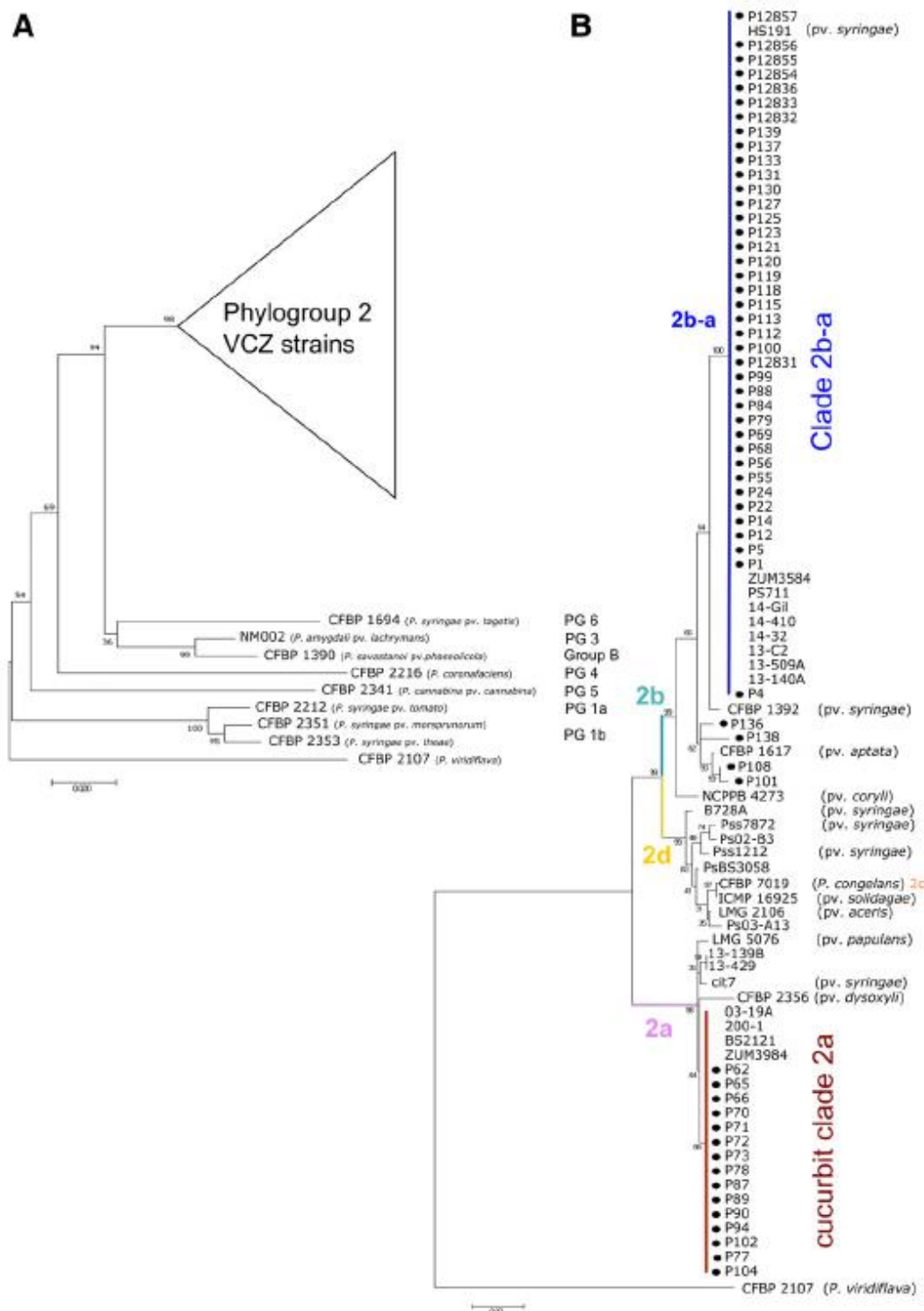
Within phylogroup 2, VCZ strains were assigned mainly to clade 2b-a and to clade 2a of the *P. syringae* species complex (Fig. 1B). Thirty-nine VCZ strains grouped in one highly supported cluster (bootstrap value of 100%) corresponding to clade 2b-a previously described by Newberry et al. (2019). This cluster also gathered eight





strains isolated from squash and watermelon (Newberry et al. 2019) and *P. syringae* pv. *syringae* HS191 isolated from millet (*Panicum miliaceum*). The closest type and pathotype strains to clade 2b-a were *P. syringae* pv. *syringae* CFBP 1392 and *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 1617, isolated from lilac (*Syringa vulgaris*) and sugar beet (*Beta vulgaris*), respectively. A second highly supported cluster

(bootstrap value of 99%), previously described as clade 2a (Berge et al. 2014), grouped 15 VCZ strains and four strains isolated from cantaloupe, squash, and watermelon (Newberry et al. 2019). The closest type and pathotype strains were *P. syringae* pv. *dysoxyli* CFBP 2356, *P. syringae* pv. *syringae* cit7 and *P. syringae* pv. *papulans* LMG 5076 isolated from kohokohe (*Dysoxylum spectabile*), orange



**Fig. 1.** Phylogenetic relationships of strains responsible for vein clearing of zucchini (VCZ). The diversity of 58 VCZ strains and 17 strains isolated from diverse cucurbit species (Newberry et al. 2016, 2019) was assessed through multilocus sequence analysis. Maximum likelihood (ML) trees were based on concatenated partial sequences of *gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD* (2,007 bp). Bootstrap scores (1,000 replicates) are displayed at each node. **A**, ML tree of typed strains representing the *P. syringae* group. Phylogroups (PGs) are derived from Bull and Koike (2015). **B**, Detail of phylogroup 2 diversity including VCZ strains. Clades are indicated based on Berge et al. 2014, Bull and Koike 2015, and Newberry et al. 2019. Black points indicate VCZ strains.



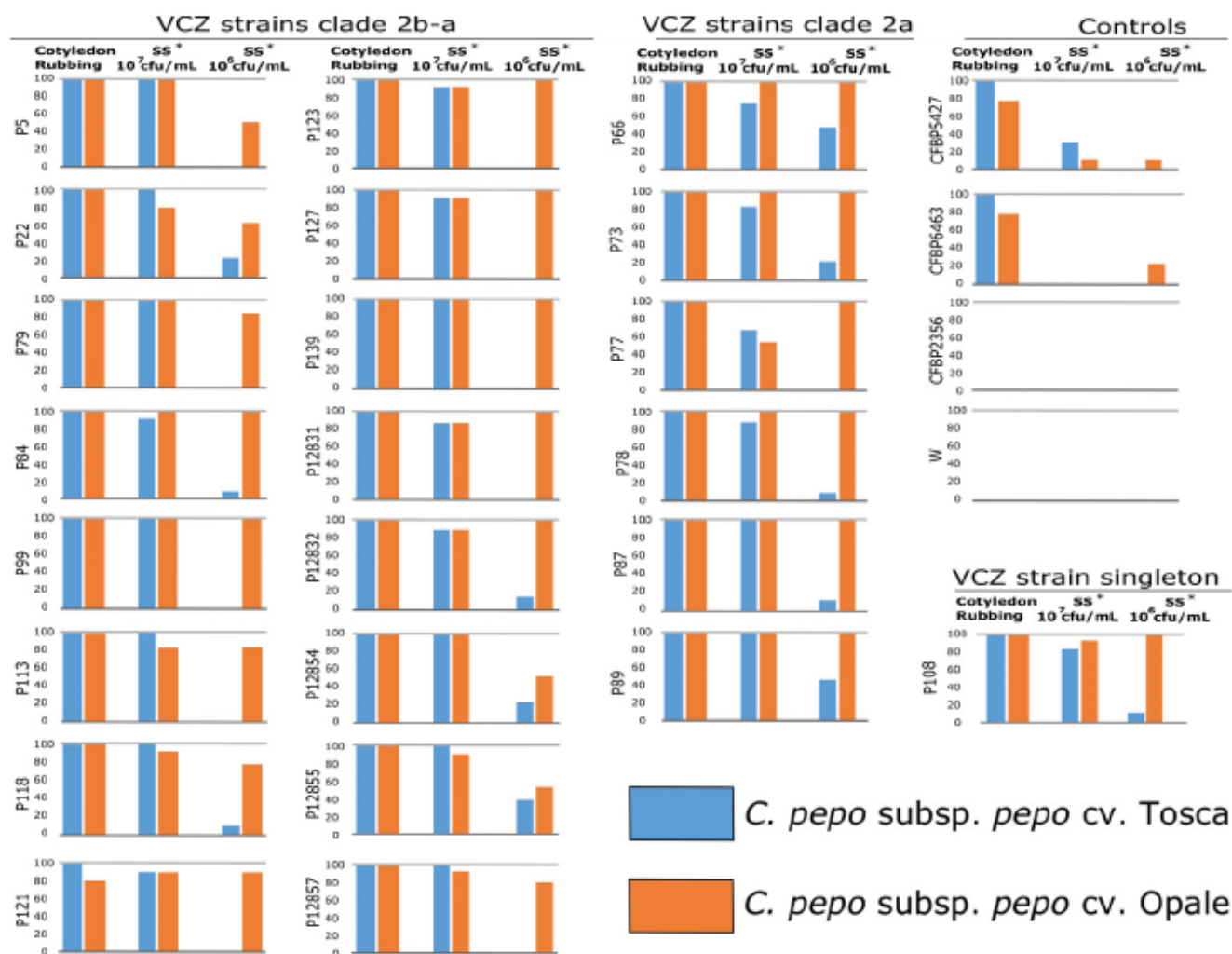
(*Citrus sinensis*), and apple tree (*Malus domestica*), respectively. The last four VCZ strains (P136<sub>2b-S</sub>, P138<sub>2b-S</sub>, P108<sub>2b-S</sub>, and P101<sub>2b-S</sub>) grouped in clade 2b but were clearly separated from clade 2b-a. Three strains isolated from watermelon (Newberry et al. 2016) were closely related to these four singletons.

According to the SH test, maximum likelihood trees performed on individual gene and the concatenated four genes were not congruent, suggesting recombination events among loci (Supplementary Fig. S1). Specifically, trees built on *gapA*, *gltA*, and *rpoD* were not congruent with the tree based on the concatenated dataset. The differences were limited between *gltA* and the concatenated dataset trees, whereas clusters behaved substantially differently when *gapA* or *rpoD* were analyzed separately.

**Pathogenicity of VCZ strains on zucchini.** All VCZ strains, *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463, and *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 were pathogenic on zucchini, as demonstrated with the cotyledon rubbing test, but only VCZ strains induced severe stunting (Fig. 2, Supplementary Table S2). More specially, 23 VCZ strains were evaluated on two zucchini cultivars (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* ‘Tosca’ and ‘Opale’). All VCZ strains induced cotyledon

necrosis and leaf necrosis on plantlets with little variability among the tested strains (Fig. 2). Short-lived vein clearing symptom was observed in the days after the inoculation of all VCZ strains, except for strains P22<sub>2ba-A</sub> and P79<sub>2ba-A</sub>, which did not induce vein clearing on one or the other cultivar (Supplementary Table S2). Most VCZ strains induced severe stunting except strains P22<sub>2ba-A</sub> and P79<sub>2ba-A</sub>, which were less aggressive than other strains. Strains *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 and *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463, previously reported as pathogenic on various cucurbits (Bradbury 1986; Morris et al. 2000), were used as controls. Both strains induced necroses on both cultivars that were similar to those induced by VCZ strains. Moreover, *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 was able to produce short-lived vein clearing on zucchini ‘Opale’ but not *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463. Neither CFBP 5427 nor CFBP 6463 was able to induce severe stunting on inoculated zucchini. No symptom was observed on plantlets inoculated with water and *P. syringae* pv. *dysoxyl* CFBP 2356, which is a pathotype strain from clade 2a that is not pathogenic on cucurbits.

Seed soaking tests revealed different levels of aggressiveness for VCZ strains, and overall, no differences in terms of aggressiveness



**Fig. 2.** Responses of two cultivars of zucchini to seed inoculation and cotyledon rubbing assay with *Pseudomonas syringae* strains. *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* ‘Opale’ (orange) and ‘Tosca’ (blue) plants or seeds were inoculated with 23 strains of *P. syringae* responsible for vein clearing of zucchini (VCZ) and four control strains including CFBP 5427 (*P. syringae* pv. *aptata*), CFBP 6463 (*Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans*), CFBP 2356 (*P. syringae* pv. *dysoxyl*), and water. Bars indicate the percentage of disease incidence over the number of germinated plantlets 7 days after inoculation for a given strain and a given test (cotyledon rubbing, number of tested plantlets  $n = 5$ ; seed soaking at  $1 \times 10^7$  cfu/ml, number of sown seeds  $n = 10$ ; seed soaking at  $1 \times 10^6$  cfu/ml, number of sown seeds  $n = 10$ ). SS\*, seed soaking test.





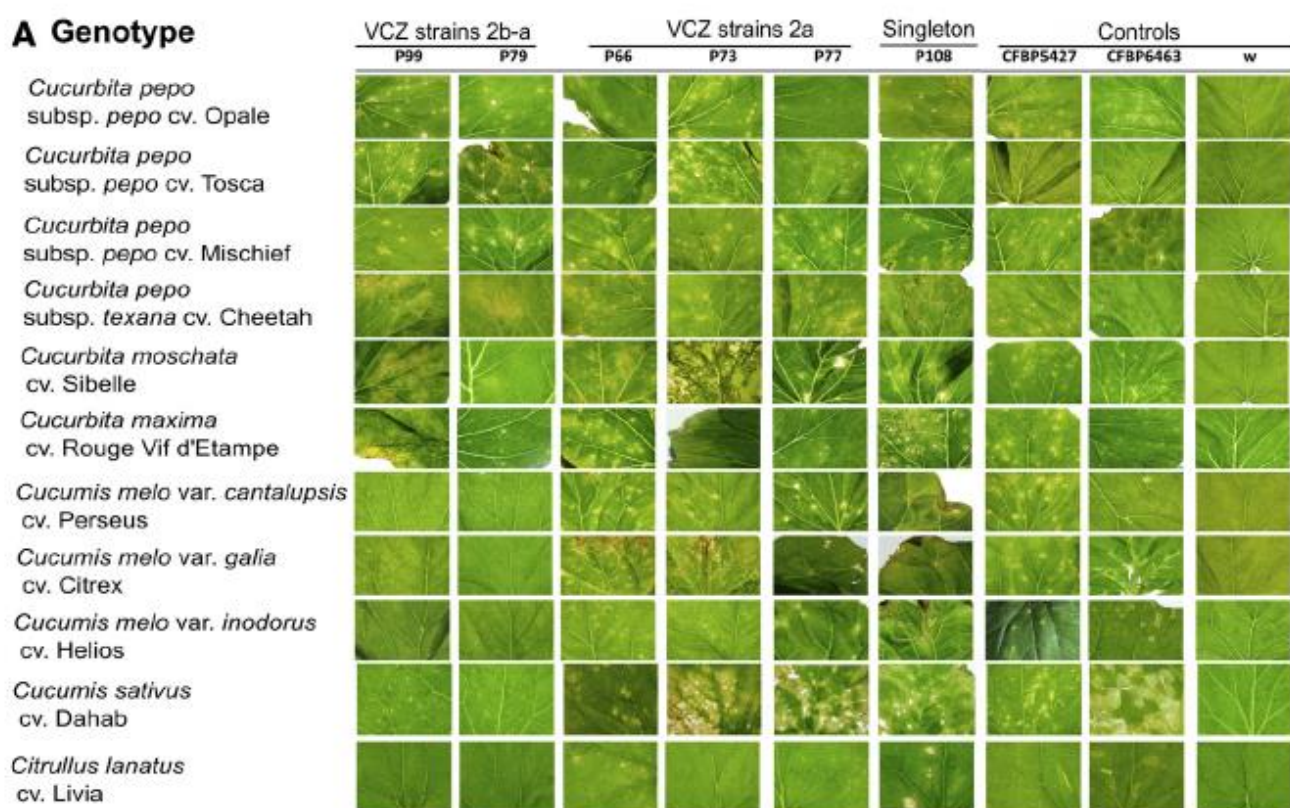
on zucchini were linked to the genetic group of the strains (Fig. 2). With the seed soaking test in a suspension at  $1 \times 10^6$  cfu/ml, VCZ strains were highly aggressive on 'Opale' and weakly aggressive on 'Tosca' (Fig. 2). With the seed soaking test in a higher concentrated suspension ( $1 \times 10^7$  cfu/ml), VCZ strains were highly aggressive on both cultivars, inducing necrosis on almost all plantlets. Strain P22<sub>2b-A</sub> was the only VCZ strain that did not induce any stunting with this test (Supplementary Table S2). *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463 and *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 induced limited necroses on a few plantlets in these seed soaking tests. No symptoms were observed on plantlets issued from seeds inoculated with water and *P. syringae* pv. *dysoxyl* CFBP 2356.

**Host range of VCZ strains.** All VCZ strains induced similar symptoms on zucchini and pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) cultivars (Fig. 3A). On zucchini (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Tosca' and 'Opale') and on pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* 'Mischief'), the strains responsible for VCZ, P99<sub>2b-A</sub>, P79<sub>2b-A</sub>,

P66<sub>2a-B</sub>, P77<sub>2a-D</sub>, P73<sub>2a-D</sub>, and P108<sub>2b-S</sub> induced water-soaking spots evolving in necrotic spots surrounded by a yellow halo at 7 dpi. Interestingly, *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 also induced this type of symptom on these genotypes and could not be distinguished from the VCZ strains, whereas *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463 induced smaller irregular necrotic lesions.

All VCZ strains were pathogenic on straightneck squash (*Cucurbita pepo* subsp. *texana*) and winter squashes (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*), but different types of symptoms were observed according to the MLSA group (Fig. 3A). The yellow straightneck squash (*Cucurbita pepo* subsp. *texana* 'Cheetah') seemed to be less susceptible to VCZ strains from clade 2b-a (P99<sub>2b-A</sub>, P79<sub>2b-A</sub>), which induced dried brown spots, whereas VCZ strains from clade 2a (P66<sub>2a-B</sub>, P73<sub>2a-D</sub>, P77<sub>2a-D</sub>) induced water-soaked spots evolving in necrosis and were associated with chlorosis. On butternut (*Cucurbita moschata* 'Sibelle'), VCZ strains from clade 2b-a induced brown necrotic spots with a yellow halo that collapsed, whereas strains from

### A Genotype



### B

Genus	Genotype	VCZ strains 2b-a		VCZ strains 2a			Singleton	Controls		
		P99	P79	P66	P73	P77	P108	CFBP5427	CFBP6463	W
<b>Cucurbita</b>	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Opale	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Tosca	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Mischief	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucurbita pepo</i> subsp. <i>texana</i> cv. Cheetah	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucurbita moschata</i> cv. Sibelle	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucurbita maxima</i> cv. Rouge vif d'Etampe	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Cucumis</b>	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupsis</i> cv. Perseus	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucumis melo</i> var. <i>galia</i> cv. Citrex	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucumis melo</i> var. <i>inodorus</i> cv. Helios	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Cucumis sativus</i> cv. Dahab	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<b>Citrullus</b>										
	<i>Citrullus lanatus</i> cv. Livia	-	-	+	-	-	+	-	+	-

**Fig. 3.** Host range test of vein clearing of zucchini (VCZ) strains. Six *Pseudomonas syringae* strains responsible for VCZ and three controls including water, *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427, and *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463 were spray inoculated ( $1 \times 10^7$  cfu/ml until runoff) on six genotypes of *Cucurbita* sp., four genotypes of *Cucumis* sp., and one genotype of *Citrullus lanatus*. Water was sprayed as control. **A**, Photographs of the symptoms observed on the first leaf 7 days after inoculation. **B**, Results of pathogenicity test: +, disease symptoms; -, absence of symptoms.





clade 2a induced large water-soaking lesions and necrotic spots surrounded by a yellow halo. On *Cucurbita maxima* 'Rouge Vif d'Étampes', VCZ strains from clade 2b-a induced tiny yellow spots, whereas VCZ strains from clade 2a induced water-soaked spots surrounded by a yellow halo.

Only VCZ strains from clade 2a and the singleton P108<sub>2b-S</sub> were pathogenic on the cucumber, melons, and watermelon cultivars that were tested (*Cucumis sativus*, *Cucumis melo*, *Citrullus lanatus*) (Fig. 3). VCZ strains from clade 2a (P66<sub>2a-E</sub>, P73<sub>2a-D</sub>, P77<sub>2a-D</sub>) were pathogenic on all three melon varieties (*Cucumis melo* var. *galia* 'Citrex', *Cucumis melo* var. *inodorus* 'Helios', *Cucumis melo* var. *cantaloupe* 'Perseus') and induced necrotic spots surrounded by a yellow halo. On cucumber (*Cucumis sativus* 'Dahab'), VCZ strains from clade 2a were highly aggressive and induced collapsing circular necrotic spots with large chlorosis. In clade 2a, only strain P66<sub>2a-E</sub> induced necrotic spots surrounded by a little yellow halo on watermelon (*Citrullus lanatus* 'Livia'). The tested cultivars of cucumber, melon, and watermelon were not susceptible to the VCZ strains from clade 2b-a (P99<sub>2b-A</sub>, P79<sub>2b-A</sub>). Some tiny dry white spots were sometimes visible on inoculated leaves, but plants remained healthy 2 weeks after inoculation. Singleton VCZ strain P108<sub>2b-S</sub> was pathogenic on all tested cucurbits, but the symptoms were different from those caused by VCZ strains from clade 2a (P66<sub>2a-E</sub>, P73<sub>2a-D</sub>, P77<sub>2a-D</sub>) on some hosts. For instance, on watermelon, P108<sub>2b-S</sub> induced large dried necrotic spots, whereas P66<sub>2a-E</sub> induced small spots with a discrete yellow halo. *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463 and *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 were pathogenic on almost all the tested genotypes, and the symptoms were sometimes different from those caused by VCZ strains. As expected, *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP 6463 induced angular leaf spots on cucumber, and *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 induced circular necrotic spots on melons. All plantlets inoculated with water remained asymptomatic 7 dpi.

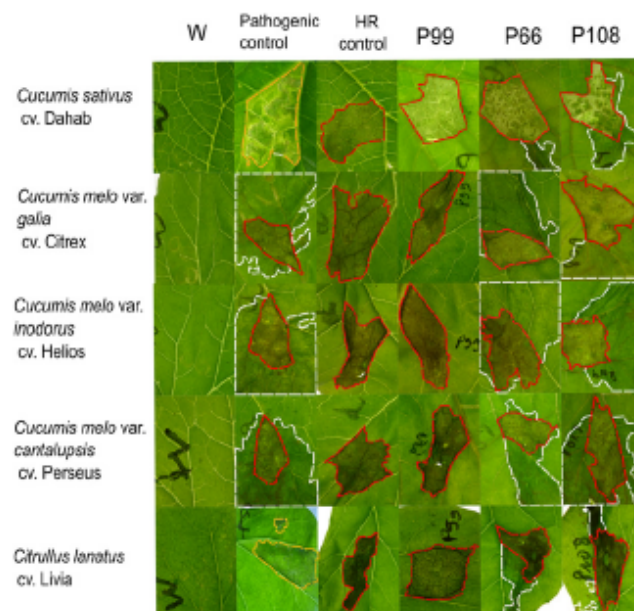
**HR of different cucurbits toward VCZ strains.** Infiltration tests on cucumber, watermelon, and melons confirmed that VCZ strains had different host ranges (Fig. 4). Starting from 48 h after inoculation, spreading lesions that eventually collapsed with a water-soaked aspect on the abaxial leaf surface were noticed for all pathogenic controls on their hosts (*A. citrulli* on watermelon, *P. amygdali* pv. *lachrymans* on cucumber, and *P. syringae* pv. *aptata* on melons). *P. syringae* pv. *dysoxylis* CFBP 2356, a nonpathogenic strain on cucurbits, induced HR with a dried brown necrosis limited to the infiltrated area. As expected, strains P66<sub>2a-E</sub> and P108<sub>2b-S</sub> caused water-soaked lesions similar to those of the corresponding pathogenic controls on cucumber and the three melon varieties. In contrast, strain P99<sub>2b-A</sub> caused the same HR-like necrosis as those of *P. syringae* pv. *dysoxylis* CFBP 2356 on all tested genotypes, confirming nonhost reaction. On watermelon, strain P66<sub>2a-E</sub> was pathogenic, whereas strains P73<sub>2a-D</sub> and P77<sub>2a-D</sub> induced HR-like necrosis, confirming pathogenic heterogeneity on this host for strains of the clade 2a (Supplementary Fig. S2).

**VCZ strains genome sequence analyses.** Based on whole genome sequences, ANIb revealed strong relationships between VCZ strains from the 2a and 2b-a groups (Fig. 5, Supplementary Table S3). First, ANIb values between genome sequences of *P. syringae* strains from clades 2a and 2b (except 2b-a strains) were <95%, indicating that strains belonged to different species (Supplementary Table S3). Interestingly, the genome sequences of the 23 VCZ strains and the other 14 cucurbit strains (Newberry et al. 2019) included in clades 2b-a and 2a were more similar, with ANIb value >95%.

Based on whole genome sequences, new clusters inside the main genetic groups (clades 2b-a and 2a) were highlighted by ANIb and shared *k*-mer analyses (Fig. 5). Both dendrograms displayed similar phylogeny and showed three new clusters within each clade 2b-a and 2a (Fig. 5). Within clade 2b-a, the first cluster (A) gathered 15 VCZ strains and two cucurbit strains (Ps711<sub>2b-A</sub>, 13-509A<sub>2b-A</sub>) isolated from squash (Newberry et al. 2019). The second cluster (B)

gathered the strain P12857<sub>2b-B</sub> responsible for VCZ with six cucurbit strains isolated from melon CC457 (Baltrus et al. 2014) and watermelon (13-C2<sub>2b-B</sub>, 13-140A<sub>2b-B</sub>, 14-410<sub>2b-B</sub>, 14-32<sub>2b-B</sub>, 14-Gil<sub>2b-B</sub>), and finally, cluster C did not contain any VCZ strain but one strain (Zum3584<sub>2b-C</sub>) isolated from squash (Newberry et al. 2019). The strain *P. syringae* pv. *syringae* HS191, which was encompassed in clade 2b-a with MLSA, was excluded from one of these clusters. Within clade 2a, the first cluster (D) comprised four VCZ strains (P77<sub>2a-D</sub>, P73<sub>2a-D</sub>, P78<sub>2a-D</sub>, P87<sub>2a-D</sub>) and two other strains (03-19A<sub>2a-D</sub>, 200-1<sub>2a-D</sub>) isolated from melon and squash (Newberry et al. 2019). The second cluster (E) gathered two VCZ strains (P66<sub>2a-E</sub>, P89<sub>2a-E</sub>), with strains Bs2121<sub>2a-E</sub> and Zum3984<sub>2a-E</sub> isolated from squash (Newberry et al. 2019). The last cluster (F) was composed of two strains (13-139B<sub>2a-F</sub>, 13-149<sub>2a-F</sub>) isolated from watermelon (Newberry et al. 2019).

Specific signatures were found in genome sequences with Skiff that distinguish the six clusters containing cucurbit strains within clades 2a and 2b-a. In genomic sequences of strains from clade 2b-a, a total of 108 CDSs with specific signatures were found to differentiate the strains of cluster A from strains of clusters B and C. For cucurbit strains from clade 2a, a total of 578 CDSs with specific signatures of cluster E were found and allowed to distinguish cluster E from clusters D and F. Many specific *k*-mers were identified on CDSs localized in an integrative and conjugative element, but other signatures were located elsewhere in the genome sequences. Among these latter CDSs, three were retained because they were widely distributed within the set of 116 *P. syringae* genome sequences and allowed phylogenetic analyses. These three CDSs corresponded to *Psyr3420*, *Psyr4880*, and *Psyr3208* in strain B728a of *P. syringae*, encoding the nitrogen fixation protein FixH, a hypothetical protein, and the NADH dehydrogenase subunit M, respectively. OrthoMCL analysis revealed proteins specifically present in each cluster comparatively to the others in the same clade.



**Fig. 4.** Hypersensitive response (HR) of diverse cucurbits after infiltration of vein clearing of zucchini (VCZ) strains. Three VCZ strains (P99, P66, and P108) were infiltrated in leaves of four genotypes of *Cucumis* sp. and one *Citrullus lanatus*. Symptoms were pictured 72 h after inoculation. Pathogenic controls consisted in *Acidovorax citrulli* CFBP 4459 on *Cucumis lanatus* 'Livia', *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* CFBP 5467 on melon cultivars, and *P. amygdali* pv. *lachrymans* CFBP6463 on cucumber. The HR control for all tested plants was *P. syringae* pv. *dysoxylis* CFBP 2356. Water was used as a negative control. Within the inoculated area the red line delimits necrosis, and the orange line delimits water-soaked lesion. The white line delimits the expansion of water-soaked symptoms beyond the inoculation point.



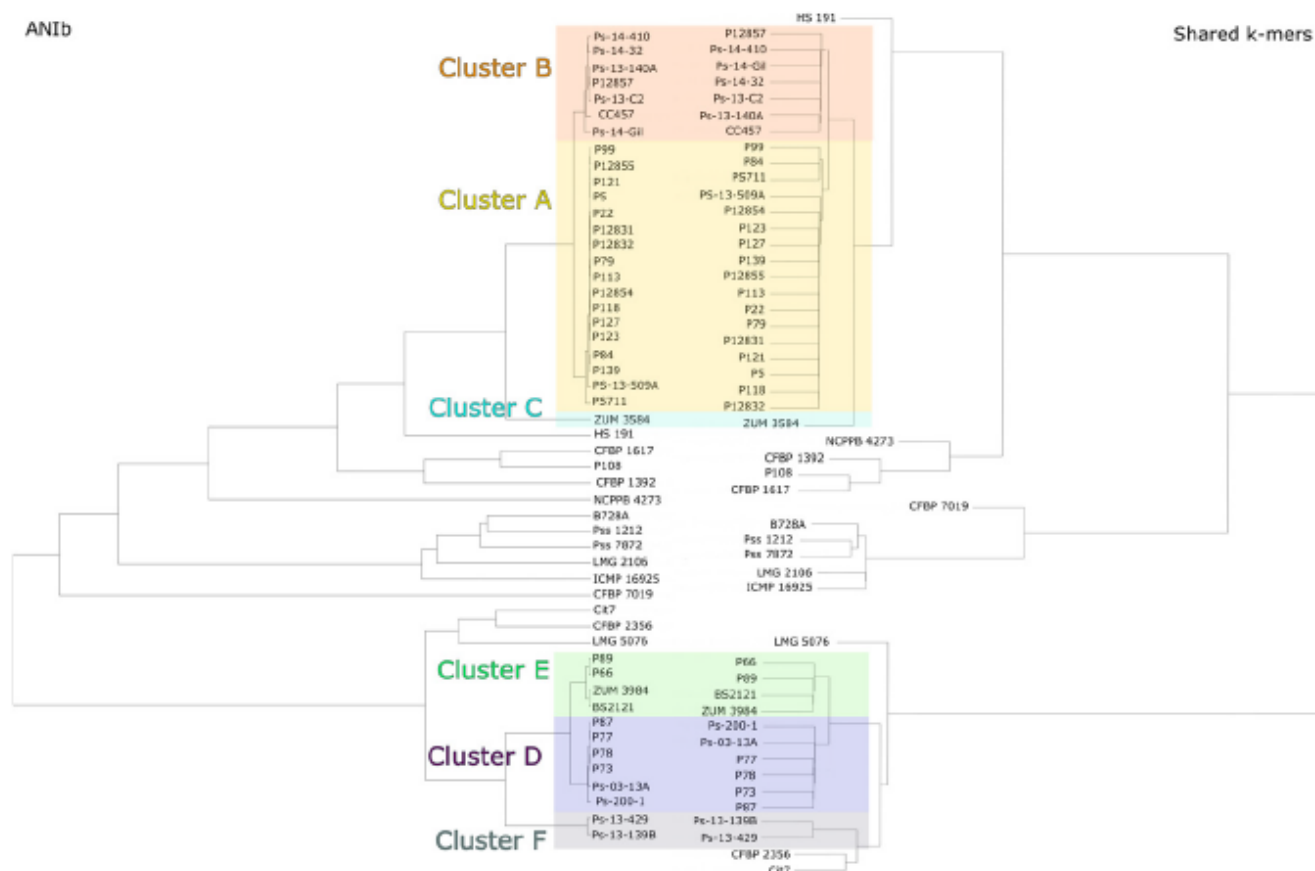
Therefore 13, 9, 190, 54, 75, and 384 proteins were specific of clusters A, B, C, D, E, and F, respectively (data not shown).

**Proposal of a novel MLSA scheme dedicated to cucurbit pathogens.** Seven genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3420*, *Psyr4880*, and *Psyr3208*) were selected to highlight all clusters observed with whole genome analyses within clades 2b-a and 2a. The MLSA tree based on the sequences of this novel MLSA scheme including these seven genes was constructed for 23 VCZ strains, 14 strains isolated from cucurbits (Newberry et al. 2019), and 22 diverse strains from phylogroup 2 (Fig. 6A). Phylogenies were constructed for each gene individually and for the concatenated dataset (Supplementary Fig. S3), and their topologies were compared with the SH test. As expected, individual phylogenies were not congruent with the one constructed on the concatenated dataset, indicating that each gene fragment was bringing complementary information. The tree showed that cucurbit strains of clade 2b-a were separated into three distinct branches, and VCZ strains were carried by two of them. The cucurbit strains from clade 2a split also into three separate branches, and VCZ strains were carried by two of them. Overall, composition of each branch was coherent with the composition of clusters identified via whole genome sequence analyses.

**T3Es.** Strains responsible for VCZ presented different T3E repertoires according to their genetic group (Fig. 7). Using t-BLASTN and sequence alignment, we identified 23 different T3Es in the genome sequences of the 23 VCZ strains. The composition of T3E repertoires was associated with strain clusters identified with whole genome sequence analysis/core-genome MLSA because all strains from a given cluster had homogeneous set of T3Es (Figs. 6B and 7) except two strains from the collection of Newberry, strains

14-Gil<sub>2ba-B</sub> and 13-139B<sub>2a-F</sub>, which lacked one T3E. The 15 VCZ strains from the cluster A possessed a set of 18 T3Es, and one of them (*avrRpt2*) was specific to that cluster. The strain P12857, which was the only VCZ strain from cluster B, possessed 16 T3Es, of which 14 were common with the cluster A. The four VCZ strains from cluster D possessed 13 T3Es, of which one (*hopARI*) was specific to strains from that cluster. The strains P89<sub>2a-E</sub> and P66<sub>2a-E</sub> from cluster E possessed 14 T3Es, 11 being common with cluster D. P108<sub>2b-S</sub> (singleton) had a smaller T3E repertoire (11 T3Es) with a unique composition but no specific T3E in comparison with the main VCZ clusters. Finally, eight T3Es (*avrE1*, *hopAA1*, *hopAE1*, *hopAZ1*, *hopAG1*, *hopAH1*, *hopBA1*, and *hopI1*) were found in all strains responsible for VCZ.

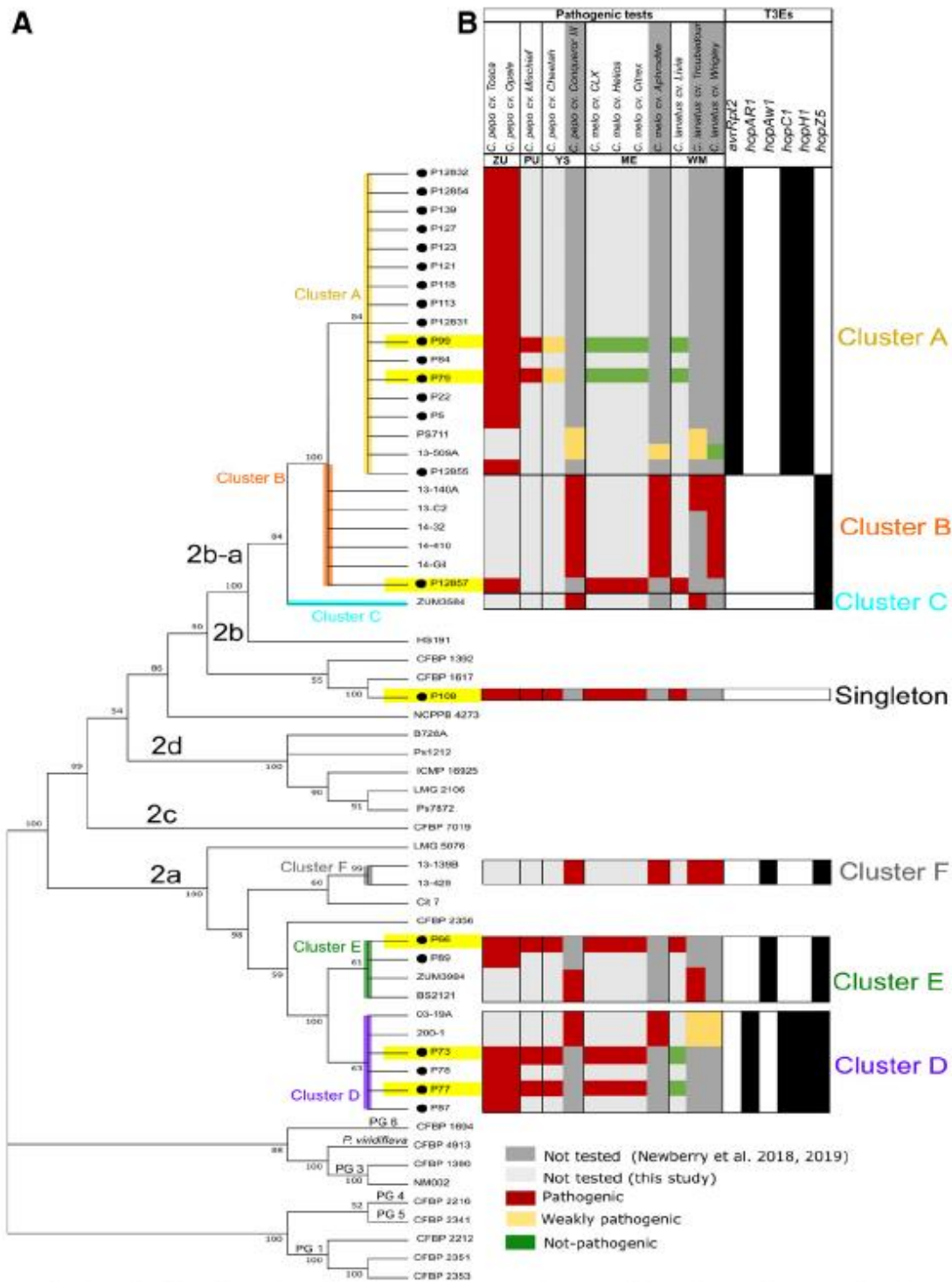
The different genetic groups of VCZ strains differing by their host ranges are associated with different T3E repertoires (Figs. 6 and 7). Because no pathogenicity data were available for VCZ strains from cluster B, we evaluated the behavior of P12857<sub>2ba-B</sub> on cucumber, melons, and watermelon with the infiltration method (Supplementary Fig. S4). P12857<sub>2ba-B</sub> induced spreading water-soaked necrosis in all leaves from these hosts, thus indicating that this strain was pathogenic on these cucurbits. Interestingly, homogeneous T3E repertoires among strains from the same cluster gave homogeneous pathogenicity results (Figs. 6 and 7). The tested strains (P99<sub>2ba-A</sub>, P79<sub>2ba-A</sub>) from cluster A (clade 2b-a) were not pathogenic on cucumber, melons, and watermelon and were weakly pathogenic on yellow straightneck genotype. Interestingly, strains from cluster A possessed a unique T3E (*avrRpt2*) and did not have any copy of *hopZ5*, compared with all other VCZ strains from clusters B, D, and E, which were highly pathogenic on these hosts. Strains P66<sub>2a-E</sub> (cluster E), P12857<sub>2ba-B</sub> (cluster B), and P108<sub>2b-S</sub> (singleton) were



**Fig. 5.** Relationships between genomic sequences of *Pseudomonas syringae* from phylogroup 2 using average nucleotide identity based on BLAST (ANIb) and *k*-mer approaches. Dendrograms were built on distances calculated from ANIb and *k*-mer matrices obtained with Ki-S (Briand et al. 2019). The color blocks represent the cucurbit clusters highlighted with both approaches.







**Fig. 6. Phylogeny of vein clearing of zucchini (VCZ) strains, host range, and presence of type III effector (T3E) encoding genes.** A, Phylogeny based on new multilocus sequence analysis scheme with seven genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psy3420*, *Psy4880*, and *Psy3208*). Maximum likelihood tree was based on concatenated partial sequences (4,431 bp). Bootstrap scores (1,000 replicates) were displayed at each node. Black points indicate VCZ strains. B, Summarized results obtained from pathogenicity tests and presence of differential genes encoding T3Es recovered from genome sequence analysis. Columns in dark gray report results from Newberry et al. (2018, 2019) that were available for strains Ps711, 13-509A, 13-140A, 13-C2, 14-32, 14-410, 14-Gil, Zum3584, 13-139B, 13-429, Zum3984, Bs2121, 03-19A, and 200-1. The light gray columns report the results obtained in this study. Colors are as follows: light or dark gray column when a strain is not tested on a given host, red when a strain is pathogenic on a given host, yellow when a strain is weakly pathogenic on a given host, and green when a strain is not pathogenic on a given host. A black box indicates the presence of a T3E. Cucurbit species and subspecies are reported as follows: ME, melons; PU, pumpkin; WM, watermelon; YS, yellow straightneck squash; ZU, zucchini,



pathogenic on watermelon (*Citrullus lanatus* 'Livia'). It is worth noting that all these strains lacked *hopC1* and *hopH1*, which were present in strains P99<sub>2b-a-A</sub> and P79<sub>2b-a-A</sub> from cluster A, and P73<sub>2a-D</sub> and P77<sub>2a-D</sub> from cluster D, strains that were not pathogenic and produced HR-like necrosis on watermelon.

**DISCUSSION**

Facing the increase of VCZ in zucchini seed-producing areas, we engaged a study to refine results obtained previously on this disease. The present study reveals that VCZ is currently caused by strains belonging to different phylogenetic lineages within the phylogroup 2 of the *P. syringae* species complex. Based on a MLSA using four

housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD*), VCZ strains are grouped mainly in two clades, namely clade 2b-a and clade 2a. A high-resolution analysis based on genome sequences of VCZ strains and cucurbit strains highlights six distinct clusters. VCZ strains belong to four of these six clusters: A and B are associated to clade 2b-a, and D and E are associated to clade 2a. Despite a common disease on zucchini (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*), VCZ strains induce different types of symptoms on other squashes (*Cucurbita pepo* subsp. *texana*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita maxima*) and have a different host range of cucurbit genotypes. Genome sequences were mined to recover genes that matched those clusters. Three largely distributed genes (*Psyr3420*, *Psyr4880*, and *Psyr3208*) were then selected to complete a novel MLSA scheme that can resolve clusters

		Strains	<i>avvE1</i>	<i>hopAE1</i>	<i>hopAZ1</i>	<i>hopAG1</i>	<i>hopAH1</i>	<i>hopBA1</i>	<i>hopI1</i>	<i>hopA1</i>	<i>hopAA1</i>	<i>hopH1</i>	<i>hopM1</i>	<i>hopZ1</i>	<i>hopBC1</i>	<i>hopAF1</i>	<i>hopR1</i>	<i>hopW1</i>	<i>hopZ5</i>	<i>hopBK1</i>	<i>hopAW1</i>	<i>hopC1</i>	<i>hopAR1</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopAX1</i>	<i>hopAF1</i>	<i>hopAU1</i>	<i>hopX2</i>	Total T3Es		
clade 2b-a	Cluster A	P12832																											18		
		P12854																												18	
		P12855																												18	
		P113																												18	
		P118																												18	
		P121																												18	
		P123																												18	
		P127																												18	
		P139																													18
		P22																													18
clade 2b-a	Cluster B	P12857																											16		
		13-140A																												16	
		13-C2																												16	
		14-32																												16	
		14-410																												16	
		14-Gil																												15	
		CC457																												16	
		Cluster C	ZUM3584																											17	
		clade 2a	Cluster E	B52121																											14
				ZUM3984																											
P89																														14	
P66																														14	
Cluster D	P78																													13	
	P87																													13	
	03-19A																													13	
	P73																													13	
	P77																													13	
Cluster F	200-1																													13	
	13-139B																												17		
Singleton 2b	13-429																												18		
	P108																												11		

Fig. 7. Set of type III effectors (T3Es) predicted in the genome sequences of vein clearing of zucchini (VCZ) strains and other strains isolated from cucurbits. Color blocks reflect presence of the T3E within a cluster (yellow, cluster A; orange, cluster B; blue, cluster C; green, cluster E; purple, cluster D; gray, cluster F; pink, singleton P108). White block means the absence of T3Es.





of strains pathogenic on cucurbits. The VCZ strains from each cluster share homogeneous T3E repertoires that are associated with pathogenicity features on cucurbit genotypes. Strains from cluster A have a narrow host range and are pathogenic on squashes (*Cucurbita* spp.), whereas VCZ strains from clusters B, D, and E and singleton P108 have a wide host range including squashes, cucumber, and melons. Because they have different host range extents, VCZ strain lineages represent different epidemiological risks in cucurbit-producing areas.

Comparative genomic analyses led to proposing a novel MLSA scheme and differential T3Es that distinguish various lineages of strains that are responsible for diseases on cucurbits. VCZ strains group in four main lineages, whereas a few strains remain isolated in the phylogeny. Other strains responsible for diseases on cucurbits that were previously characterized (Newberry et al. 2019) were included in our genomic analyses. Clearly, all these strains are distant from *P. amygdali* pv. *lachrymans* and cause different diseases. One lineage of VCZ strains (cluster A) presents a narrower host range than other groups, including zucchini, yellow straightneck, butternut, and pumpkin. The presence of a gene encoding AvrRpt2 and the absence of a gene encoding HopZ5 characterize this group of VCZ strains. This lineage includes most strains previously named *P. syringae* pv. *peponis* (Manceau et al. 2011) and is included in clade 2b-a, which is described as being the result of recombination events between *P. syringae* and *P. cerasi* (Newberry et al. 2019). The three other groups of VCZ strains (clusters B, D, and E) are distributed in clades 2a and 2b-a. Clade 2a corresponds to *P. cerasi* (Newberry et al. 2019). We show here that VCZ strains of these three groups are pathogenic not only on zucchini but also on yellow straightneck, butternut, pumpkins, cucumber, melons, and in some cases watermelon. These groups include also strains that were independently shown to induce angular leaf spot and bacterial leaf spot of watermelon, cantaloupe, and squash by Newberry et al. (2016, 2018, 2019). The presence of the gene encoding HopZ5 and the absence of the gene encoding AvrRpt2 in their genome sequences characterize these lineages. Taking into account that the diseases induced in zucchini by the four groups of strains and the singleton (P108<sub>2b-S</sub> in clade 2b corresponding to *P. syringae sensu stricto*) are similar, whereas the host range of cluster A is different from the one of clusters B, D, and E; that these strains are distributed over different species; and that we did not test on our cucurbit genotypes the pathotype strain of *P. syringae* pv. *syringae*, known to have a large host range, we cannot conclude that the four lineages truly form distinct pathovars. It should be noted that the singleton P108<sub>2b-S</sub> is phylogenetically close to *P. syringae* pv. *aptata*, which includes strains isolated from melons (Berge et al. 2014). Strain CFBP 5427 from this pathovar induces symptoms on squash, cucumber, and melons that are similar to those caused by the P108<sub>2b-S</sub> strain. The only differences are the inability of the *P. syringae* pv. *aptata* CFBP 5427 strain to induce stunting of zucchini plantlets with the seed soaking test and the susceptibility of watermelon to P108<sub>2b-S</sub> but not to CFBP 5427.

Specific T3Es could be used as genetic markers of differential host ranges of VCZ strains. In this study, we identified that the presence of *hopZ5* and absence of *avrRpt2* are common characteristics of strains from the three clusters that share a wide host range and are pathogenic on melons and cucumber. In contrast, cluster A strains have *avrRpt2* and lack *hopZ5* and are not pathogenic on these groups of genotypes. Further experimental work is necessary to decipher the role of these T3Es in host range extents. Interestingly, it was also shown that strains from clusters C and F harbor *hopZ5* and are pathogenic on squash, melon, and watermelon (Newberry et al. 2019). *HopZ5* was previously proposed to promote virulence among strains pathogenic on cucurbits and having different T3E repertoires (Newberry et al. 2019). Here we suggest that *hopZ5* could also be a good predictor of a wide host range on cucurbits. Cluster A strains (Ps711<sub>2b-A</sub> and

13-509A<sub>2b-A</sub>) harboring *avrRpt2* and missing *hopZ5* have been previously reported to be weakly pathogenic on squash, melon, and watermelon (Newberry et al. 2018, 2019). Their pathogenicity was evaluated on a yellow straightneck genotype, but strains were not tested on cucumber or on any other genotypes of squashes, including zucchini. Therefore, this weak pathogenicity on yellow straightneck for cluster A strains is consistent with the dried brown lesions we observed for strains P99<sub>2b-A</sub> and P79<sub>2b-A</sub> on yellow straightneck. Indeed, the dried lesions seemed less severe than the water-soaked lesions caused by strains of clusters B, D, and E and the singleton. The gene *avrRpt2* is commonly found in *P. syringae* pv. *tomato* strains (Almeida et al. 2009) and has been shown to promote pathogenicity by stimulating key regulators in auxin signaling pathways (Cui et al. 2013). This effector leads to HR-like necrosis in *A. thaliana* through the cognate RPS2 resistance gene (Pike et al. 2005). Apart from the main genetic clusters including VCZ strains, we also characterized a singleton (P108<sub>2b-S</sub>), which is pathogenic on all tested cucurbits and induces VCZ. P108<sub>2b-S</sub> is close to *P. syringae* pv. *aptata* strains in the phylogenetic analysis. This singleton has fewer T3Es (11 T3Es) than other VCZ strains. Eight T3Es (*avrE1*, *hopAA1*, *hopAE1*, *hopAZ1*, *hopAG1*, *hopAH1*, *hopBA1*, and *hopI1*) are common to all the VCZ strains and might be associated to pathogenicity on zucchini. It is also interesting to note that Newberry et al. (2016, 2019) characterized singletons from clade 2b and 2d isolated from diseased cucurbits. Previous studies also identified a potential large host range for strains from clade 2d (Monteil et al. 2016; Morris et al. 2019).

Not all VCZ strains were pathogenic on watermelon cultivar Livia because tested strains from clusters A (P99<sub>2b-A</sub> and P79<sub>2b-A</sub>) and D (P73<sub>2b-D</sub> and P77<sub>2b-D</sub>) did not induce any disease with the spray inoculation and induced HR-like necrosis when infiltrated in leaves. These results were also obtained with cultivar Troubadour (data not shown). Based on genome analysis, strains Ps711<sub>2b-A</sub> and 13-509A<sub>2b-A</sub> belong to cluster A, and strains 200-1<sub>2b-D</sub> and 03-19A<sub>2b-D</sub> belong to cluster D. Interestingly, these strains were previously tested with a similar spray inoculation and were shown to be weakly pathogenic or not pathogenic on watermelon cultivars Troubadour and Wrigley (Fig. 6B) (Newberry et al. 2016, 2017, 2019). These discrepancies on watermelon could be strain or test dependent. However, some effectors are associated to strains from clusters A and D that are weakly pathogenic or not pathogenic on watermelon because all possess complete genes of *hopH1* and *hopC1*, in contrast to other aggressive strains from clusters B, C, E, F, and singleton. This result is consistent with those previously reported (Newberry et al. 2019).

The use of several pathogenicity tests permitted a precise phenotypic characterization of strains responsible for VCZ. On zucchini, the cotyledon rubbing test successfully reproduces the typical symptoms (necroses on leaves and cotyledons, vein clearing, and stunting) observed in seedling-producing areas and caused by VCZ strains. The cotyledon rubbing test is quick and easy to perform, but it induces microinjuries on plantlets by trichome breaks and thus creates openings. For this reason, the cotyledon rubbing test is invasive and can produce biases to study bacterial strains' pathogenicity (Burdman et al. 2005; Klement et al. 1990). The seed soaking tests were appropriate to study VCZ strains on their host of origin and permitted to properly characterize strain aggressiveness. Seed soaking tests are consistent with VCZ strains being described as seedborne bacteria (Manceau et al. 2011). Seed soaking tests are commonly used to characterize aggressiveness of seedborne bacteria such as *A. avenae* subsp. *citrulli* on cucurbits (Burdman et al. 2005). Then, the spray inoculation method was used to simulate natural infection of leaves by pathogen and allowed bacterial entry through natural openings (Klement et al. 1990). This test was particularly relevant to finely characterize symptoms and host range. Finally, the HR test is an easy, fast, and efficient method to define host range of VCZ strains on different cucurbit genotypes. Host incompatibility produces an HR-like reaction on leaves 48 h





postinoculation, whereas host compatibility produces spreading water-soaked necrosis.

The strains responsible for VCZ were isolated from plantlets issued from zucchini seed lots produced in distant regions overtime. Only a few studies have dealt with *P. syringae* strains transmitted by cucurbit seeds (Dutta et al. 2014; Meng et al. 2016; Shila et al. 2013). Strains from *P. syringae* pv. *aptata*, *P. syringae* pv. *syringae*, and *P. amygdali* pv. *lachrymans* were reported to be seed disseminated, and efforts to develop seed detection tests contribute to improved pathogen control and disease management. We identified specific markers (*Psy3420*, *Psy4880*, and *Psy3208*) that can be used to design specific VCZ strain primers. A specific detection tool is indeed needed to conduct epidemiological studies of VCZ in worldwide zucchini seed production areas. Typing *P. syringae* isolates from diseased cucurbits with the new MLSA scheme would give insight into worldwide dissemination of strains and origin of epidemics. The gain of knowledge on VCZ strains and the survey of epidemics are essential steps to implement efficient management of the various VCZ lineages, which do not represent the same risk as a consequence of their different host range.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Portier and C. Dutrieux (CIRM-CFBP) for strain preservation; SFR Quasav and the ANAN platform, in Angers, France, for sequencing facilities; and M. Barret, A. Sarniguet, M. Simonin, and three anonymous reviewers for their very fruitful reviews of the manuscript.

#### LITERATURE CITED

- Almeida, N. F., Yan, S., Lindeberg, M., Studholme, D. J., Schneider, D. J., Condon, B., et al. 2009. A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:52-62.
- Baltrus, D., Honour, C., and Guttman, S. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Pathol.* 18:152-168.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant S. R., Jones, C. D., and Dangel, J. L. 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 7:e1002132.
- Baltrus, D. A., Yourstone, S., Lind, A., Guilbaud, C., Sands, D. C., Jones, C. D., Morris, C. E., and Dangel, J. L. 2014. Draft genome sequences of a phylogenetically diverse suite of *Pseudomonas syringae* strains from multiple source populations. *Genome Announc.* 2:e01195-13.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., and Morris, C. E. 2014. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS One* 9:e105547.
- Bradbury, J. F. 1986. *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew, Richmond, UK.
- Briand, M., Bouzid, M., Huanault, G., Legéay, M., Saux, M. F.-L., and Barret, M. 2019. A rapid and simple method for assessing and representing genome sequence relatedness. *bioRxiv* 569640.
- Bull, C. T., Boer, S. H. D., Denny, T. P., Firao, G., Saux, M. F.-L., Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead, D. E., and Takikawa, Y. 2008. Demystifying the nomenclature of bacterial plant pathogens. *J. Plant Pathol.* 90:403-417.
- Bull, C. T., Clarke, C. R., Cai, R., Vinatzer, B. A., Jardini, T. M., and Koike, S. T. 2011. Multilocus sequence typing of *Pseudomonas syringae* sensu lato confirms previously described genomospecies and permits rapid identification of *P. syringae* pv. *coriandricola* and *P. syringae* pv. *apii* causing bacterial leaf spot on parsley. *Phytopathology* 101:847-858.
- Bull, C. T., and Koike, S. T. 2015. Practical benefits of knowing the enemy: modern molecular tools for diagnosing the etiology of bacterial diseases and understanding the taxonomy and diversity of plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:157-180.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, physiological, and host-range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89:1339-1347.
- Corpet, F., Gouzy, J., and Kahn, D. 1999. Browsing protein families via the 'Rich Family Description' format. *Bioinformatics* 15:1020-1027.
- Cottret, L., Rancurel, C., Briand, M., and Carrere, S. 2018. Family-Companion: Analyze, visualise, browse, query and share your homology clusters. *Bioinformatics* 266742.
- Cui, F., Wu, S., Sun, W., Coaker, G., Kunkel, B., He, P., and Shan, L. 2013. The *Pseudomonas syringae* type III effector *avrRpt2* promotes pathogen virulence via stimulating *Arabidopsis* auxin/indole acetic acid protein turnover. *Plant Physiol.* 162:1018-1029.
- Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M. A., Manceau, C., and Vanneste, J. L. 2015. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathol.* 64:582-596.
- Denacé, N., Briand, M., Gaborieau, R., Gaillard, S., and Jacques, M.-A. 2019. Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 20:239.
- Dillon, M. M., Almeida, R. N. D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., and Guttman, D. S. 2019b. Molecular evolution of *Pseudomonas syringae* type III secreted effector proteins. *Front. Plant Sci.* 10:418.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., and Guttman, D. S. 2019a. Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20:3.
- Dutta, B., Gitaitis, R., Agarwal, G., Coutinho, T., and Langston, D. 2018. *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PLoS One* 13:e0208271.
- Dutta, B., Ingram, T., Gitaitis, R. D., Langston, D. B., Brennenman, T., Webster, T. M., and Davis, R. F. 2014. First report of bacterial blight of sugar beet caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Georgia, USA. *Plant Dis.* 98:1423.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A., and Schroth, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59:153-168.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP: Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics* 5:164-166.
- Feng, F., and Zhou, J.-M. 2012. Plant-bacterial pathogen interactions mediated by type III effectors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:469-476.
- Ferrante, P., and Scortichini, M. 2015. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics. *Plant Pathol.* 64:51-62.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. 2017. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis. *Front. Microbiol.* 8:2422.
- Hopkins, D., and Schenck, N. 1972. Bacterial leaf spot of watermelon caused by *Pseudomonas lachrymans*. *Phytopathology* 62:542.
- Hwang, M. S. H., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., and Guttman, D. S. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5182-5191.
- Jacques, M.-A., Denance, N., Legendre, B., Morel, E., Briand, M., Mississippi, S., Durant, K., Olivier, V., Portier, P., Pliakoff, F., and Cruzillat, D. 2016. New coffee plant-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:1556-1568.
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., Quillevere, A., Audusseau, C., Olivier, V., Grimault, B., and Mathis, R. 2012. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3388-3402.
- Kaluza M., Willems, A., Pothier, J. F., Ruedelli, M., Sobiczewski, P., and Pulawska, J. 2016. *Pseudomonas cerasi* sp nov (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Syst. Appl. Microbiol.* 39:370-377.
- Klement, Z., Rudolph, K., and Sands, D. C. 1990. *Methods in Phytopathology*. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. 2005. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *J. Bacteriol.* 187:6258-6264.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., et al. 2012. SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler [published correction appears in *GigaScience* 2015;4]. *Giga-Science* 1:18.
- Manceau, C., Gironde, S., Briand, B., and Lybeert, H. 2011. Means and Methods for Detecting and Identifying a Novel Bacterium Responsible for Phyto-sanitary Disorders in Plants (Zucchini) and Novel Resistant Plants. Patent #WO2011003984. World Intellectual Property Organization, Geneva, Switzerland.
- Martin-Sanz, A., Perez de la Vega, M., Murillo, J., and Caminero, C. 2013. Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from pea are phylogenetically and pathogenically diverse. *Phytopathology* 103:673-681.

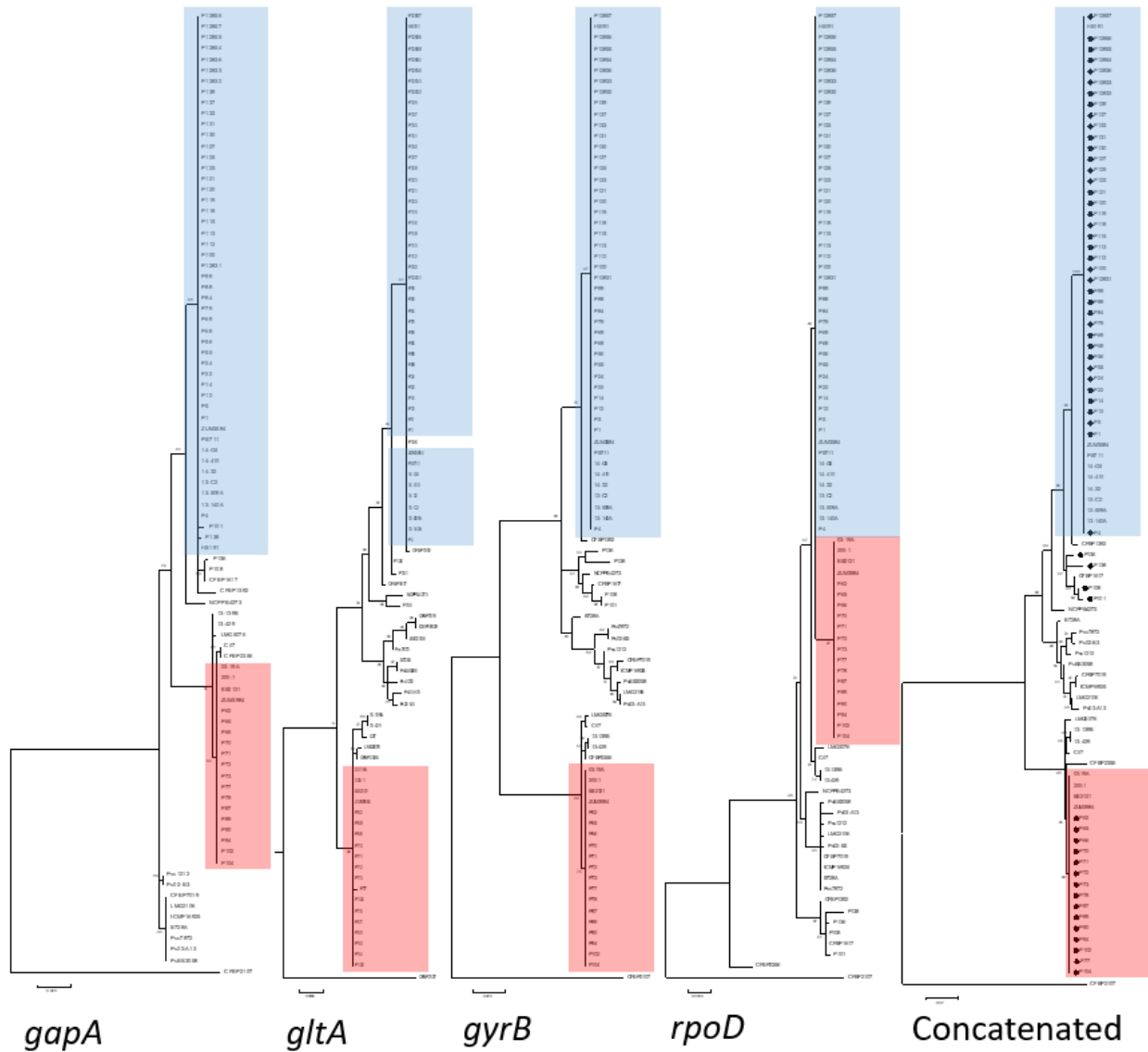




- Meng, X., Chai, A., Chen, L., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., and Li, B. 2016. Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. *Can. J. Plant Pathol.* 38:296-306.
- Monteil, C. L., Cai, R., Liu, H., Llongtop, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., Morris, C. E., and Vinatzer, B. A. 2013. Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytol.* 199:800-811.
- Monteil, C. L., Yahara, K., Studholme, D. J., Mageiros, L., Méric, G., Swingle, B., Morris, C., Vinatzer, B., and Sheppard, S. 2016. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microbiol. Genom.* 21:e000089.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R., and Pitrat, M. 2000. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology* 90:636-646.
- Morris, C. E., Lamichhane, J. R., Nikolic, I., Stanković, S., and Moury, B. 2019. The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. *Phytopathol. Res.* 1:4.
- Newberry, E. A., Babu, B., Roberts, P. D., Dufault, N. S., Goss, E. M., Jones, J. B., and Paret, M. L. 2018. Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida. *Plant Dis.* 102:511-518.
- Newberry, E. A., Ebrahim, M., Timilsina, S., Zlatković, N., Obradović, A., Bull, C. T., Goss, E. M., Huguet-Tapia, J. C., Paret, M. L., Jones, J. B., and Potnis, N. 2019. Inference of convergent gene acquisition among *Pseudomonas syringae* strains isolated from watermelon, cantaloupe, and squash [published correction appears in *Front. Microbiol.* 2019]. *Front. Microbiol.* 10:270.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., Bouzar, H., Goss, E. M., Jones, J. B., Bull, C. T., and Paret, M. L. 2016. Angular leaf spot of cucurbits is associated with genetically diverse *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Dis.* 100:1397-1404.
- Newberry, E. A., Ritchie, L., Babu, B., Sanchez, T., Beckham, K. A., Jones, J. B., Freeman, J. H., Dufault, N. S., and Paret, M. L. 2017. Epidemiology and management of bacterial leaf spot on watermelon caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 101:1222-1229.
- Paris, H. S. 1989. Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*). *Econ. Bot.* 43:423-443.
- Paris, H. S., Doron-Faigenboim, A., Reddy, U. K., Donahoo, R., and Levi, A. 2015. Genetic relationships in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as viewed with high frequency oligonucleotide-targeting active gene (HFO-TAG) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 62:1095-1111.
- Pike, S. M., Zhang, X.-C., and Gassmann, W. 2005. Electrophysiological characterization of the *Arabidopsis avrRpt2*-specific hypersensitive response in the absence of other bacterial signals. *Plant Physiol.* 138:1009-1017.
- Sallet, E., Gouzy, J., and Schiex, T. 2014. EuGene-PP: A next-generation automated annotation pipeline for prokaryotic genomes. *Bioinformatics* 30:2659-2661.
- Sarkar, S. F., and Guttman, D. S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1999-2012.
- Sedighian, N., Shams-Bakhsh, M., Osdaghi, E., and Khodaygan, P. 2014. Etiology and host range of bacterial leaf blight and necrosis of squash and muskmelon in Iran. *J. Plant Pathol.* 96:507-514.
- Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G., and Meah, M. B. 2013. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits. *Univers J. Agr. Res.* 1:1-8.
- Shimodaira, H., and Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* 16:1114.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., and Jackson, R. W. 2011. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:652-680.
- Stomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Bartoszewski, G., and Niemirowicz-Szczytt, K. 2015. Genetic and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* strains isolated from cucurbits. *Eur. J. Plant Pathol.* 141:1-14.
- Stomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Oskiera, M., Schollenberger, M., Niemirowicz-Szczytt, K., and Bartoszewski, G. 2018. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar. *Eur. J. Plant Pathol.* 151:663-676.
- Tian, Y., Zhao, Y., Chen, X., Dai, Y., Zhao, W., Hu, B., and Walcott, R. 2017. Evidence for a novel phylotype of *Pseudomonas syringae* causing bacterial leaf blight of cantaloupe in China. *Plant Dis.* 101:1746-1752.
- Tymon, L. S., and Inglis, D. A. 2017. Identification and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* genomospecies 1 phylogroup 2b causing leaf spots and fruit warts on cucurbits in western Washington, U.S. *J. Plant Pathol.* 99:713-722.
- Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S. Y. 2018. *Pseudomonas syringae*: What it takes to be a pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:316-328.
- Young, J. M. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J. Plant Pathol.* 92:S1.5-S1.14.
- Zerbino, D. R., and Birney, E. 2008. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18:821-829.



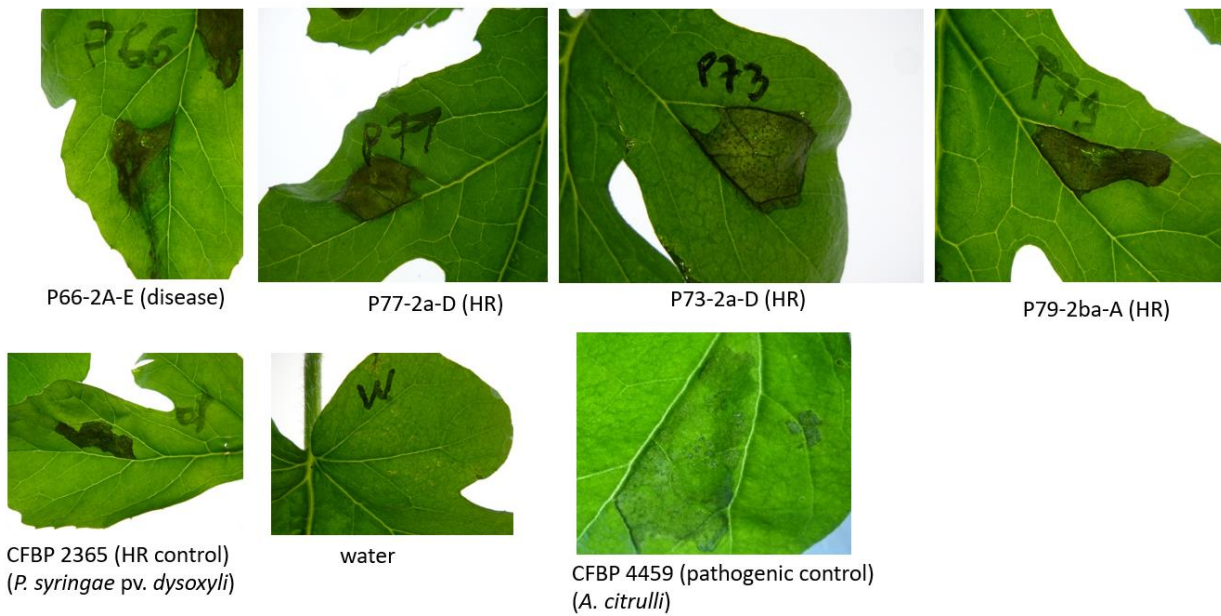
## Données complémentaires



**Supplementary fig. 1**

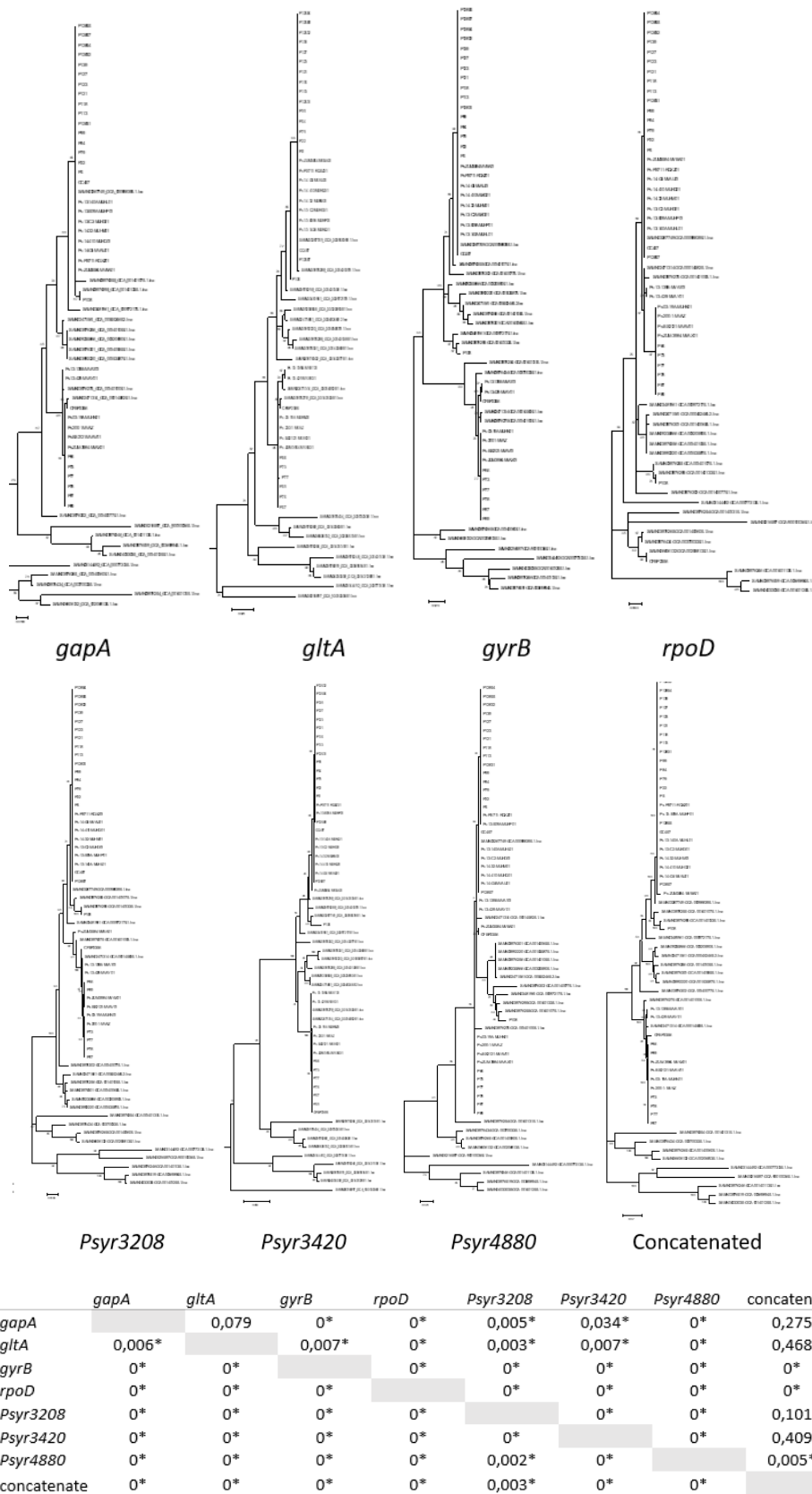
Phylogenies built on four individual housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB* and *rpoD*) and the concatenated dataset. Maximum-likelihood (ML) trees were generated with MEGA 7 (Kumar et al. 2016) using the Tamura-Nei model with gamma distributed with invariant sites (G+I), and 1000 bootstrap replicates. Blue color represents the clade 2b-a and red color the cucurbit clade 2a. P values determined using the Shimodaira-Hasegawa test for congruence of tree topologies run on each tree based on four housekeeping genes, individually and the concatenated dataset. Values an asterisk are significantly depart from the hypothesis of congruency.

	<i>gapA</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>	Concat
<i>gapA</i>		0.006	0.000*	0.000*	0.002*
<i>gltA</i>	0.011*		0.000*	0.000*	0.028*
<i>gyrB</i>	0.011*	0.006*		0.000*	0.535
<i>rpoD</i>	0.000*	0.000*	0.000*		0.000*
Concat	0.027*	0.027*	0.269	0.003*	



**Supplementary fig. 2.** Response of watermelon (*C. lanatus* cv. Livia) to infiltration of *P. syringae* VCZ strains P66, P73, P77 and P79





**Supplementary fig. 3.** Phylogenies built on seven individual genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3208*, *Psyr3420*, *Psyr4880*) and the concatenated sequences. Maximum-likelihood (ML) trees were generated with MEGA 7 (Kumar et al. 2016) using the Tamura-Nei model with gamma distributed with invariant sites (G+I), and 1000 bootstrap replicates. P values determined using the Shimodaira-Hasegawa test for congruence of tree topologies run on each tree based on four housekeeping genes, individually and the concatenated dataset. Values an asterisk are significantly depart from the hypothesis of congruency.



*Cucumis melo* var. *cantalupsis* cv. Perseus



*Citrullus lanatus* cv. Livia



*Cucumis sativus* cv. Dahab



*Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Helios



*Cucumis melo* var. *galia* cv. Citrex

**Supplementary fig. 4.** Response of melons, cucumber and watermelon to infiltration of strain P12857, responsible for VCZ from clade 2b-a.

**Supplementary table.1.** List of strains and their characteristics and list of genome sequences used in this study.

Strains used in MLSA in addition to VCZ strains				
Strains	Origin	Host	Year of Isolation	Reference
<b>Cucurbit strains</b>				
13-C2	Florida	Watermelon	2013	Newberry et al. 2019
13-140A	Florida	Watermelon	2013	Newberry et al. 2019
13-509A	Florida	Squash	2013	Newberry et al. 2019
13-139B	Florida	Watermelon	2013	Newberry et al. 2019
13-429	Florida	Watermelon	2013	Newberry et al. 2019
14-410	Florida	Watermelon	2014	Newberry et al. 2019
14-32	Florida	Watermelon	2014	Newberry et al. 2019
14-Gil	Florida	Watermelon	2014	Newberry et al. 2019
03-19A	Florida	Cantaloupe	2003	Newberry et al. 2019
200-1	Georgia	Squash	2000	Newberry et al. 2019
BS2121	California	Squash	2006	Newberry et al. 2019
ZUM3584	Italy	Squash	2005	Newberry et al. 2019
ZUM3984	China	Squash	2008	Newberry et al. 2019
PS711	Serbia	Squash	2013	Newberry et al. 2019
Ps02-B3	USA	Watermelon	2002	Newberry et al. 2016
Ps03-A13	USA	Cantaloupe	2003	Newberry et al. 2016
PsBS3058	USA	Watermelon	2011	Newberry et al. 2016
<b><i>P. syringae</i> species complex</b>				
B728A (pv. <i>syringae</i> )	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	na	Feil et al. 2005
CFBP 1390 <sup>PT</sup> (pv. <i>phaseolicola</i> )	Canada	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1949	Gardan et al. 1992
CFBP 1392 <sup>T</sup> (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	1951	Sabet 1950
CFBP 1617 <sup>PT</sup> (pv. <i>aptata</i> )	USA	<i>Beta vulgaris</i>	1959	Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 1694 <sup>PT</sup> (pv. <i>tagetis</i> )	Zimbabwe	<i>Tagetes erecta</i>	1972	Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2107 <sup>T</sup> ( <i>P. viridiflava</i> )	Switzerland	<i>Phaseolus sp</i>	1927	Dowson 1939
CFBP 2212 <sup>PT</sup> (pv. <i>tomato</i> )	UK	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1960	Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2216 <sup>PT</sup> ( <i>P. coronafaciens</i> )	UK	<i>Avena sativa</i>	1958	Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2341 <sup>PT</sup> (pv. <i>cannabina</i> )	Hongria	<i>Cannabis sativus</i>	1957	Bull et al. 2010
CFBP 2351 <sup>PT</sup> (pv. <i>morsprunorum</i> )	USA	<i>Prunus domestica</i>	na	Young, Dye et Wilkie 1978
CFBP 2353 <sup>PT</sup> (pv. <i>theae</i> )	Japon	<i>Thea sinensis</i>	1970	Goto 1970
CFBP 2356 <sup>PT</sup> (pv. <i>dysoxyl</i> )	NZ	<i>Dysoxylum spectabile</i>	1949	Dye 1949
Cit7 ( <i>P. syringae</i> )	na	<i>Citrus sinensis</i>	na	Lindow 1987
HS191 (pv. <i>syringae</i> )	Australia	<i>Panicum miliaceum</i>	1969	Gross 1977
ICMP 16925 <sup>PT</sup> (pv. <i>solidagae</i> )	Japon	<i>Solidago altissima</i>	na	Sato et al. 2001
LMG 2106 <sup>PT</sup> (pv. <i>aceris</i> )	USA	<i>Acer sp.</i>	na	Ark 1939
LMG 5076 <sup>PT</sup> (pv. <i>papulans</i> )	Canada	<i>Malus pumila</i>	1973	Dhavantari 1973
CFBP 7019 <sup>PT</sup> ( <i>P. congelans</i> )	Germany	<i>Poaceae</i>	1994	Behrendt 1994
NCPPB 4273 <sup>PT</sup> (pv. <i>coryli</i> )	Italia	<i>Corylus avellana</i>	1995	Scortichini et al. 2005
Pss 1212 (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Pisum sativum</i>	na	Baltrus et al. 2014
Pss 7872 (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Prunus domestica</i>	2000	Nowell et al. 2016
NM002 (pv. <i>lachrymans</i> )	China	<i>Cucumis sativus</i>	1984	Li et al. 2018
CFBP 4913 ( <i>P. viridiflava</i> )	NZ	<i>Actinidia deliciosa</i>	na	Visnousky et al. 2016

**Strains used for genomic sequencing analyses in addition to VCZ strains**

Strain	Accession
13-C2	MUHO00000000
13-140A	MUHL00000000
13-509A	MUHP00000000
13-139B	MVAT00000000
13-429	MVAY00000000
14-410	MUHQ00000000
14-32	MUHM00000000
14-Gil	MVAU00000000
03-19A	MUHN00000000
200-1	MVAZ00000000
BS2121	MVAV00000000
ZUM3584	MVBA00000000
ZUM3984	MVAX00000000
PS711	RQXZ01000000
<i>Pseudomonas cerasi</i>	SAMEA3894894

(A suivre ...)

<i>Pseudomonas congelans</i>	SAMN03976302
<i>Pseudomonas congelans</i>	SAMN05216596
<i>Pseudomonas</i> sp BS3759	SAMN05444502
<i>Pseudomonas</i> sp BS3767	SAMN05444503
<i>Pseudomonas</i> sp ICMP10191	SAMN04102816
<i>Pseudomonas</i> sp NFACC10-1	SAMN03159505
<i>P. syringae</i> CC457	SAMN02471568
<i>P. syringae</i>	SAMN02469653
<i>P. syringae</i>	SAMN02469652
<i>P. syringae</i>	SAMN02469654
<i>P. syringae</i> CC1458	SAMN02471556
<i>P. syringae</i> CC1543	SAMN02471554
<i>P. syringae</i> CC440	SAMN02471571
<i>P. syringae</i> CC94	SAMN02471551
<i>P. syringae</i> Cit7	SAMN02471314
<i>P. syringae</i>	SAMN02952971
<i>P. syringae</i>	SAMN04102817
<i>P. syringae</i>	SAMN04102819
<i>P. syringae</i>	SAMN04102820
<i>P. syringae</i>	SAMN02404616
<i>P. syringae</i> pv <i>aceris</i>	SAMN03737347
<i>P. syringae</i> pv <i>aceris</i>	SAMN03976301
<i>P. syringae</i> pv <i>aceris</i>	SAMN02471316
<i>P. syringae</i> pv <i>aptata</i>	SAMN03976295
<i>P. syringae</i> pv <i>aptata</i>	SAMN02471325
<i>P. syringae</i> pv <i>atrofaciens</i> _LMG_5095	SAMN02687465
<i>P. syringae</i> pv <i>atrofaciens</i>	SAMN03976252
<i>P. syringae</i> pv <i>atrofaciens</i> str_DSM_50255	SAMN02471577
<i>P. syringae</i> pv <i>avellanae</i>	SAMN02471968
<i>P. syringae</i> pv <i>avellanae</i>	SAMN02471963
<i>P. syringae</i> pv <i>coryli</i>	SAMN03976285
<i>P. syringae</i> pv <i>coryli</i>	SAMN03481961
<i>P. syringae</i> pv <i>japonica</i>	SAMN02471312
<i>P. syringae</i> pv <i>lapsa</i>	SAMN03774723
<i>P. syringae</i> pv <i>lapsa</i>	SAMN03976249
<i>P. syringae</i> pv <i>panici</i>	SAMN02472179
<i>P. syringae</i> pv <i>papulans</i>	SAMN03328960
<i>P. syringae</i> pv <i>papulans</i>	SAMN03976275
<i>P. syringae</i> pv <i>papulans</i>	SAMN03992216
<i>P. syringae</i> pv <i>pisi</i>	SAMN02471313
<i>P. syringae</i> pv <i>pisi</i>	SAMN02471574
<i>P. syringae</i> pv <i>solidagae</i>	SAMN03976256
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _1212	SAMN02471561
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _642	SAMN02472094
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _B301D	SAMN03267739
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _B64	SAMN02472031
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _B728a	SAMN02604347
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _CRAFRU11	SAMN03482996
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _CRAFRU12	SAMN03482997
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _FF5	SAMN00002873
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _HS191	SAMN03267749
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i> _PD2774	SAMN04102823
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN02870642
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03328983
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03418705
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03837777
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03837778
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03976255
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03992218
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03992219
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03992220
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN03992221
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN05182240
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN05182452
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN02472030
<i>P. syringae</i> pv <i>syringae</i>	SAMN02585144
<i>P. syringae</i>	SAMN02929202
<i>P. syringae</i>	SAMN03104821
<i>P. syringae</i>	SAMN05421724
<i>P. syringae</i>	SAMN05444062

(A suivre ...)

(Suite Supplementary table 1)

P. syringae	SAMN05444063
P. syringae	SAMN05444065
P. syringae	SAMN05444505
P. syringae_BS3827	SAMN05444507
P. syringae_UB303	SAMN02471550
P. syringae_UMAF0158	SAMN04053740
P. syringae_USA011	SAMN02471567
P. viridiflava CFBP 4913	SAMN03976434
P. syringae pv. dysoxylis CFBP 2356	VLHW00000000

---

Supplementary Table 2. Plantlets evaluation for the cotyledon rubbing test and seed soaking test at 10E7 cfu/mL.

		Cotyledon rubbing								Seed soaking at 10E7 cfu/mL							
		<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Opale				<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Tosca				<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Opale				<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i> cv. Tosca			
strains		Stunting	Cotyledon necrosis	Leaf necrosis	Vein clearing	Stunting	Cotyledon necrosis	Leaf necrosis	Vein clearing	Stunting	Cotyledon necrosis	Leaf necrosis	Vein clearing	Stunting	Cotyledon necrosis	Leaf necrosis	Vein clearing
Clade 2b-a	P5																
	P22	Yellow			Green	Yellow			Green	Green			Green	Yellow			Green
	P79	Yellow			Green									Yellow			
	P84																
	P99													Yellow			
	P127									Yellow				Green			
	P139																Green
	P12832													Green			
	P12854													Yellow		Green	
	P12855																Green
	P12857												Green				
Clade 2a	P66																
	P73																
	P77																
	P78					Yellow											
	P87																
	P89																
2b	P108				Yellow								Yellow			Green	
Controls	CFBP5427	Yellow				Yellow				Yellow				Yellow			
	CFBP6364		Yellow				Yellow										
	CFBP2356	Green				Green				Green				Green			
	W	Green				Green				Green				Green			

Colors are given a following for stunting, cotyledon necrosis and leaf necrosis:

- Red when more than 80% of plantlets tested show the given symptom
- Orange when 40 to 79 % of plantlets tested show the given symptom
- Yellow when 1 % to 39 % of plantlets tested show the given symptom
- Green when none of the plantlet tested show a given symptom

For the vein clearing, red color is given when this short-live symptom had been observed at least once, and green color when it had been never observed.







Supplementary table.3. ANIb-values calculated on genomic sequences

Tableau très large, envoi sur demande par e-mail : [lacault.caroline@gmail.com](mailto:lacault.caroline@gmail.com)



## **CHAPITRE 3.**

# **Développement d'outils pour la détection et l'identification des souches responsables de la nervation blanche de la courgette.**



## Développement d'outils pour la détection et l'identification des souches responsables de la nervation blanche de la courgette.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la nervation blanche de la courgette était causée par différentes lignées génétiques de *P. syringae* appartenant au phylogroupe 2. Au sein des lignées, différents clusters ont été mis en évidence et contenaient des souches à gamme d'hôtes étroite (cluster A) ou large au sein des Cucurbitacées (clusters B, D et E) en lien avec leurs répertoires d'ET3. Une souche du clade 2b, la seule de ce groupe à avoir été testée, a également été considérée responsable de la nervation blanche de la courgette. Les analyses de génomique comparative ont permis d'identifier des marqueurs phylogénétiques et des gènes codant des ET3 discriminant les clusters de souches. Nous avons identifié trois gènes largement distribués chez les *P. syringae* (type gène de ménage) pouvant compléter le schéma MLSA existant afin de permettre un typage plus fin des souches en adéquation avec ces regroupements en clusters.

Dans le chapitre 3 nous appliquons ce schéma MLSA à 7 gènes à la totalité des souches de notre collection et proposons à cette fin les amorces et conditions PCR adaptées. Ce travail a permis de mettre en évidence un plus grand nombre de souches dans les clades 2b et 2d. Nous les avons caractérisées par leur pouvoir pathogène. A partir d'analyses génomiques comparatives, des séquences marqueurs des différents groupes d'intérêts ont été identifiées et ont servi de base pour le design de différents outils moléculaires de détection et d'identification des souches. Ces outils, tests PCR et q-PCR multiplex, permettent la détection et l'identification des souches responsables de la nervation blanche et les souches phytopathogènes de la courgette appartenant aux clades 2b et 2d. Le test q-PCR multiplex permet aussi la quantification des bactéries retrouvées dans des lots de semences de courgette.

Ces travaux sont présentés sous la forme d'un article « Development of tools to detect and identify strains belonging to the *Pseudomonas syringae* species complex responsible for vein clearing of zucchini » qui sera très prochainement soumis pour publication au journal « Frontiers in Plant Science ».

Implication personnelle : J'ai participé à l'élaboration du protocole expérimental. Je me suis occupée de l'analyse MLSA, j'ai réalisé les essais de pouvoir pathogène et j'ai mis au point la q-PCR multiplex *in silico* et *in vitro*. J'ai participé à l'évaluation *in vitro* des autres couples d'amorces PCR. J'ai participé à la rédaction de l'article scientifique.



Frontiers in Plant Science

Development of tools to detect and identify strains belonging to the *Pseudomonas syringae* species complex responsible for vein clearing of zucchini

Lacault C, M Briand, M-A Jacques, A Darrasse

Key words: diagnosis, detection test, qPCR, Taqman, *Cucurbita pepo*, seed, seedborne disease, MLSA

## Introduction

Vein clearing (VCZ) is a bacterial disease that affects young plants of zucchini (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*), leading to plantlet deformations, water-soaked and necrotic spots on cotyledons and leaves, vein clearing of first leaves, and stunting, but no symptoms have been so far reported on adult field-grown plants (Manceau et al. 2011; Lacault et al. 2020). VCZ is a seed-transmitted disease, as a clear link has been established between contaminated seeds and disease outbreaks in nurseries and seed infection negatively impacts germination rate of seed lots (Manceau et al. 2011).

The causal agents of VCZ belong to the *Pseudomonas syringae* species complex (Lacault et al. 2020), as do strains leading to bacterial leaf spots of adult plants of watermelon and other cucurbits (Newberry et al. 2019). *P. syringae* species complex (Gomila et al. 2017) includes bacteria that cause serious epidemics on woody plants and annual crops (for reviews Lamichhane et al. 2014; 2015) but also many strains that are present in the environment, some of which being phytopathogenic (Morris et al. 2013). Taxonomy of the *P. syringae* species complex has been revisited with the description of 13 phylogroups (PG) subdivided in clades (Berge et al. 2014) and 19 phylogenomic species have been proposed (Gomila et al. 2017). Comparative genomics of strain collections has improved the knowledge of structure and evolution of this species complex highlighting impacts of recombination and horizontal gene transfer events. Homologous recombination blurs boundaries of some species (Dillon et al. 2019b). Based on former studies that identified and characterized different functions involved in pathogenicity, i.e. toxins, type three secretion systems (T3SSs) and repertoires of type three effectors (T3Es), comparative genomics allows to discriminate bacteria with different behaviors, such as specialized pathogens with a canonical T3SS, numerous T3Es and few toxins from more generalist ones with fewer T3Es but more toxins; some strains also lack a canonical T3SS and are mostly non-pathogenic (Cai et al. 2011; Demba-Diallo et al. 2012; Marcelletti and Scortichini 2014; Monteil et al. 2016; Nowell et al. 2016; Baltrus et al. 2018; Xin et al. 2018; Dillon et al. 2019a; Dillon et al. 2019b; Newberry et al. 2019; Ruinelli et al. 2019).

VCZ strains are genetically diverse as genome sequence analysis reveals that these strains are distributed in four clusters of the *P. syringae* species complex (Lacault et al. 2020). Clusters A and B belong to the clade 2ba, which is issued from homologous recombination between clades 2a and 2b (Newberry et al. 2019; Lacault et al. 2020). Clusters D and E belong to clade 2a corresponding to *P. cerasi* (Lacault et al. 2020). These clusters also encompass strains that are pathogenic on other cucurbits, which share, inside a same cluster, ANIb values with VCZ strains as high as those observed in-between two VCZ strains (Newberry et al. 2019; Lacault et al. 2020). Two closely related clusters, clusters C and F, group strains that have been sampled from watermelon, cantaloupe and squashes in the USA (Newberry et al. 2019), but not from zucchini (Lacault et al. 2020). A new MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) scheme has been proposed to type strains according to these groups and facilitate the analysis of large strain collections (Lacault et al. 2020). It includes to the previously available scheme based on



Table 1. Phylogenetic position of bacterial strains used in this study and results of detection assays

Strain	Species <sup>1</sup> / pathovar	Host	country	Year	MLSA group <sup>2</sup> /cluster <sup>3</sup>	identification by PCRs										Tetraplex Taqman q-PCR <sup>6</sup>				Taqman q2bw	
						clusters <sup>4</sup>										q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d		
						A	B	C	D	E	F	V2a	V2ba	2bs	2b						2d
VCZ strains isolated from seed lots (Lacault et al. 2020)																					
CFBP 8693 (P99)	<i>P. syringae</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	France	2005	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
P12832	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2006	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12854	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2002	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12855	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Chile	2007	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P113	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Thailand	2011	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P118	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P121	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Chile	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P123	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P127	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	India	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P139	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2015	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P22	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	USA	2009	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P5	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2008	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P79	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2010	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P84	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2010	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12831	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P112	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Chile	2011	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P115	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2011	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P119	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2006	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P120	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P125	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12833	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12856	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P130	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Thailand	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P131	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P133	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Thailand	2013	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P137	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2014	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P24	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2008	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P4	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P68	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	USA	2010	PG2ba/A	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P55	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	Chile	2009	PG2ba/B	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P56	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	na	2009	PG2ba/B	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	nd
P12857	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2007	PG2ba/B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	w
P1	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	nd
P12836	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2005	PG2ba/B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	nd
P14	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	na	2008	PG2ba/B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	nd
P69	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	USA	2010	PG2ba/B	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	nd
P88	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	China	2011	PG2ba/C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P100	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	na	2011	PG2ba/C	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
P77	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	France	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
P73	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	USA	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P78	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	France	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P87	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	China	2011	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P102	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2011	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P62	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	France	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P70	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	Thailand	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P71	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd

continued on following page



four housekeeping genes (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoB*, Hwang et al., 2005) three largely distributed genes (P syr3420, P syr4880 and P syr3208).

The various VCZ clusters of strains have different host range extents. VCZ strains from cluster A are characterized by a narrow host range of cucurbits that is limited to the genus *Cucurbita*. All the other VCZ strains have a wider cucurbit host range, affecting squash (*Cucurbita* sp.) but also melons (*Cucumis melo*), cucumbers (*Cucumis sativus*) and sometimes watermelons (*Citrullus lanatus*) (Lacault et al. 2020; Newberry et al. 2019). The extent of these host ranges is consistent with their repertoire of T3Es. In particular, cluster A strains, having the narrowest host range, are characterized by the presence of *avrRpt2*, while the clusters with a wider host range harbor *hopZ5*. Besides these main clusters, a few strains isolated from zucchini seed lots are scattered in the clades 2b (the *P. syringae* sensu Gomila et al. 2017) and 2d (the new genomic species A proposed by Gomila et al. 2017) (Lacault et al. 2020). One isolated 2b strain causing symptoms on zucchini is genetically close to clade-2b strains belonging to the pathovars *aptata* and *syringae* (Lacault et al. 2020), which are reported to be pathogenic on cantaloupe and squashes (Morris et al. 2000; Langstone et al. 2003; Sedighian et al. 2014). Clade-2d strains isolated from watermelon and cantaloupe plants in the USA and France, are rather aggressive on their isolation hosts (Berge et al. 2014; Newberry et al. 2016), and in contrast less aggressive on squashes (Newberry et al. 2016). Squash encompasses various cucurbit species such as *Cucurbita moschata*, *C. maxima* and *C. pepo*, which zucchini belongs to (Paris, 1989). The pathogenicity of Clade-2d strains, whatever their host of isolation, has not been so far determined on zucchini and hence their role in VCZ is unknown.

Seed testing is one of the most efficient means to control seedborne bacterial diseases and requires specific and sensitive detection tools to detect pathogenic bacteria among a variety of microorganisms, including look-alikes or closely related strains that are not pathogenic, but are seedborne (Jacques et al. 2012). Currently, seed-associated plant pathogenic bacteria are mainly detected using PCR-based tests, due to their ease of use and specificity. A large range of PCR-based detection and identification tools targeting different phylogenetic groups of the *P. syringae* species complex have been developed (Guilbaud et al. 2016; Borschinger et al. 2016), as were PCR tests targeting genes encoding toxins and other pathogenicity factors (Bultreys and Gheysen 1999; Bereswill et al. 1994; Prosen et al. 1993; Chen et al. 2020; Meng et al. 2014; Galleli et al. 2014). A qPCR test targeting *syIC* was designed to detect VCZ strains (Manceau et al. 2011). Indeed, *syIC* is one of the genes encoding the non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) responsible for syringolin synthesis (Amrein et al. 2004). The syringolin biosynthesis genes are widely distributed in phylogroups 2 strains (Baltrus et al. 2011; Dillon et al. 2019b; Hulin et al. 2018). This marker may hence not be specific enough for VCZ strain detection.

The aim of the study was to design and evaluate new identification and detection tools for VCZ strains. First, we developed the PCR tests to amplify the three new genes of the seven-genes MLSA scheme and characterized our collection of VCZ strains with this scheme. Second, we clarified the situation of clade-2d strains isolated from zucchini seeds, for which very little data were available. We also tested pathogenicity of nine clades 2b and 2d strains on zucchini seedlings. Third, faced to the genetic diversity of the strains responsible for VCZ, we used two approaches to design detection and identification tests. The first approach was based on the search for phylogenetic markers of the clusters and clades, which the VCZ belong to. The second one was to design a multiplex qPCR assay that associated to the *syIC* other pathogenicity markers such as *avrRpt2* and *hopZ5*, whose presence characterized VCZ strains according to their host range (Lacault et al. 2020).

Table 1. - continued

Strain	Species <sup>1</sup> / pathovar	Host	country	Year	group <sup>2</sup> /cluster <sup>3</sup>	identification by PCRs										Tetraplex Taqman q-PCR <sup>5</sup>				Taqman q2bw	
						clusters <sup>4</sup>					groups or clades <sup>2</sup>					q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d		
						A	B	C	D	E	F	V2a	V2ba	2bs	2b						2d
VCZ strains (Lacault et al. 2020)																					
P72	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2010	PG2a/D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
CFBP 8692 (P66)	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	Thailand	2010	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
P65	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2010	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P89	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	France	2011	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P90	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	USA	2011	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P94	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2011	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
P104	<i>P. cerasi</i>	<i>C. pepo</i>	na	2011	PG2a/E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	nd
Other strains isolated from zucchini seed lots or seed production fields																					
P108	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i> seed	Chile	2011	PG2b/2bs	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
P101	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i> seed	na	2011	PG2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nd
P136	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i> seed	India	2014	PG2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	nd
P138	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i> seed	France	2015	PG2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	nd
69	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2018	PG2b	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	+	-	-	-	nd
107	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2018	PG2b	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	-	+	-	-	-	nd
598p	<i>P. syringae</i>	<i>C. pepo</i>	France	2018	PG2b/2bs	-	-	-	-	-	nd	-	-	+	+	-	+	-	-	-	nd
P129	Species A	<i>C. pepo</i> seed	China	2013	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
P135	Species A	<i>C. pepo</i> seed	India	2014	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
P103	Species A	<i>C. pepo</i> seed	na	2011	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
P134	Species A	<i>C. pepo</i> seed	na	2014	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
84	Species A	<i>Beta vulgaris</i>	France	2018	PG2d	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
142	Species A	<i>C. pepo</i> seed	France	2018	PG2d	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
475	Species A	<i>C. pepo</i> seed	France	2018	PG2d	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
485	Species A	<i>Solanum nigrum</i>	France	2018	PG2d	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
Other strains of <i>Pseudomonas</i> species complex																					
CFBP2215	<i>P. syringae</i> pv. <i>delphinii</i>	<i>Delphinium</i> sp	New-Zealand	1957	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP1727	<i>P. syringae</i> pv. <i>berberidis</i>	<i>Berberis</i> sp	New-Zealand	1972	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
CFBP1657 (PT)	<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	<i>Brassica oleracea</i>	New-Zealand	1965	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
CFBP5524 (PT)	<i>P. syringae</i> pv. <i>spinacea</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Japon	1986	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w
CFBP2212 (PT)	' <i>P. tomato</i> '	<i>Lycopersicon esculentum</i>	UK	1960	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CFBP1698	' <i>P. tomato</i> '	<i>L. esculentum</i>	USA	1942	PG1a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w
CFBP4060 (T)	<i>P. avellanae</i>	<i>Corylus avellana</i>	Greece	1976	PG1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
CFBP7286	<i>P. avellanae</i> pv. <i>actinidiae</i>	<i>Actinidia chinensis</i>	Italy	2008	PG1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CFBP8305 (T)	<i>P. cerasi</i>	<i>Prunus cerasus</i>	Poland	2007	PG2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CFBP2356 (PT)	<i>P. cerasi</i> pv. <i>dysoxylly</i>	<i>Dysoxylum spectabile</i>	New Zealand	1949	PG2a	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	+	-	-	-	nd
CFBP1392 (T)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	<i>Syringa vulgaris</i>	UK	1950	PG2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
CFBP1617 (PT)	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	<i>Beta vulgaris</i>	USA	1959	PG2b/2bs	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
CFBP7019 (T)	<i>P. congelans</i>	na	Germany	1994	PG2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP5467 (CC94)	<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	<i>Cucumis melo</i>	France	1997	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
CFBP2339 (PT)	Species A (pv. <i>aceris</i> )	<i>Acer</i> sp.	USA	1939	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
CFBP8502 (B728A)	Species A ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	1987	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8529	Species A ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	<i>Cucumis melo</i>	France	1997	PG2d	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8552	Species A ( <i>P. syringae</i> )	<i>C. melo</i>	France	2001	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8583	Species A ( <i>P. syringae</i> )	<i>Primula officinalis</i>	France	2017	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP7148	Species A ( <i>P. syringae</i> pv. <i>solidagae</i> )	<i>Solidago altissima</i>	Japan	na	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8553	Species A ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	River water	USA	2007	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8501	Species A ( <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> )	River water	France	2017	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd
CFBP8538	Species A ( <i>P. syringae</i> )	Stream water	France	2006	PG2d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	nd

continued on following page



Table 1. - continued

Strain	Species <sup>1</sup> / pathovar	Host	country	Year	group <sup>2</sup> /cluster <sup>3</sup>	identification by PCRs							Tetraplex Taqman q-PCR <sup>6</sup>				Taqman q2bw		
						clusters <sup>4</sup>						groups or clades <sup>5</sup>	q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d			
A	B	C	D	E	F	V2a	V2ba	2bs	2b	2d									
CFBP2894	<i>P. amygdali</i> pv. <i>aesculi</i>	<i>Aesculus indica</i>	India	1980	PG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
CFBP6463 (PT)	<i>P. amygdali</i> pv. <i>lachrymans</i>	<i>Cucumis sativus</i>	Hungria	1958	PG3	-	-	-	-	nd	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd
CFBP3651	<i>P. amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Ethiopia	1985	PG3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
CFBP1390 (PT)	<i>P. amygdali</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>P. vulgaris</i>	Canada	1949	PG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
CFBP3205 (T)	<i>P. amygdali</i>	<i>Prunus amygdalus</i>	Greece	1967	PG3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP2216 (T)	<i>P. coronafaciens</i> '	<i>Avena sativa</i>	UK	1958	PG4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP1750	<i>P. coronafaciens</i> ' pv. <i>striaefaciens</i>	<i>Secale cereale x Triticum</i>	Mexico	1972	PG4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
CFBP2341 (T)	<i>P. cannabina</i>	<i>Cannabis sativa</i>	Hungria	1957	PG5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP3204 (T)	<i>P. caripapayae</i>	<i>Carica papaya</i>	Brazil	1966	PG6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP1694	<i>P. caripapayae</i> pv. <i>tagetis</i>	<i>Tagetes erecta</i>	Zimbabwe	1972	PG6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP2107 (T)	<i>P. viridiflava</i>	<i>Phaseolus</i> sp.	Switzerland	1929	PG8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP2101 (T)	<i>P. cichorii</i>	<i>Cichorium endivia</i>	na	1929	PG11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Other cucurbit pathogenic strains																			
CFBP4459 (T)	<i>Acidovorax citrulli</i>	<i>Citrullus lanatus</i>	USA	na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP4375	<i>A. citrulli</i>	<i>Cucumis melo</i>	USA	1981	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP2355 (T)	<i>Erwinia tracheiphila</i>	<i>C. melo</i>	USA	1972	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP1350	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>C. pepo</i>	Italy	na	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP6776	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>C. pepo</i>	France (FWI)	2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP2542	<i>Xanthomonas cucurbitae</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	New-Zealand	1968	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CFBP4644	<i>X. melonis</i>	<i>C. melo</i>	Brazil	1974	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
strains representative of species found in zucchini seed microbiota																			
CFBP4246 (T)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	soil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFBP4258 (T)	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w

(T) type strain ; (PT) pathotype strain ; (na) not available ; (nd) not determined ; (+) positive result with PCR test ; (-) negative result with PCR test ; (1) species name according to Gomila et al. 2017 ; (2) Phylogroups and clades according to Berge et al 2014 ; (3) clusters according to Lacault et al 2020 and to the new MLSA scheme ; (4) identification by PCR of VCZ strains belonging to clusters A, B, C, D, E, F ; (5) identification by PCR of VCZ strains belonging to MLSA clades 2b-a and 2a and strains of clades 2b and 2d ; (6) identification by Multiplex TaqMan qPCR using the pathogenicity makers *syfC*, *avrRpt2* and *hopZ5* and a phylogenetic marker of clade 2d strains ; (7) results of the Tqman qPCR designed for clade 2b strains, including clade-2ba strains.

Table 2. Genome sequences used in this study

Souches	Pays*	Hôte	Année *	Phylogoupe	Génome
CFBP 2212 <sup>PT</sup> (pv. <i>tomato</i> )	UK	<i>Lycopersicon esculentum</i>	1960	PG1a	SAMN03976246
CFBP 2351 <sup>PT</sup> (pv. <i>morsprunorum</i> )	USA	<i>Prunus domestica</i>	na	PG1b	SAMN03976519
CFBP 2353 <sup>PT</sup> (pv. <i>theae</i> )	Japon	<i>Thea sinensis</i>	1970	PG1b	SAMN04033035
13-139B	Florida	<i>Citrullus lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06317916
13-429	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06318302
03-19A	Florida	<i>Cucumis melo</i>	2003	PG2a	SAMN06263767
200-1	Georgia	<i>Cucurbita</i> sp.	2000	PG2a	SAMN06318380
BS2121	California	<i>Cucurbita</i> sp.	2006	PG2a	SAMN06317958
ZUM3984	China	<i>Cucurbita</i> sp.	2008	PG2a	SAMN06318038
Cit7 ( <i>P. syringae</i> )	na	<i>Citrus sinensis</i>	na	PG2a	SAMN02471314
<i>P. cerasi</i> CFBP 8305 <sup>T</sup>	Poland	<i>Prunus cerasus</i>	2007	PG2a	SAMEA3894894
LMG 5076 <sup>PT</sup> (pv. <i>papulans</i> )	Canada	<i>Malus pumila</i>	1973	PG2a	SAMN03976275
CFBP 1617 <sup>PT</sup> (pv. <i>aptata</i> )	USA	<i>Beta vulgaris</i>	1959	PG2b	SAMN03976295
CFBP 1392 <sup>T</sup> (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	1951	PG2b	SAMN03976255
NCPBP 4273 <sup>PT</sup> (pv. <i>coryli</i> )	Italia	<i>Corylus avellana</i>	1995	PG2b	SAMN03481961
PS711	Serbia	<i>Cucurbita</i> sp.	2013	PG2b-a	SAMN10486866
13-509A	Florida	<i>Cucurbita</i> sp.	2013	PG2b-a	SAMN06263769
13-C2	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06263768
13-140A	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06256456
14-410	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06270325
14-32	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06257475
14-Gil	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06317944
<i>P. syringae</i> CC457	France	<i>C. melo</i>	na	PG2b-a	SAMN02471568
ZUM3584	Italy	<i>Cucurbita</i> sp.	2005	PG2b-a	SAMN06318381
HS191 (pv. <i>syringae</i> )	Australia	<i>Panicum miliaceum</i>	1969	PG2b-a	SAMN03267749
CFBP 7019 <sup>PT</sup> ( <i>P. congelans</i> )	Germany	<i>Poaceae</i>	1994	PG2c	SAMN03976302
B728A (pv. <i>syringae</i> )	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	na	PG2d	SAMN09235866
ICMP 16925 <sup>PT</sup> (pv. <i>solidagae</i> )	Japon	<i>Solidago altissima</i>	na	PG2d	SAMN03976256
LMG 2106 <sup>PT</sup> (pv. <i>aceris</i> )	USA	<i>Acer</i> sp.	na	PG2d	SAMN03976301
1212 (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Pisum sativum</i>	na	PG2d	SAMN02471561
7872 (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Prunus domestica</i>	2000	PG2d	SAMN03992220
CFBP 1390 <sup>PT</sup> (pv. <i>phaseolicola</i> )	Canada	<i>P. vulgaris</i>	1949	PG3	SAMN03976265
NM002 (pv. <i>lachrymans</i> )	China	<i>Cucumis sativus</i>	1984	PG3	SAMN06606132
CFBP 2216 <sup>PT</sup> ( <i>P. coronafaciens</i> )	UK	<i>Avena sativa</i>	1958	PG4	SAMN03144492
CFBP 2341 <sup>PT</sup> (pv. <i>cannabina</i> )	Hongria	<i>Cannabis sativus</i>	1957	PG5	SAMN05216597
CFBP 1694 <sup>PT</sup> (pv. <i>tagetis</i> )	Zimbabwe	<i>Tagetes erecta</i>	1972	PG6	SAMN03976254
CFBP 4913 ( <i>P. viridiflava</i> )	NZ	<i>Actinidia deliciosa</i>	1971	PG8	SAMN03976434

\*na (not available)



## Materials and Methods

### Bacterial strains and growth.

A bacterial collection of 113 strains including 54 strains responsible for VCZ (Lacault et al. 2020), 11 strains isolated from zucchini seeds or seed-production fields and belonging to the clade 2b (seven strains) and clade 2d (eight strains), 35 strains from diverse *Pseudomonas* species and pathovars, seven bacterial strains pathogenic on cucurbits belonging to divergent genera (*Pectobacterium*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, and *Acidovorax*, and two strains associated with cucurbit seeds belonging to *Bacillus* and *Paenibacillus*, (Kalhaf et Raizada, 2016) was used in this study (Table 1). All strains other than VCZ strains were provided by the French Collection of Plant-Associated Bacteria (CIRM-CFBP; [https://www6.inra.fr/cirm\\_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria](https://www6.inra.fr/cirm_eng/CFBP-Plant-Associated-Bacteria)).

Bacterial strains were stored in a -80°C freezer in 40% glycerol solution and were routinely cultivated at 28°C on 10% TSA medium (3 g/L tryptone soya broth and 15 g/L agar) with 50 mg/L cycloheximid or LBC AL media (2 g/L yeast extract, 5 g/L bactopectone, 50 g/L saccharose, 1.5 g/L boric acid, 15 g/L agar, 2 mL/L 1 N NaOH, 50 mg/L lincomycin, 50 mg/L cephalixin, and 50 mg/L cycloheximid). Bacterial suspensions were prepared from fresh cultures suspended in sterile distilled water, calibrated at  $OD_{650\text{ nm}} = 0.1$ , and adjusted to the final desired concentration with sterile distilled water. Dilution plating and colony counts after 48-h growth on 10% TSA were used to precisely quantify bacterial population sizes. Calibrated suspension-dilutions were boiled during 10 min and used as standards for qPCRs.

### Amplification and sequencing of the three genes to be included in the MLSA scheme.

Three genes have been recently described for the typing of VCZ strains (Lacault et al. 2020). In the genome sequence of strain B728a, these genes correspond to *Psyr3208* encoding the NADH dehydrogenase subunit M, *Psyr3420*, encoding the protein FixH involved in nitrogen fixation, and *Psyr4880*, encoding a hypothetical protein with unknown function. The sequence of each gene was retrieved from 118 genomes, including 23 strains isolated from zucchini (Lacault et al. 2020), 14 strains isolated from cucurbits (Newberry et al. 2019), the two clade-2d strains isolated from zucchini seeds (this work) and 79 other PG2 genomes (Supplementary Table 1), and aligned. Primers were designed in conserved regions in order to amplify and sequence polymorphic fragments. The primer pairs [*Psyr3208*-F 5'ATGATGCTGGTGCCGATGTA3' and *Psyr3208*-R 5'ATCAGCGAGTAGACAGAACC3'], [*Psyr3420*-F 5'ATGGTGTTTCATCGCCGTGACC3' and *Psyr3420*-R 5'TCGCCTTCGACACCCAGCAG3'], and [*Psyr4880*-F 5'ATGCACGGCTCCGAACGAAA3' and *Psyr4880*-R 5'AGTCTCCAGCGCCCGTCCAC3'] allowed the amplification of 883-bp, 343-bp, and 416-bp fragments, respectively. Supplementary primers, *Psyr3208*-MF 5'TCGCCGAGTTCGCACCGAT3' and *Psyr3208*-MR 5'CTGCCCGAGTAGATACCGAT3' were designed in *Psyr3208* to improve sequencing. PCRs were performed in a 50- $\mu$ L volume containing 12.5  $\mu$ L of buffer, 0.4 U/ $\mu$ L of Taq polymerase (GoTaq, Promega), 200  $\mu$ M of dNTPs, 0.5  $\mu$ M of each primer and 5  $\mu$ L of boiled bacterial suspension. For *Psyr3208*, amplification conditions were 20 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C (with a 0.5°C decrease at each cycle), then 15 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 50°C and 1 min at 72°C. For *Psyr3420* or *Psyr4880*, PCR conditions were 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 62°C (for *Psyr3420*) or 66°C (for *Psyr4880*) and 1 min at 72°C. A final step of 10 min at 72°C was added to achieve elongation. Amplified fragments were sequenced in Sanger with F and R PCR primers, and, in addition with MF and MR primers for *Psyr3208* (Genoscreen, France). Geneious version 9.1.7 software was used to assemble, align, orientate, and trim sequences according to the reading frame and beginning with the first nucleotide of a codon. Sequence lengths





were 825 bp (*Psyr3208*), 318 bp (*Psyr3420*) et 309 bp (*Psyr4880*). Genes were amplified in strains whose genome was not available. Homologous sequences retrieved from genome sequences were added to the data set (Table 2).

### MLSA of the strain collection.

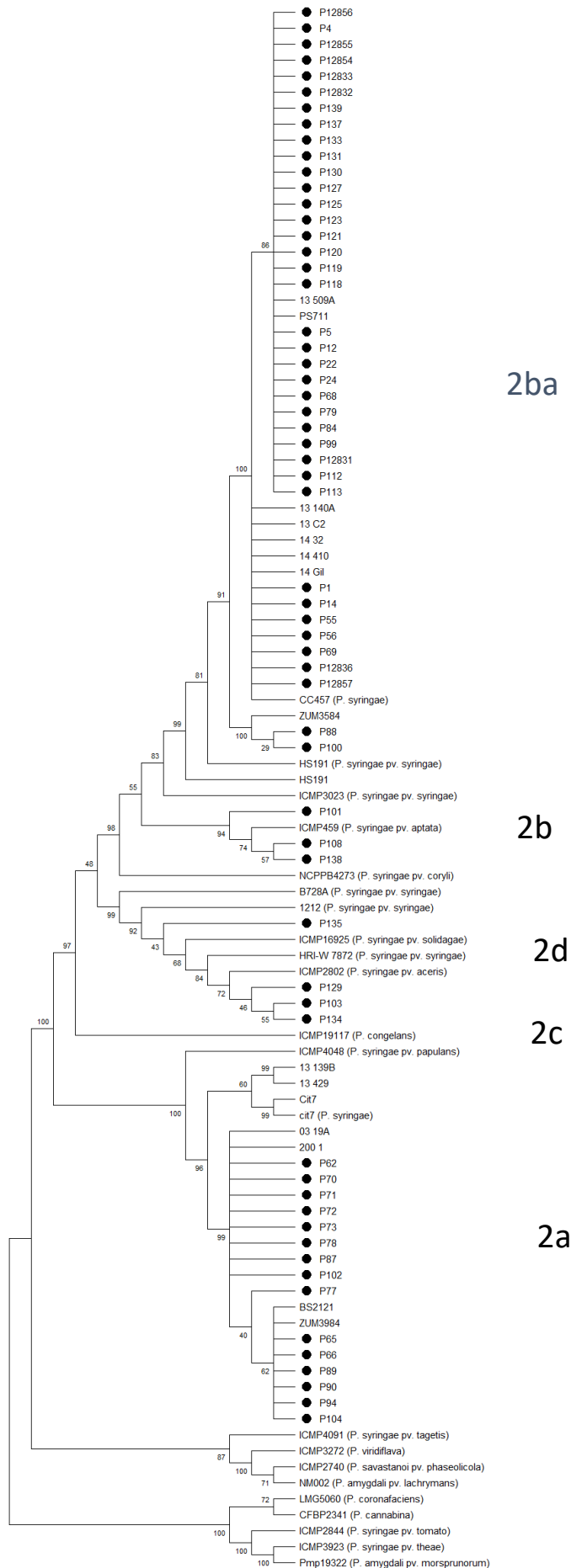
The sequences of *gapA*, *gltA*, *gyrB*, and *rpoD* (Lacault et al. 2020), encoding the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, the citrate synthase A, the B subunit of DNA gyrase, and the RNA polymerase sigma70 factor RpoD, respectively, were concatenated to the sequences of *Psyr3208*, *Psyr3420*, and *Psyr4880*, to obtain a 3,459 bp fragment. A maximum likelihood tree was generated with MEGA 7 (Kumar et al. 2016). The best fit model was the Tamura-Nei model using the discrete Gamma distribution with invariant sites (G + I) and 1000 bootstrap replicates were used.

### Genome sequencing and analyses.

The genomes of two strains (P129 and P135) of the clade 2d were sequenced. Their DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) and was paired-end sequenced (2 × 150 bp) using the Illumina HiSeq X-Ten at Beijing Genomics Institute (China). Genome assembly was performed with SOAPdenovo version 2.04, SOAPGapCloser version 1.12 (Luo et al. 2012), and Velvet version 1.2.02. (Zerbino and Birney 2008). Their phylogenic position was determined by the percentage of shared 15-mers (Briand et al. 2019) on the dataset of 118 genomes (Supplementary Table 1). Percentage of shared k-mers and distance matrix were calculated with Ki-S as were dendrograms (<https://iris.angers.inra.fr/galaxypub-cfbp>) (Briand et al. 2019). T3E repertoire of each strain was predicted through tBLASTN search (identity higher than 80% on at least 80% of CDS length) on 138 amino acid sequences of T3Es (Hopsdatabase at <http://www.pseudomonas-syringae.org/>). Putative frameshift mutations were checked by aligning each T3E sequence with the corresponding curated reference sequence with MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (Corpet 1988).

### Pathogenicity assays.

Pathogenicity of nine strains belonging to clades 2b and 2b, isolated from zucchini seed lots or seed production fields, was evaluated on zucchini (*C. pepo* subsp. *pepo* cv. Tosca) following seed soaking inoculation. A representative of cluster C was included in the assays. Water and strain P99 were used as negative and positive controls, respectively, *P. syringae* pv. *aceris* pathotype strain CFBP 2339 to represent the new phylogenomic species A (Gomila et al. 2017), and *P. syringae* type strain CFBP 1392 for the clade 2b. Five seeds per strain were inoculated by a 30 min soaking in a fresh bacterial suspension calibrated at  $1 \times 10^7$  cfu/mL, dried two hours under a laminar flow and sown in individual pots containing Klassman substrate. After watering, pots were incubated in a climatic chamber (14 h day-light at 25°C, 18°C night and 100% relative humidity). Symptoms were recorded nine and 14 days after sowing. Notation of symptoms was made per plant using the following scale: absence of germination (1), presence of necroses on cotyledons (1), simple deformation of cotyledon margins (1) or deformation with thickening and torsion (3), growth delays (1) or complete stunting (3), and vein clearing (3). The absence of impact or symptom was recorded as (0). A disease score (sum of the notes attributed to each kind of symptoms) was attributed per strain and classified in no disease (0), low (1 to 19), medium (20 to 39), and high (40 to 60). Two independent tests were performed.



**Figure 1.** Phylogenetic relationships of strains isolated from seed lots between 2002 and 2014. Maximum likelihood (ML) tree was based on concatenated partial sequences of *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3208*, *Psyr3420* and *Psyr4880* (3,405 bp). Bootstrap scores (1,000 replicates) are displayed at each node. Clades are indicated based on Berge et al. 2014; Bull and Koike 2015; and Newberry et al. 2019. Black points indicate strains isolated from zucchini seed lots.

### Spiking of seed samples and analysis of seed lots

Healthy seed samples (negative qPCR result on 2,000-seeds) of *C. pepo* subsp. *pepo* cv. Lorea (500 seeds) were soaked in 3 mL/g of seeds of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma) plus Tween 20 (0.02% v/v) and shaken (105 rpm) during two hours at room temperature. A fresh bacterial suspension calibrated at  $1 \times 10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup> was diluted with seed extract solutions in order to end up with spiked suspensions with concentrations ranging from  $1 \times 10^7$  to 1 CFU.mL<sup>-1</sup>, which were confirmed by dilution plating. One mL per dilution was centrifugated 5 min at 13,000 g. Supernatant was discarded and DNA was extracted using the QuicPick™ SML Plant DNA purification kit according to the supplier's instructions (Bio-Nobile, Turku, Finland) in an automated system (Caliper Zephyr, PerkinElmer). DNA was eluted from magnetic beads using 30 µL of elution buffer. DNAs of bacterial suspensions in sterile distilled water were also extracted and used as standards or controls. Dilution series of DNA solutions ranged from  $1 \times 10^7$  to 1 CFU.mL<sup>-1</sup>. One to five µL of DNA were used per qPCR sample. Each sample was tested in triplicate. Four commercial zucchini seed lots (I to IV) were tested in samples of 500 seeds or in five subsamples of 100 or 10 seeds as described above. One µL of DNA was used per qPCR sample. Each sample was tested in duplicate. Subsampling allowed the determination of the contamination rate of the seed lot according to Maury et al (1985) when subsamples had the same size or according to Swaroop (1950) for degressive subsamplings.

### Identification of targets and primer design

Specific sequences of clades and clusters were searched for in the genomic sequences using the SkIf\_with\_DSK tool (Briand et al 2016; ). SkIf\_with\_DSK identifies specific k-mers within a group of genomes (in-group) that are absent in the other genome sequences (out-group), provides their precise locations on a reference genome and uses the positions to concatenate the overlapping k-mers into long-mers (Denancé et al 2019). A k-mer size of 22 was used to search for specific sequences using the dataset of 118 genomes. Specific long-mers were searched for in clusters A, B, C, D, E, and F, in larger groups V2ba and V2a encompassing several clusters (A-B and D-E, respectively) and in clades 2b and 2d (Figure 1 and Supplementary Table 1). Concerning clade 2b, three different levels were evaluated: a first one, wide, encompassing all 2b and 2ba strains (2bw), a second one, restricted to 2b strains (2b), and a third one grouping the strain P108 (a VCZ strain belonging to clade 2b) with its neighbours including several pathovar *aptata* genomes (2bs). Generally, all genomes belonging to a target group were used as in-group genomes and other genomes as out-group. Precise composition of out-groups is given per marker in Supplementary Table 1. In order to design PCR tests and TaqMan qPCR tests, only long-mers with a size greater than or equal to 70 bp were considered.

Primer3 2.3.4 was used to select primers in specific long-mers for all classical PCRs with parameters set up with an optimal primer size of 20 bp, a product length from 150 up to 350 bp, and a T<sub>m</sub> of 60°C (± 3°C). For qPCR tests, target sequences (*avrRpt2*, *hopZ5* and long-mers specific of clades 2b and 2d) were extracted from genomes using the bioinformatic tool Extract\_Genes\_Genomes (<https://iris.angers.inra.fr/galaxypub-cfbp>) and aligned using Geneious R9. Primers and probe combinations for TaqMan PCR assays were designed within these specific regions using Geneious 9.1.8 for *avrRpt2*, *hopZ5* and clades 2b and 2d sequences (Koressaar and Remm, 2007). The parameters were set up with an optimal primer size of 20 bp, an optimal product size of 80 bp, and T<sub>m</sub> of 60°C and 70°C for primers and probe, respectively. Dimer- and hairpin-forming primers and probes were discarded.

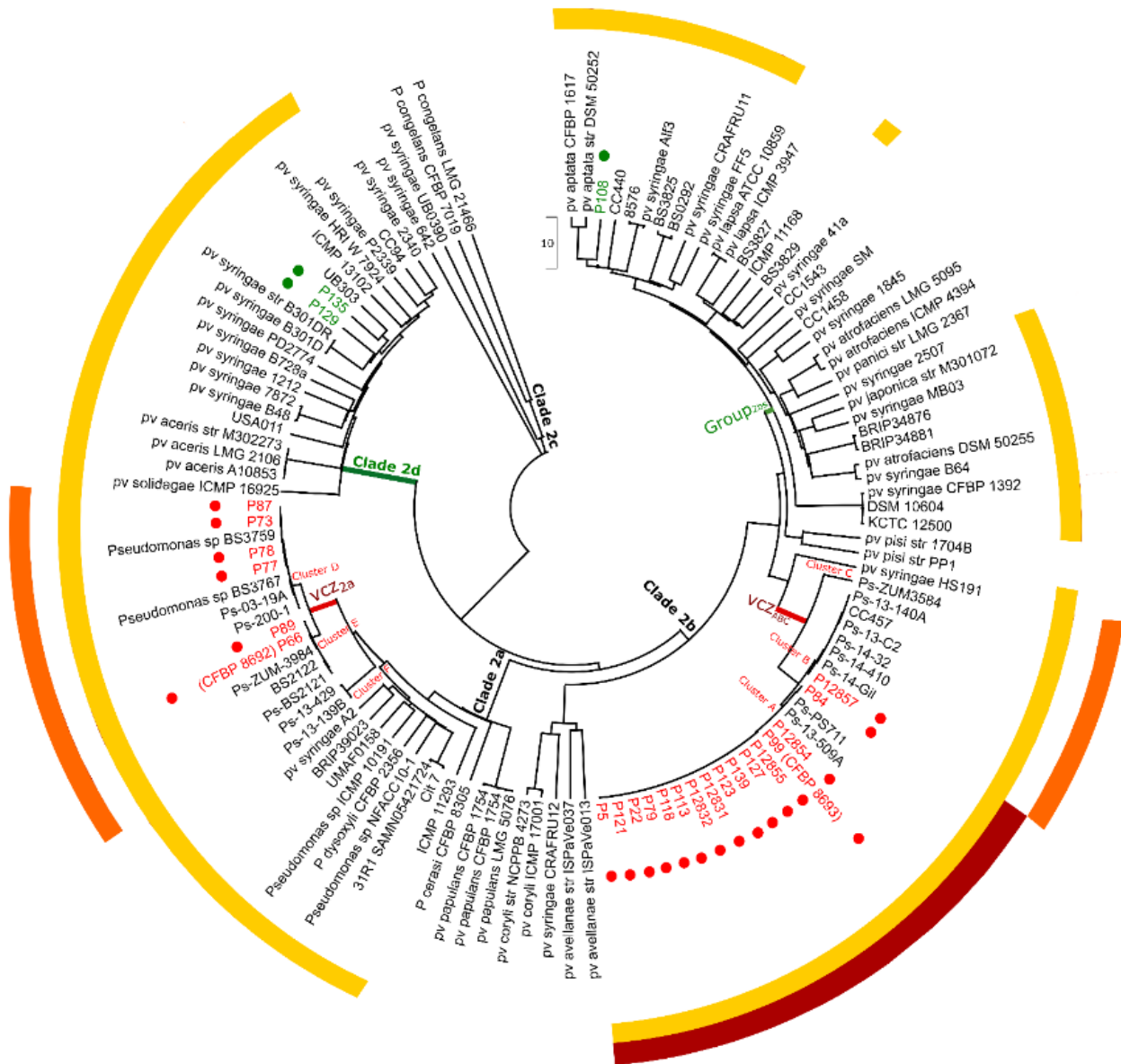


Figure 2. Phylogenetic groups chosen for PCR test design. Dendrogram built on distances calculated from shared k-mer matrices obtained with KIS on a dataset of 118 genomic sequences of *P. syringae* phylogroup 2. Strains isolated from zucchini seed lots are marked by a circle, red for VCZ belonging to the different clusters and green for clades 2b and 2d. Presence of *syIc*, *avrRpt2* and *hopZ5* is indicated by yellow, red and orange line respectively.

### ***In silico* evaluation of the specificity of the PCR and qPCR tests**

Specificity of primers and associated probes was tested *in silico* using PrimerSearch (Val Curwen, Human Genome Mapping Project, Cambridge, UK), first, on our collection of 118 genomic sequences, and second, on the 194,438 whole Genome Shotgun (WGS) sequences of Bacteria and Archae available in the NCBI database (03/2019 release). When necessary, phylogenetic position of strains whose genome cross-reacted with primers was checked using KISonWGS (Briand et al. 2020) (<https://iris.angers.inra.fr/galaxypub-cfbp>). KISonWGS identifies WGS neighbor genomes of query input genome file. For multiplex TaqMan PCRs, sets of primers and probe and combinations of primers and probes were tested on the genomes of P99, P66, P77, P12857, ZUM3584, 13-139B, P108 and P135 using AmplifX version 2.0.7 (Nicolas Jullien, Aix-Marseille Univ, CNRS, INP, Inst Neurophysiopathol, Marseille, France; <https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr>) to check absence of dimers and cross-amplifications (Engels, 1993).

### **PCR and q-PCR assays, specificity and sensitivity**

Classical PCRs were performed in a 20-  $\mu$ L volume containing 200 nM of each primer, 200 nM of dNTP, 0.08  $\mu$ L of GoTaq2 and 4  $\mu$ L of its 5x corresponding buffer (Promega), and 5  $\mu$ L of boiled calibrated bacterial suspensions. Amplification reactions were run in a thermocycler 5 min at 95°C, 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 57°C, and 1 min at 72°C, followed by 3 min at 72°C. Five  $\mu$ L of sample were used for electrophoresis 20 min at 100 V in 1% agarose gel stained with ethidium bromide, and visualized on a UV transilluminator.

All q-PCRs were performed in a Bio-Rad CFX96 Touch thermocycler and analysed with Bio-Rad CFX Manager 3.1 software. Each individual and multiplexed TaqMan reaction was performed in a final volume of 10  $\mu$ L containing 5  $\mu$ L of Sso Advanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad), 600 nM of each primer, 200 nM of probe, and 1  $\mu$ L of boiled calibrated bacterial suspension. The amplification program was 3 min at 95°C for and 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. The qPCR on *syIC* was also performed in a final volume of 20  $\mu$ L containing 10  $\mu$ L of MasterMix buffer (Eurogentec, Belgium), 2  $\mu$ M of each primer, 0.03  $\mu$ M of probe, with 5  $\mu$ L of boiled calibrated bacterial suspensions. The amplification program was 10 min at 95°C for and 40 cycles of 15 s at 95°C and 15 s at 60°C. For each reaction, equation curve, efficiency of q-PCR ( $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ ) and the correlation coefficient  $R^2$  were determined using calibrated DNA solutions (1  $\mu$ g/mL to 1 pg/mL) of strains P99 for qPCR on *syIC* and *avrRpt2* (primers and probes q4Ba and qRpt2, respectively), P66 for qPCR on *hopZ5* (primers and probe qZ5) and P108 and P129 for qPCR for clades 2b and 2d (primers and probes q2b and q2d, respectively).

The specificity of the primers and probes was tested *in vitro* with an appropriate collection of target and non-target bacterial strains (Table 1). Specificity was checked in simplex and multiplex at least twice in duplicates using boiled bacterial suspensions ( $OD_{650\text{ nm}} = 0.1$ ).

Sensitivity of the multiplex qPCR assays was evaluated at least twice in triplicates for boiled bacterial suspensions ( $10^8$  to  $10^3$  CFU/mL) and DNAs extracted from 1 mL of seed extracts spiked with bacterial suspensions for final concentrations ranging from  $10^7$  to  $10^1$  CFU/mL. The limit of detection (LOD) was the lowest concentration with a positive signal in, at least, two out of the triplicates.

Tableau 3. Pathogenicity of strains belonging to clades 2b and 2d on zucchini plantlets following seed inoculation. The results correspond to the cumulated data from two independent tests, each on five plants.

Strain or treatment	Group	Impact on germination <sup>a</sup>	Necroses on cotyledons <sup>a</sup>	Deformations of cotyledons <sup>a</sup>	Stunting <sup>b</sup>	Vein clearing <sup>b</sup>	Disease severity (score) <sup>c</sup>
69	Clade 2b	0	9	11	18	0	** (38)
107	Clade 2b	0	3	9	15	0	** (27)
P108	Clade 2b	1	7	0	8	3	* (19)
475	Clade 2b	0	8	2	3	3	* (16)
598p	Clade 2b	0	1	7	10	0	* (18)
CFBP 1392	Clade 2b	1	4	2	2	0	* (9)
84	Clade 2d	2	5	5	3	0	* (14)
P129	Clade 2d	1	3	0	2	0	* (3)
P135	Clade 2d	0	6	0	0	3	* (8)
142	Clade 2d	1	3	1	4	3	* (12)
485	Clade 2d	2	6	2	7	0	* (17)
CFBP 2339	Clade 2d	0	1	2	0	0	* (3)
P88	Cluster C	1	10	17	24	0	*** (51)
Control + : P99	Cluster A	1	9	23	21	3	*** (57)
water	T-	0	0	0	0	0	(-) (0)

Notations per plant for each kind of symptoms were: absence of symptom (0) absence of germination (1), presence of necroses on cotyledons (1), simple deformation of cotyledon margins (1) or deformation with thickening and torsion (3), growth delays (1) or complete stunting (3), and vein clearing (3). A disease score (sum of the notes attributed for each kind of symptoms for all plants) was attributed per strain.

<sup>a</sup> symptoms were evaluated nine days after sowing

<sup>b</sup> symptoms were evaluated 14 days after sowing

<sup>c</sup> disease severity (-) = no symptoms (0), \* = low (1 to 19), \*\* = medium (20 to 39), and \*\*\* = high (40 to 60), disease score (number) corresponded to the sum of each kind of symptoms

Table 4. Primers and probes designed to detect and identify strains belonging to the species complex *P. syringae*, isolated from zucchini seeds

Target group	Name <sup>a</sup>	Sequence 5' - 3'	Amplicon size (bp)	Primer Tm	Target sequence
Cluster A	CIA-F	GACCAACCTGCCCATTTGAG	163	59.1	PspCFBP8693_RS11540 protein-export chaperone SecB
	CIA-R	GGCCCTTAACGTGAGAGAGT		59.1	
Cluster B	CIB-F	GGCAGGATCTCGAACAGTTC	160	60.3	PscP12857CL_10745 Hypothetical protein
	CIB-R	CCTTCTCGACCCACCAAGTC		60.1	
Cluster C	CIC-F	GGCATAACGACAACCCCTCACT	351	60	B1F68_RS12695 and B1F68_RS12700 hypothetical protein and T4SS protein
	CIC-R	TTGTTTGACGGTTGGTTCAAC		60	
Cluster D	CID-F	GATGGAGTGCAGACATCACG	353	60.3	PscP77CL_RS08800 hypothetical protein
	CID-R	CCAAATCCGTCGAATTGGTT		59.7	
Cluster E	CIE-F	CTCCACGAATGGGTTGAAGT	353	60	PscCFBP8692_13650 hypothetical protein
	CIE-R	TACCCTTGTAATGGCAACA		60	
Cluster F	CIF-F	CGTTTCAGTACGACCCGATT	352	60	Region 241 to 720 NZ_MVAY01000022
	CIF-R	GGGAACCTTGAGGAGAAAGG		60	
V2a	V2aF	GAGCGTTACGTCCTTGAAGC	350	60	PscCFBP8692_RS07865 VCBS repeat-containing protein
	V2aR	CGTCTGGAGCTTCTTGTTC		60	
V2ba	V2baF	GTGCTCCCCGAGGATAAGTG	327	59.9	PspCFBP8693_RS24960 DUF4433 domain-containing protein
	V2baR	CGCTGCAGGAATTGGCATAC		60	
2bw	q2b-F	GCCGTTTCGAGAAACACACG	99	59.8	PspCFBP8693_RS04855 putative response regulator
	q2b-P	FAM <sub>1</sub> ACAGCGGCACCACCAGGCCA <sup>BHQ1</sup>		69.5	
	q2b-R	GCCTGAACAGCGTCCTGC		61.4	
2bs	2bs-F	TCCAGCCTTTGCGCAGATAA	317	60	PsP108CL_RS21570 cation:proton antiporter
	2bs-R	CAATACGCGCGCCAAATAA		60	
Clade 2b	2b-F	CGGATCGATCCAGCCCTGG	332	57	<i>dapC</i> succinyl diaminopimelate transaminase and PsP108CL_RS00135 uridylyltransferase
	2b-R	GCATATGAACATTGCTCCT		58	
	q2d-F	CGTGCTGCTCAAATCGCC		80	
Clade 2d	q2d-P	C <sub>15</sub> CGCGACGGTCTCGGTTCCG <sup>BHQ2</sup>	352	69.1	DND47_RS21810 MCP four helix bundle domain-containing protein
	q2d-R	TCCTGTGAGCAATTGGGG		58.9	
	2d-F	CCGAATAACATCCAGCACCT		60	
	2d-R	CTGCAGCAGATCTCCAGTT		60.6	
Strains producing syringolin	q4Ba-F2	CITTTGAGTACGCCCAAGAGC	152	56	<i>syiC</i> , PspCFBP8693_RS03225 (non-ribosomal peptide synthetase involved in syringolin biosynthesis)
	q4Ba-P	FAM <sub>1</sub> TCGGAGCGCATCATGCAGAT <sup>BHQ1</sup>		59	
	q4Ba-R3	GGAGGCAGTGCTGACGTA		56	
Strains with <i>hopZ5</i>	qZ5-F	GCCTGGCTATCTTCAGATGC	79	58.5	<i>hopZ5</i> PscCFBP8692_RS27225 peptidase C55 (T3E)
	qZ5-P	Th <sup>Ras</sup> ACGCTCAGGATAACGCGCC <sup>BHQ2</sup>		65.3	
	qZ5-R	TCCAAGTTGGATGACAGCCA		59.2	
Strains with <i>avrRpt2</i>	qRpt2-F	CTGCGCAAGAATGGTTGGC	80	60.4	<i>avrRpt2</i> PspCFBP8693_RS11275 cysteine protease avirulence protein (T3E)
	qRpt2-P	HEX <sup>1</sup> GCCTCGCCTAGGGCTGCCGG <sup>BHQ1</sup>		69.9	
	qRpt2-R	GGCCCTCCCTTCCCTCAT		60.4	

<sup>a</sup> Primers were designed for classical PCR or TaqMan qPCR, the later have a name beginning with a q





## Results

### MLSA characterization of the strain collection

The analysis of our collection using the seven-genes MLSA scheme revealed that two VCZ strains belonged to cluster C, increasing the number of clusters hosting VCZ strains. In the ML tree, VCZ strains were distributed in five clusters that all included other strains responsible for diseases on cucurbits (Figure 1). Thirty strains belonged to cluster A, seven to cluster B, two to cluster C, nine to cluster D and six to cluster E (Table 1, Figure 1). No VCZ strain belonged to the cluster F. The seven strains of clade 2b and the eight strains of clade 2d were genetically diverse and did not form any clusters.

### Repertoires of T3Es and pathogenicity of 2d-strains

Strains P129 and P135 (genomes XXX, YYY to submit) isolated from zucchini seed lots belonged to clade 2d on the basis of the percentage of shared k-mers between genome sequences (Figure 2). This result confirmed the identification based on MLSA (Figure 1). Genome sequences of strains P129 and P135 contained 11 and 12 T3E encoding genes, respectively, among which *avrE1*, *hopAA1*, *hopAE1*, *hopAG1*, *hopAH1*, *hopBC1*, *hopH1*, *hopI1*, and *hopM1* were also present in most VCZ strains (Lacault et al. 2020). The T3E genes *hopA2* and *hopAY1* were present in both strains whereas *hopBE1* was only present in P135. These 2d strains lacked *hopAZ1*, *hopBA1*, and *hopA1* which are present in VCZ strains of clades 2a and 2ba (Lacault et al. 2020). The T3E genes *avrRpt2* and *hopZ5* were not present in P129 and P135 genome sequences, this was also the case for 2b strains (Lacault et al. 2020).

Pathogenicity of *P. syringae* strains belonging to clades 2b and 2d was evaluated on zucchini plantlets after seed inoculation. Clades 2b and 2d strains were pathogenic on zucchini but caused less severe symptoms than P99 (Table 3). Indeed, they only occasionally induced severe deformations and complete stunting in comparison to the control strain P99. Strain P88 (a representative of cluster C) caused the same range of symptoms than strain P99 and was in the same group of disease severity. The *P. syringae* type strain CFBP 1392 (clade 2b) caused water-soaked and necrotic lesions on cotyledons, sometimes a weak growth delay of zucchini plantlets but no complete stunting as strain P99 did; strain CFBP2339 (clade 2d) caused only a few small necrotic spots and seemed to be weakly or not pathogenic on zucchini (Table 3). Globally, clade 2d strains were weakly pathogenic on zucchini compared to clade 2b strains.

### Design of primers and probes on identified targets

Sequences specific of each of the clusters A to F, and of larger groups V2a (including clusters D and E), V2ba (including clusters A and B), 2bw (including clades 2b and 2ba), 2bs (including strain P108 and closely related *P. syringae* pv *aptata* strains), clades 2b and 2d (Figure 2), were identified in genome sequences using SkIf\_with\_DSK. Among the 82 long-mers specific of cluster A, the 45 of cluster B, the 147 of cluster C (one unique genome sequence is available for this cluster), the 124 of cluster D, the 213 of cluster E, the 705 of cluster F, the 377 of the group V2a, the 239 of the group V2ba, the 86 of the 2bs clade, and the 2554 of the 2d clade, the first sequence of each targeted group was used as a template sequence for PCR primers and TaqMan qPCR primers and probe designs (Table 4). For the groups 2bw and 2b no specific long-mers were available, two specific short sequences that were close in the genome sequence of strain P108 were selected. They were used to design



Table 5. *In silico* and *in vitro* specificity of primers and probes.

Targeted group (primers for PCR tests or Primers and probe for qPCR test)	Number of <i>in silico</i> annealings on target / non target genome sequences *	Inclusivity <sup>b</sup> / Exclusivity <sup>c</sup>	Number of <i>in vitro</i> signals on target / non target strains *	Inclusivity <sup>b</sup> / Exclusivity <sup>c</sup>
Cluster A (CIA-F, CIA-R)	17 cluster A / 1 clade-2b	100% / 99.9995%	30 cluster-A / (2 cluster-B/83)	100% / 97.59%
Cluster B (CIB-F, CIB-R)	8 cluster B / 3 <i>P. coronafaciens</i>	100% / 99.9985%	7 cluster-B / (1 <i>P. coronafaciens</i> /106)	100% / 99.06%
Cluster C (CIC-F, CIC-R)	1 cluster C / 10 PG3	100% / 99.9949%	(1 cluster C /2) / (1 PG3/111)	50% / 99.10%
Cluster D (CID-F, CID-R)	8 cluster D /2 <i>P. coronafaciens</i>	100% / 99.9990%	9 cluster D / (0/104)	100% / 100%
Cluster E (CIE-F, CIE-R)	5 cluster E / 0	100% / 100%	6 cluster E / (0/107)	100% / 100%
Cluster F (CIF-F, CIF-R)	2 cluster F / 0 (but 1 <i>gs</i> with 6 mismatches)	100 % / 99.9995%	nt	nt
V2a (V2a-F, V2a-R)	13 cluster D and E / 0 (but 2 cluster F <i>gs</i> with 3 mismatches)	100% / 99.999%	15 cluster D and E / (0/98)	100% / 100%
V2ba (V2ba-F, V2ba-R)	25 clusters A and B strains / 0 (but 4 <i>gs</i> with 1 to 2 mismatches)	100% / 99.9979%	37 cluster A and B strains / (0/76)	100% / 100%
2bs (2bs-F, 2bs-R)	10 <i>gs</i> P108 subgroup / 0	100% / 100%	3 clade 2b / (0/110)	100% / 100%
Clade 2b (2b-F, 2b-R)	83 clade 2b (over 84) <sup>d</sup> / 0 (but 73 <i>gs</i> with 4 or 5 mismatches)	98,81% / 99.96%	(8 clade 2b/9) / (1 clade 2d / 104)	88.89% / 99.04%
Clade 2bw (q2b-F, q2b-P, q2b- R)	111 clade 2bw <sup>e</sup> / 0 (but 1457 <i>gs</i> with 1 to 8 mismatches)	100% / 99.25%	6 clade-2b / (16 clade-2a, 2d, PG3, PG4, <i>Xanthomonas</i> , <i>Paenibacillus</i> /32)	100% / 50%
Clade 2d (2d-F 2d-R)	64 clade 2d / 0 (but 543 <i>gs</i> with 5 to 6 mismatches)	100% / 100%	18 clade-2d / (0/95)	100% / 100%
Clade 2d (q2d-F, q2d-P, q2d- R)	XXX clade 2d genomes / 1 (and 6 <i>gs</i> with 8 mismatches)	100% / 99.9964%	18 clade-2d / (0/95)	100%/ 100%
Strains with <i>rylC</i> (4Ba-F, 4Ba-P, 4Ba- R)	66 clades 2a and 2ba (and 95 clades 2b and 2d <i>gs</i> with 5 mismatches) / 0	100% / 100%	82 (from VCZ clusters, clades 2a, 2b and 2d having <i>rylC</i> ) / (0/31)	100% / 100%
Strains with <i>avrRpt2</i> (Rpt2-F, Rpt2-P, Rpt2-R)	31 <i>gs</i> having <i>avrRpt2</i> / 0	100% / 100%	33 / (0/80)	100% / 100%
Strains with <i>hopZ5</i> (Z5-F, Z5-P, Z5-R)	111 <i>gs</i> having <i>hopZ5</i> (and 27 <i>gs</i> with 3 mismatches) / 0	100% 100% /	23 / (0/90)	100% / 100%

\* Identity of reacting genome sequence (*gs*) or strains is provided. The 2019-NCBI database release included 194,450 bacterial genome sequences and our collection included 121 strains.

<sup>b</sup> Inclusivity was defined as the percentage of target microbial genomes or strains that gave the expected positive result.

<sup>c</sup> Exclusivity was defined as the percentage of non-target microbial genomes or strains that gave the expected negative result. The number of non-targets was 194,450 genomes of the 2019-NCBI release minus the targets (Supplemental Table 2) and the 113 strains of our collection for *in vitro* test minus the targets as indicated (Table 1).

<sup>d</sup> Clade 2b included strains isolated from hazelnuts (Figure 1)

<sup>e</sup> Clade 2bw included strains belonging to clade 2ba and to the branch with strains isolated from hazelnuts (Figure 1)

a TaqMan qPCR test and a PCR test for these groups, respectively. Primers and probes for Taqman qPCR were designed within *avrRpt2* and *hopZ5* (Table 4). Specificity of the primers was validated on all bacterial genome sequences publicly available. A representative genome sequence per targeted group was compared with KIS\_on\_WGS to identify all the genomes of the group present in the database. Similar approach was used for genomes cross reacting with primers and probe in order to determine their phylogenetic position that was indicated by the results of Primersearch (Supplemental Table 2) and to calculate inclusivity and exclusivity parameters (Table 5). The *in silico* validation tests confirmed that most target genome sequences gave perfect annealing with primers and, when requested, probe sequences, but a limited number of probable cross-reactions were detected and many putative ones suffering from numerous mismatches on the targeted sequences (Table 5 and Supplemental Table 2). *In silico* inclusivity was 100% for all tests except for the clade 2b primers (targeting 2b strains without the 2ba strains). Primersearch did not find the primers on the genome of *P. syringae* pv. *japonica* str. M301072. This genome was part of the in-group in the SkIf\_with\_DSK analysis for clade 2b strains. In this analysis no specific long-mers were identified and PCR primers were designed on two specific short-mers closely related on the genomic sequence of strain P108. In strain M301072 only one of primers was present. A 100% exclusivity was observed for cluster E and 2bs primers. Considering that targets were genomes containing the genes *sylC*, *avrRpt2* and *hopZ5*, a 100% exclusivity was also observed for the primers and probes targeting these genes (Table 5 and Supplementary Table 2). Hence, annealings of the primers and probe targeting *avrRpt2* were observed in some strains of pathovars *tomato*, *spinacea*, *maculicola* and *tagetis*. The presence of the gene *avrRpt2* was expected in the pathovar *tomato* but was not previously reported in the other pathovars. A complete *avrRpt2* sequence was detected (blastn) in some strains of these cross reacting pathovars. Similarly, the primers and probes targeting *hopZ5* annealed on the genome sequences of the pathovar *actinidiae*, which is known to have *hopZ5*. A very limited number of cross-reactions was highlighted for the primers targeting cluster A, cluster B, cluster D, cluster F, groups V2a, V2ba, and and clade 2d with exclusivity values higher than 99.99% corresponding to one to ten non-targeted genome sequences cross-reacting among the 194,450 genome sequences of the database. Cross reactions were more probable and numerous for primers and probes targeting 2bw group and clade 2b, but the annealed sequences included mismatches (Table 5 and Supplementary Table 2).

### ***In vitro* evaluation of the specificity of the PCR and qPCR assays.**

Specificity of each PCR and qPCR test was verified on a collection of target and non-target strains, including 34 strains representing the diversity of the *P. syringae* complex species and nine strains colonizing the same ecological niches than VCZ strains being cucurbit pathogens or members of zucchini microbiota (Table 1, and Table 5). The PCR test designed for cluster-A strains detected all strains of the cluster and two strains (P55 and P56) that were classified in cluster B by MLSA. The PCR test designed for cluster B strains detected all targets, including the previously mentioned two strains P55 and P56, and gave a positive signal for *P. coronafaciens* strain CFBP2216. The *in vitro* result obtained for *P. coronafaciens* confirmed the *in silico* annealing on three *P. coronafaciens* genome sequences (Supplementary Table 2). Cluster-C PCR test detected only one of the two cluster-C strains of our collection and gave a cross amplification for *P. amygdali* pv. *phaseolicola* strain CFBP1390. This result was consistent with the perfect match of the primers found *in silico* on four *P. amygdali* pv. *phaseolicola* genome sequences (Supplementary Table 2). The PCR tests designed to identify strains belonging

Table 6. Efficiencies of simplex and multiplex qPCR tests on calibrated DNA extracts

[DNA]	number of genome copy per mL <sup>a</sup>			Mean Cq value (SEM)							
	P99	P66	P129	Simplex			Tetraplex				
				q4Ba <sup>b</sup>	qRpt2 <sup>b</sup>	qZ5 <sup>c</sup>	q2d <sup>d</sup>	q4Ba <sup>b</sup>	qRpt2 <sup>b</sup>	qZ5 <sup>c</sup>	q2d <sup>d</sup>
1 µg/ml	1.65 × 10 <sup>8</sup>	1.62 × 10 <sup>8</sup>	1.61 × 10 <sup>8</sup>	22.43 (0.29)	21.55 (0.15)	21.18 (0.08)	26.27 (0.09)	19.43 (0.09)	19.77 (0.08)	18.34 (0.12)	19.99 (0.07)
100 ng/ml	1.65 × 10 <sup>7</sup>	1.62 × 10 <sup>7</sup>	1.61 × 10 <sup>7</sup>	26.05 (0.13)	25.11 (0.12)	24.20 (0.05)	28.15 (0.41)	22.85 (0.09)	23.19 (0.08)	22.25 (0.27)	24.25 (0.16)
10 ng/ml	1.65 × 10 <sup>6</sup>	1.62 × 10 <sup>6</sup>	1.61 × 10 <sup>6</sup>	29.13 (0.07)	28.49 (0.12)	27.54 (0.12)	32.03 (0.28)	26.36 (0.12)	26.64 (0.10)	25.36 (0.12)	27.66 (0.10)
1 ng/ml	1.65 × 10 <sup>5</sup>	1.62 × 10 <sup>5</sup>	1.61 × 10 <sup>5</sup>	32.69 (0.39)	32.47 (0.17)	30.95 (0.04)	35.91 (0.61)	29.37 (0.05)	30.01 (0.16)	28.79 (0.17)	30.49 (0.27)
100 pg/ml	1.65 × 10 <sup>4</sup>	1.62 × 10 <sup>4</sup>	1.61 × 10 <sup>4</sup>	37.98 (1.93)	35.47 (0.21)	34.22 (0.24)	38.08 (1.01)	33.26 (0.46)	33.93 (0.35)	33.11 (0.01)	33.36 (0.29)
10 pg/ml	1.65 × 10 <sup>3</sup>	1.62 × 10 <sup>3</sup>	1.61 × 10 <sup>3</sup>	38.95 (0.26)	39.05 (0.31)	36.68 (0.67)	37.83	na	na	35.91	37.09
1 pg/ml	1.65 × 10 <sup>2</sup>	1.62 × 10 <sup>2</sup>	1.61 × 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na	na	na	na	na
			Efficiency	82	92.9	95.8	99.8	94.9	92.3	90.2	101
			R <sup>2</sup>	0.963	0.997	0.991	0.994	0.989	0.99	0.995	0.988
			slope	-3.84	-3.505	-3.426	-3.326	-3.451	-3.521	-3.582	-3.299

Values in italics correspond to a unique Cq value. Mean Cq values were calculated on at least two positive values.

<sup>a</sup> The theoretical number of genome copies in DNA solutions was calculated with 1 pg corresponding to 978 Mb and genome sizes to 5.908, 6.185, and 6.044 Mb for P99, P66 and P129, respectively.

<sup>b</sup> mean Cq values obtained for strain P99.

<sup>c</sup> mean Cq values obtained for strain P66.

<sup>d</sup> mean Cq values obtained for strain P129.

to clusters D and E were totally specific with all target strains being detected and no cross reactions being observed among the non-target strains included in our collection. Cluster-F PCR test was designed on publicly available genomic sequences, but could not be in vitro validated as our collection did not include any cluster-F strain. The V2a PCR test reached its assigned aim being specific of strains belonging to clusters D and E. No one cross-reaction was detected. The V2ba-PCR test was also highly specific giving a positive signal for all the strains of clusters A and B and no signal for any non-targeted strains, including the non-target strain CFBP2215, representing *P. syringae* pv. *delphinii*, for which 2 mismatches were found *in silico*. Clade-2bs PCR test designed on P108 genome sequence gave a positive signal for the three strains of our collection (P108, P598p, and CFBP1617) belonging to the 2bs branch, and no cross-amplifications. PCR test designed to detect the clade 2b strains (without 2ba strains) gave a positive signal for seven among the eight 2b strains of our collection and with the clade 2d pathovar *aceris* strain CFBP2339 that was not expected because no match was found in silico for clade 2d genome sequences. All strains of clades 2a and 2ba that matched in silico with four mismatches in one primer gave a negative result in vitro with 2b primers. The qPCR test q2bw designed to detect both clades 2b and 2ba was tested on a subset of the strain collection and was not specific of the group it targeted. It gave many cross reactions with clade-2d strains, one *P. coronafaciens* strain out of two and a low signal with the three *P. amygdali* strains that were tested. The q2bw primers annealed in silico with a few mismatches on clade-2d *P. coronafaciens* and *P. amygdali* genome sequences. In vitro both PCR tests with 2d primers and qPCR test with q2d primers and probe were specific of clade-2d strains. The qPCR tests on *avrRpt2* gave as expected a positive signal for all cluster-A strains, the strain of the pathovar *spinacea* and one strain of pathovar *tomato* among the two tested. The *avrRpt2* qPCR test was also positive for strains P55 and P56 that were assigned to cluster B based on MLSA but cross-reacted with cluster A PCR test. As expected the qPCR test on *hopZ5* was positive for clusters B, C, D and E strains and for the strain of pathovar *actinidiae*. Strains P55 and P56 gave a negative result with the *hopZ5* test. This test targeting *hopZ5* was negative for strains of pathovars *berberidis*, *delphinii*, and *phaseolicola* for which primers matched perfectly in silico but for which the probe annealed with three mismatches (Supplementary Table 2). The 4Ba- qPCR test designed in *syIC* was positive for all VCZ strains and all strains of clades 2b and 2d, including strains P129, P135 and B728A that presented 2 and 3 mismatches in F- and R-primers and none in the probe.

### Development of a multiplex qPCR test to identify VCZ strains

A multiplex TaqMan qPCR test combining primers and probes targeting *syIC*, the two genes encoding the pathogenicity factors *AvrRpt2* and *HopZ5* and the clade-2d strains was developed to detect all VCZ strains and gain information on other contaminations such as those due to 2d strains and *syIC* positive strains. Individually the three PCR tests targeting genes encoding the pathogenicity factors *SyIC*, *AvrRpt2* and *HopZ5* were not specific for VCZ strains. However, VCZ strains are characterized by the simultaneous presence of *syIC* and either *avrRpt2* or *hopZ5*, as *avrRpt2* characterize cluster-A strains that have a narrow host range on cucurbits whereas *hopZ5* is present in strains of clusters B, C, D, E and F with a wider host range (Lacault et al., 2020).

Specificity of each qPCR test was not affected by multiplexing. In silico simulation of multiplex qPCR test with AmplifX did not show any cross reactions between the different pairs of primers and the probes (data not shown). The efficiencies of the qPCR tests were evaluated in simplex and multiplex on serial dilutions of DNA extracted

Table 7. Sensitivity of the multiplex qPCR tests on seed extract spiked with calibrated bacterial suspensions

	[P99] <sup>a</sup>	Mean Cq (SEM)		[P66] <sup>a</sup>	Mean Cq (SEM)		[P135] <sup>a</sup>	Mean Cq (SEM)	
	ufc/mL	<i>sy/C</i>	<i>avrRpt2</i>	ufc/mL	<i>sy/C</i>	<i>hopZ5</i>	ufc/mL	<i>sy/C</i>	clade 2d
<i>First experiment</i>									
	2.46 × 10 <sup>7</sup>	18.16 (0.10)	18.11 (0.06)	3.22 × 10 <sup>7</sup>	20.68 (0.03)	17.48 (0.06)	5.80 × 10 <sup>7</sup>	20.52 (0.12)	17.1 (0.13)
	2.46 × 10 <sup>6</sup>	21.94 (0.21)	21.98 (0.17)	3.22 × 10 <sup>6</sup>	24.81 (0.04)	21.37 (0.03)	5.80 × 10 <sup>6</sup>	23.25 (0.06)	19.93 (0.11)
	2.46 × 10 <sup>5</sup>	25.53 (0.12)	25.74 (0.09)	3.22 × 10 <sup>5</sup>	27.51 (0.12)	24.15 (0.04)	5.80 × 10 <sup>5</sup>	26.13 (0.01)	22.72 (0.28)
	2.46 × 10 <sup>4</sup>	28.01 (0.01)	28.02 (0.05)	3.22 × 10 <sup>4</sup>	31.31 (0.05)	26.56 (0.12)	5.80 × 10 <sup>4</sup>	30.30 (0.21)	26.79 (0.16)
	2.46 × 10 <sup>3</sup>	31.75 (0.14)	31.59 (0.36)	3.22 × 10 <sup>3</sup>		30.89 (0.40)	5.80 × 10 <sup>3</sup>		28.95 (0.08)
	2.46 × 10 <sup>2</sup>	na	na	3.22 × 10 <sup>2</sup>		na	5.80 × 10 <sup>2</sup>		33.28 (0.56)
	2.46 × 10 <sup>1</sup>	na	na	3.22 × 10 <sup>1</sup>		na	5.80 × 10 <sup>1</sup>		na
	0 to 3	na	na	0 to 4		na	0 to 4		na
Efficiency <sup>b</sup>		99.9%	100.9%		94.50	105.2%		104.40	107.6%
R <sup>2</sup>		0.994	0.99		0.994	0.987		0.987	0.99
Slope		-3.325	-3.301		-3.461	-3.202		-3.221	-3.153
<i>Second experiment</i>									
	3.28 × 10 <sup>7</sup>	18.18 (0.15)	17.91 (0.23)	4 × 10 <sup>7</sup>	21.76 (0.12)	18.26 (0.06)	2.04 × 10 <sup>7</sup>	20.97 (0.16)	18.28 (0.14)
	3.28 × 10 <sup>6</sup>	21.48 (0.24)	21.18 (0.18)	4 × 10 <sup>6</sup>	25.61 (0.13)	22.11 (0.08)	2.04 × 10 <sup>6</sup>	23.78 (0.17)	20.99 (0.18)
	3.28 × 10 <sup>5</sup>	25.19 (0.55)	25.02 (0.31)	4 × 10 <sup>5</sup>	27.21 (0.13)	23.81 (0.14)	2.04 × 10 <sup>5</sup>	27.32 (0.14)	24.68 (0.32)
	3.28 × 10 <sup>4</sup>	26.67 (0.17)	27.12 (0.04)	4 × 10 <sup>4</sup>	33.92 (0.39)	27.82 (0.17)	2.04 × 10 <sup>4</sup>	31.78 (0.50)	27.51 (0.13)
	3.28 × 10 <sup>3</sup>	32.5 (0.34)	31.36 (0.50)	4 × 10 <sup>3</sup>		31.79 (0.64)	2.04 × 10 <sup>3</sup>		31.09 (0.23)
	3.28 × 10 <sup>2</sup>	na	na	4 × 10 <sup>2</sup>		na	2.04 × 10 <sup>2</sup>		na
	3.28 × 10 <sup>1</sup>	na	na	4 × 10 <sup>1</sup>		na	2.04 × 10 <sup>1</sup>		na
	0 to 4	na	na	0 to 4		na	0 to 3		na
Efficiency		100.7%	102.9%		83.10	110.8%		89.60	104.7%
R <sup>2</sup>		0.96	0.992		0.934	0.98		0.980	0.994
Slope		-3.306	-3.255		-3.808	-3.088		-3.598	-3.214

<sup>a</sup> Concentration in samples before DNA extraction. Seed extract samples were spiked with serial dilutions of each strain separately. DNAs were extracted from 1 ml of seed sample, resuspended in 30 µl of elution buffer and tested in triplicates with 1 µl per reaction.

<sup>b</sup> Standard curve and qPCR parameters were determined in seed extract matrix.

Table 8. Results of the analysis of naturally contaminated seed lots with the Multiplex qPCR test

Seed lot <sup>a</sup>	Number of seeds per subsample	Mean log genome copies per seed sample <sup>b</sup> (SEM)			
		q4Ba	qZ5	qRpt2	q2d
I	100	5.85 (0.05)	5.66 (0.03)	NA	NA
	100	5.34 (0.38)	5.63 (0.02)	NA	NA
	100	5.58 (0.33)	5.76 (0.01)	NA	NA
	100	5.85 (0.23)	5.77 (0.03)	NA	NA
	100	5.30 (0.41)	5.52 (0.05)	NA	NA
	100	NA	NA	NA	NA
	100	NA	NA	NA	NA
II	100	5.82 (0.21)	5.83 (0.00)	NA	NA
	100	5.77 (0.39)	5.85 (0.01)	NA	NA
	100	5.99 (0.25)	5.99 (0.02)	NA	NA
	100	5.78 (0.18)	5.90 (0.04)	NA	NA
	100	5.58 (0.45)	5.81 (0.02)	NA	NA
	100	NA	NA	NA	NA
	100	NA	NA	NA	NA
III	500	5.57 (0.00)	NA	NA	5.62 (0.05)
	100	5.66 (0.55)	NA	NA	5.54 (0.27)
	100	5.19 (0.89)	NA	NA	6.11 (0.76)
	100	5.64 (0.00)	NA	NA	5.39 (0.25)
	100	NA	NA	NA	NA
	100	NA	NA	NA	NA
IV	500	6.07 (0.18)	4.32 (0.02)	5.96 (0.64)	NA
	100	5.17 (0.35)	2.79 (0.60)	4.88 (0.35)	NA
	100	5.16 (0.36)	2.57 (0.19)	4.77 (0.36)	NA
	100	5.50 (0.27)	3.52 (0.40)	5.07 (0.34)	NA
	100	5.01 (0.34)	3.50 (0.36)	4.54 (0.36)	NA
	100	5.48 (0.31)	3.56 (0.41)	5.34 (0.51)	NA
	10	NA	NA	NA	NA
	10	NA	NA	NA	NA
	10	NA	NA	NA	NA
	10	NA	NA	NA	NA

<sup>a</sup> Seed lots I to III were produced in France in 2019 and IV in China in 2020.

<sup>b</sup> The number of genome copies per sample of 100 or 500 seeds was the number genome copies in 1 µl of PCR reaction multiplied by the total volume of extracted DNA and by the total volume of seed soaking. Samples were amplified in two different experiments and two different equations were used to calculate the number of genome copies per reaction.



from each target strain. Parameters such as PCR efficiency and  $R^2$  of regression curves were correct in both simplex and multiplex, except for q4Ba test whose efficiency was better in multiplex than in simplex (Table 6). Specificity of each qPCR was identical in multiplex and in simplex (data not shown).

The LOD was defined as the lowest concentration giving a positive result in, at least, two out of the triplicates. The LOD of each qPCR test on calibrated DNA solutions in multiplex was  $100 \text{ pg.mL}^{-1}$  (0.1 pg per reaction corresponding to 16 genome copies), but was 10 times better in simplex for q4Ba, qRpt2 and qZ5 tests (Table 6). Similarly, LODs in multiplex were  $2.04 \times 10^4$ ,  $2.46 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ , and  $5.80 \times 10^3 \text{ CFU.ml}^{-1}$  (corresponding to 20, 25, 40 and 6 CFUs per reaction) were obtained with boiled calibrated bacterial suspensions for q4Ba, qRpt2, qZ5 and q2d, qPCR respectively. (Supplementary Table 3). Similar results were obtained in the second experiment, the apparent better LOD for q2d qPCR with bacterial suspensions was observed in two independent experiments (Supplementary Table 3).

### **Analysis of spiked and commercial seed lots with the newly developed multiplex qPCR test**

Seed extracts were spiked with calibrated bacterial suspensions to determine the LOD of the multiplex qPCR test. Strains P99, P66 and P135 were inoculated individually in different seed extracts (batches of 500 seeds soaked in buffer). For each strain, serial dilutions of a calibrated suspension were inoculated in different seed extract subsamples. Experiment was realized twice with different inocula and seed extracts. A preliminary step of DNA extraction was performed to avoid potential PCR inhibitors present in seed extracts. DNAs were extracted from 1 could potentially be concentrated 33-fold. Samples (1  $\mu\text{L}$  per reaction) were amplified in triplicates with the multiplex qPCR test. The LODs of the spiked seed extracts corresponded to  $2.46 \times 10^3$ ,  $2.46 \times 10^3$ ,  $3.22 \times 10^3$ ,  $2.46 \times 10^3$ , and  $5.80 \times 10^2 \text{ CFU.ml}^{-1}$  for q4Ba, qRpt2, qZ5 and q2d, respectively (Table 7). The parameters of the standard curve on DNAs extracted from spiked seed-extracts (Table 7) were not different from those obtained on pure bacterial suspensions (Supplementary Table 4). These LODs were globally 10 times lower than the LODs obtained for pure calibrated bacterial suspensions (Table 6, Table 7, and Supplementary Table 4). This was probably due to the increase of DNA concentration during extraction and to the absence of inhibitors after DNA extraction. Thus, the protocol used to extract bacterial DNA seemed to be adapted to discard inhibitors from seed and recover bacterial DNA with a quality compatible with qPCR.

Four seed lots (I to IV) were analyzed with the Multiplex qPCR test after DNA extraction on seed extracts. All seed lots were contaminated (Table 8). Based on the number of seeds per subsample, the number of subsamples, and the number of positive subsamples, contamination rates of seed lots I to IV were estimated at 1.24%, 1.24%, 0.9% and 2.4%, respectively, according to Maury's formula for subsamples of the same size (Maury et al, 1985), or to Swaroop's tables for subsamples with decreasing sizes (Swaroop, 1951). Seed lots I and II were contaminated at the same rate (1.2%). For each lot, bacterial concentrations were similar in the same subsamples for *hopZ5* and *syIC* PCR tests. This strongly suggested a contamination with a VCZ strain with a wide host range. Seed lot III was contaminated at 0.9% probably with a clade 2d strain. Seed lot IV corresponded to a disinfected seed lot that was resistant to disinfection. Because the number of genome copies estimated for *syIC* and *avrRpt2* markers were similar, this lot was probably contaminated with a cluster-A strain.





## Discussion

The aim of the study was to provide tools to detect, identify, characterize and quantify strains belonging to the *P. syringae* species complex that are affecting zucchini seed production. The new MLSA scheme based on seven genes allowed the characterization of the whole collection of VCZ strains and additional strains isolated from zucchini seeds and plants from seed production fields. Two VCZ strains were identified in the cluster C, indicating that VCZ strains are present in five clusters among the six that were previously described for strains pathogenic on cucurbits (Lacault et al. 2020). MLSA revealed that strains belonging to clades 2b and 2d did not form clusters, unlike strains belonging to clades 2a and 2ba. The clade-2b and 2d strains caused some symptoms on zucchini plantlets, but were less aggressive than VCZ control and did not induce severe stunting of seedlings as the VCZ control did. Genome analysis of clade-2d strains revealed small T3E repertoires like PG2 genome sequences in general (Dillon et al. 2019). They had less T3Es in common with VCZ-clusters strains than the clade-2b strain P108. Strains of clades 2b and 2d lacked *hopA1* which is shared by all VCZ strains (Lacault et al. 2020) and was reported to be present in all the strains responsible for epidemics on cucurbits in USA (Newberry et al 2019). Hence, we consider that 2b and 2d strains are not agents of VCZ, even if they are associated to zucchini and mildly pathogenic on this plant.

In order to detect and identify VCZ and related strains, we followed two strategies in combination: the use of genes encoding pathogenicity factors and the search of phylogenetic markers to improve the qPCR test based on *syIC*. The *syIC* test detects all VCZ strains of clades 2a and 2ba and also other strains within clades 2b and 2d. This gene encodes syringolin A, a toxin secreted by strains of phylogroups 2 and 4 (Dillon et al. 2019b). Primers and probes did not anneal *in silico* on PG-4 genomes and did not give a cross reaction *in vitro* with the two PG-4 strains of our collection. The test based on *syIC* was multiplexed with qPCR tests targeting *avrRpt2* and *hopZ5*. The gene encoding the T3E *AvrRpt2* is present in all VCZ strains that have a narrow host range on cucurbits (Lacault et al. 2020) but also in the pathovar *tomato* (Innes et al. 1993) and was found in some strains of pathovars *maculicola*, *spinaceae* et *tagetis* that were not known to have it. Indeed, *avrRpt2* was not included in the large analysis of the distribution of virulence encoding genes including 53 T3Es in *P. syringae* made by Sarkar et al. (2006). A blastn confirmed that those strains have the complete gene sequence in their genome. As none of these strains, including those of the pathovar *tomato*, gave a positive signal *in silico* with the qPCR test based on *syIC* and neither *in vitro* for the strain of pathovar *tomato*, their reaction pattern using our multiplex test would be different to that of VCZ strains. The gene encoding the T3E *hopZ5* is present in VCZ strains having a wide cucurbit host range and in the pathovar *actinidiae*, in which this T3E was described (Jarayaraman et al. 2017). The pathovar *actinidiae* was not detected with the *syIC* qPCR, and hence will give a different pattern than VCZ strains with our multiplex test. Finally, the marker for clade 2d identifies cucurbit-associated 2d strains that represent a low risk for the zucchini-seed sector.

Specificity of the multiplex qPCR test was based on the combined results of different tests that were not individually specific, except the qPCR test design to detect clade 2d strains. To be perfectly reliable, this multiplex qPCR test should be performed on isolated clones, because on crude seed extracts, it cannot be excluded that



positive signals could arise from a mixture of strains. Such a warning was previously stated for a multiplex PCR test, based on the simultaneous detection of two genes encoding T3Es, dedicated to the identification of common bacterial blight agents (Boureau *et al.* 2013). More generally, it is a high risk for detection tests based on T3Es or other virulence factors that are easily transferable among strains, the repertoire of which evolved rapidly (Baltrus *et al.* 2011; Dillon *et al.* 2019a). Recombination and horizontal gene transfers were highlighted by several comparative genomic studies within the *P. syringae* species complex (Baltrus *et al.* 2017; Hulin *et al.* 2018; Dillon *et al.* 2019b; Newberry *et al.* 2019). However, the quantification of each marker that is possible with qPCR could help to know if marker-corresponding population sizes are compatible or not with single or mix contaminations. Furthermore, subsampling which is performed to determine seed lot contamination rates (ISTA, 2015) could bring complementary arguments about single or mix contaminations according to their distributions simultaneously in the same subsamples or separately in different subsamples. The choice of targeting genes involved in pathogenicity could give clues to discriminate strains according to their interactions with plants, as was shown for *P. syringae* (Sarkar *et al.* 2006) and *Xanthomonas* (Hajri *et al.* 2009), but not for *Ralstonia solanacearum* (Peeters *et al.* 2013). For example, the test based on the gene encoding SyrD, which is involved in the secretion of syringomycin and syringopeptin, is used to discriminate the strains of the pathovar *syringae* from those of pv. *morsprunorum* on cherry tree or from those of pv. *pisi* on pea (Bulthreys and Gheysen 1999). Another example is the harpin HrpZ, whose encoding gene is the preferred target for the detection of the pathovar *tomato*. Primers are designed in specific regions within a gene which is distributed among many pathovars. This gene is still used to develop different types of PCR test (Zaccardelli *et al.* 2005, Chen *et al.* 2020, Chai *et al.* 2020).

The protocol we used to test seeds was based on seed soaking in 3 mL of buffer /g of seeds and DNA was extracted from 1 mL of seed extract with magnetic beads. It was adapted to discard PCR inhibitors present in zucchini seed extracts. The LOD of the multiplex qPCR test for spiked seed samples was as low as  $2.5 \times 10^3$  CFU.ml<sup>-1</sup> corresponding to  $7.5 \times 10^3$  CFU.g<sup>-1</sup> of seeds. DNA extraction protocol included a first step of centrifugation followed by several purification steps and elution in a smaller volume than the initial volume allowing to concentrate the samples (33 x enrichment) without concentrating PCR inhibitors, which is important for PCR because sensitivity of the method is limited by the small size of the analyzed volume. Efficiencies of qPCRs were as good on spiked seed extracts after DNA extraction as on bacterial suspensions. The adaptation of the DNA extraction protocol is crucial to the success of the test, because the presence of polymerase inhibitors from plant material can have negative repercussions on assay performance and not all protocols are adapted to all matrix (Lau and Botella, 2017). For example, for the same DNA extraction protocol, the efficiency of detection of *Xylella fastidiosa in planta* could vary according to plant matrix probably due to abundant inhibitors such as polyphenols and polysaccharides. The negative impact may decrease by 10 to 100 times the LOD of the test in plant material in comparison with bacterial suspensions (Dupas *et al.* 2019).

Developing specific PCR tests to identify clusters and groups within phylogroup 2 was not easy for all groups. Specificity of primers was evaluated on well-characterized genome and strain collections. To evaluate the specificity of the PCR tests we developed, we used a set of 194,450 genomes (those present in the march 2019 release of NCBI database plus 23 VCZ-strain genomes that were published in 2020). To be able to analyze *in silico* the specificity of primers and probes for PCRs based on phylogenetic markers, especially within the *P.*



*syringae* species complex, encompassing many unclassified *P. syringae* strains, we determined the list of genomes per targeted group and the phylogenetic position of cross reacting genomes using the rapid KISonWGS tool, based on shared K-mer approach. This method highlighted all the genomes of the different groups in the database and avoided all false positive or negative due to wrong naming of strains. For example, one strain of *P. coronafaciens* pv *striafaciens*, strain ICMP 4996, was classified in the clade 2b based on its genomic sequence, which corresponds to the species *P. syringae* (sensu Gomila et al. 2017) and not into the true species *P. coronafaciens*, recently proposed (Gomila et al. 2017) and described (Dutta et al. 2018). Using this database, we found that all primers were not completely exclusive of the target group because they were present in genomes that were not included in the outgroup of our dataset (118 genomes). For example, cross reactions were found between cluster-B primers and three genomes of *P. coronafaciens*, between cluster-D primers and two other genomes of *P. coronafaciens*. All these cross-reacting genomes were negative for the qPCR test based on *syIC* and also for PCR tests targeting the groups A plus B and D plus E. However, some cross-reacting genomes revealed strains with in-between genotypes. It was the case for the genome of strain 1188, isolated from *C. pepo* var. *melopepo* in California. The strain would probably be positive for the *syIC* test (same mismatches in primers than other clade 2b strains that are positive *in vitro*). It belonged to clade 2b according to the k-mer phylogenetic tree and gave a perfect *in silico* match with the 2bs primers. But, the genome matched also perfectly with cluster-A and *avrRpt2* primers. Cluster-A primers were chosen in another gene than *avrRpt2*, however this gene was located in the same region corresponding to an integrative and conjugative element (ICE) that was identified as a spot of genetic exchanges (Newberry et al. 2019). Thus, this clade-2b strain was concerned by HGT of the same genes in the ICE than cluster A strains. The case of strains P55 and P56 illustrated also a similar in-between situation. Strains P55 and P56 were identified as cluster B by MLSA and cluster-B PCR, but were also positive for cluster-A PCR and *avrRpt2* PCRs and were negative for *hopZ5* PCR. Once again, the involved genes were located within the ICE. Some cases of misallocation were also previously reported for PCRs targeting larger groups. For example, Borshinger et al (2015) proposed several multiplex PCRs to identify phylogroups within the *P. syringae* species complex and obtained specific tests for phylogroups 3 and 9, but observed cross reactions in particular for the phylogroups 2 and 13.

The multiplex qPCR test developed in this work could be useful for epidemiological purposes to improve our knowledge on VCZ and constitute also an informative complement for the seed sector to the qPCR test in-use that is based on *syIC*. It was possible in one step to identify different types of contaminations, to quantify them and, by the means of subsampling to determine the contamination rates of the seed lots. Compared to pre-existing methods (qPCR based on *syIC*, strain isolation in positive samples and MLSA characterization) this method is particularly fast and cost-effective. It could be useful for epidemiological studies aiming at identifying the sources of inoculum in parental seed lots or in the environment of the seed production fields. The multiplex qPCR test will be very useful for seed testing because it provides information on the risk associated with contaminations present in the seed lots. Depending if the seeds are contaminated by a strain with *avrRpt2* or *hopZ5*, the risk will concern only *Curcubita* sp or also other cucurbit crops such as melons, cucumber and watermelon. It should be highlighted that some VCZ strains are phylogenetically close to strains isolated in the USA that are responsible for epidemics in cucurbit fields (Newberry et al. 2016 and 2019). The subsampling of seed lots allows detection and quantification of mixed infections. The detection limit of this method is to  $5 \times 10^5$  CFU/per sample of 500



seeds (taking into account of 1,000 seeds weight of 145 g). It would be interesting to determine the epidemiological risk associated with this detection threshold, for example by the survey of fields sown with contaminated seed lots, and would inform on the need of improving the sensitivity of this detection tool for seed testing.





## REFERENCES

- Amrein, H., Makart, S., Granado, J., Shakya, R., Schneider-Pokorny, J., and Dudler, R. (2004). Functional analysis of genes involved in the synthesis of Syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D-R. *Mol Plant Microbe Interac* 17, 90-97.
- Baltrus, D. a., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S. R., Jones, C. D., and Dangl, J. L. (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 7, e1002132.
- Baltrus, D. A., and Orth, K. N. (2018). Understanding genomic diversity in *Pseudomonas syringae* throughout the forest and on the trees. *New Phytol* 219, 482-484.
- Bereswill, S., Bugert, P., Volksch, B., Ullrich, M., Bender, C. L., and Geider, K. (1994). Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products. *Appl Environ Microbiol* 60, 2924-2930.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., and Morris, C. E. (2014). A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex. *PLoS ONE* 9, e105547.
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J. F., Buisson, E., and Morris, C. E. (2016). A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J Appl Microbiol* 120, 714-23.
- Boureau, T., Kerkoud, M., Chhel, F., Hunault, G., Darrasse, A., Brin, C., Durand, K., Hajri, A., Poussier, S., Manceau, C., Lardeux, F., Saubion, F., and Jacques, M. A. (2013). A multiplex-PCR assay for identification of the quarantine plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *J. Microbiol. Methods* 92, 42-50.
- Briand, M., Gaborieau, R., Jacques, M.-A., Barret, M., Boureau, T., Gaillard, S., and Chen, N. W. G. (2016). SkIf: a tool for rapid identification of genes or regulators of interest. *FRResearch* 5. doi: 10.7490/f1000research.1112490.1
- Briand, M., Bouzid, M., Hunault, G., Legeay, M., Fischer-Le Saux, M., and Barret, M. (2019). A rapid and simple method for assessing and representing genome sequence relatedness. *bioRxiv* 569640.
- Bultreys, A., and Gheysen, I. (1999). Biological and molecular detection of toxic lipodepsipeptide-producing *Pseudomonas syringae* strains and PCR identification in plants. *Appl Environ Microbiol* 65, 1904-1909.
- Cai, R., Lewis, J., Yan, S., Liu, H., Clarke, C. R., Campanile, F., Almeida, N. F., Studholme, D. J., Lindeberg, M., Schneider, D., Zaccardelli, M., Setubal, J. C., Morales-Lizcano, N. P., Bernal, A., Coaker, G., Baker, C., Bender, C. L., Leman, S., and Vinatzer, B. A. (2011). The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity. *PLoS Pathog* 7, e1002130.
- Chai, A. L., Ben, H. Y., Guo, W. T., Shi, Y. X., Xie, X. W., Li, L., and Li, B. J. (2020). Quantification of Viable Cells of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato seed using propidium monoazide and a Real-Time PCR Assay. *Plant Dis* 104, 2225-2232.

- Chen, Z.-D., Kang, H.-J., Chai, A. L., Shi, Y.-X., Xie, X.-W., Li, L., and Li, B.-J. (2020). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in planta. *European Journal of Plant Pathology* 156, 739-750.
- Demba Diallo, M., Monteil, C. L., Vinatzer, B. A., Clarke, C. R., Glaux, C., Guilbaud, C., Desbiez, C., and Morris, C. E. (2012). *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *ISME J* 6, 1325-35.
- Denance, N., Briand, M., Gaborieau, R., Gaillard, S., and Jacques, M. A. (2019). Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 20, 239.
- Dillon, M. M., Almeida, R. N. D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., and Guttman, D. S. (2019a). Molecular Evolution of *Pseudomonas syringae* Type III Secreted Effector Proteins. *Front Plant Sci* 10, 418.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., and Guttman, D. S. (2019b). Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol* 20, 3.
- Dupas, E., Briand, M., Jacques, M. A., and Cesbron, S. (2019). Novel Tetraplex Quantitative PCR Assays for Simultaneous Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies in Plant Tissues. *Front Plant Sci* 10, 1732.
- Dutta B, Gitaitis R, Agarwal G, Coutinho T, and D, L. (2018). *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PLOS ONE* 13.
- Gallelli, A., Talocci, S., Pilotti, M., and Loreti, S. (2014). Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathology* 63, 264-276.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., Garcia-Valdes, E., and Lalucat, J. (2017). Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Front Microbiol* 8, 2422.
- Guilbaud, C., Morris, C. E., Barakat, M., Ortet, P., and Berge, O. (2016). Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group. *FEMS Microbiol Ecol* 92.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., Boureau, T., and Poussier, S. (2009). A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS ONE* 4, e6632.
- Hulin, M. T., Armitage, A. D., Vicente, J. G., Holub, E. B., Baxter, L., Bates, H. J., Mansfield, J. W., Jackson, R. W., and Harrison, R. J. (2018). Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* reveals convergent gene gain and loss associated with specialization onto cherry (*Prunus avium*). *New Phytol* 219, 672-696.
- Hwang, M. S., Morgan, R. L., Sarkar, S. F., Wang, P. W., and Guttman, D. S. (2005). Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 71, 5182-91.
- Innes, R. W., Bent, A. F., Kunkel, B. N., Bisgrove, S. R., and Staskawicz, B. J. (1993). Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.* 175, 4859-4869.

- ISTA (2015). Procedure Organizing and analyzing results of the Seed Health Proficiency tests. <https://www.seedtest.org/upload/cms/user/PT-P-03OrganizingandAnalyzingPTs-V1.1.pdf>
- Jayaraman, J., Choi, S., Prokchorchik, M., Choi, D. S., Spiandore, A., Rikkerink, E. H., Templeton, M. D., Segonzac, C., and Sohn, K. H. (2017). A bacterial acetyltransferase triggers immunity in *Arabidopsis thaliana* independent of hypersensitive response. *Sci Rep* 7, 3557.
- Khalaf, E. M., and Raizada, M. N. (2016). Taxonomic and functional diversity of cultured seed associated microbes of the cucurbit family. *BMC Microbiol* 16, 131.
- Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-91.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Lacault, C., Briand, M., Jacques, M. A., and Darrasse, A. (2020). Zucchini Vein Clearing Disease Is Caused by Several Lineages Within *Pseudomonas syringae* Species Complex. *Phytopathology* 110, 744-757.
- Lamichhane, J. R., Fabi, A., and Varvaro, L. (2014). Bacterial Species Associated to Brown Spots of Hazelnut in Central Italy: Survey, Isolation and Characterization. *Acta Horticulturae*, 243-251.
- Lamichhane, J. R., Messéan, A., and Morris, C. E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of General Plant Pathology* 81, 331-350.
- Langston, D. B., Sanders, F. H., Brock, J. H., Gitaitis, R. D., Flanders, J. T., and Beard, G. H. (2003). First report of a field outbreak of a bacterial leaf spot of cantaloupe and squash caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Georgia. *Plant Dis.* 87, 600.
- Lau, H. Y., and Botella, J. R. (2017). Advanced DNA-Based Point-of-Care Diagnostic Methods for Plant Diseases Detection. *Front Plant Sci* 8, 2016.
- Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., et al. 2012. SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler [published correction appears in *GigaScience* 2015;4]. *Giga-Science* 1, 18.
- Manceau, C., Gironde, S., Briand, B., and Lybeert, H. (2011). Means and methods for detecting and identifying a novel bacterium responsible for phytosanitary disorders in plants (zucchini) and novel resistant plants. Patents, #WO2011003984, World Intellectual Property Organization, Geneva, Switzerland.
- Marcelletti, S., and Scortichini, M. (2014). Definition of Plant-Pathogenic *Pseudomonas* Genomospecies of the *Pseudomonas syringae* Complex Through Multiple Comparative Approaches. *Phytopathology* 104, 1274-82.
- Meng, X. L., Xie, X. W., Shi, Y. X., Chai, A. L., Ma, Z. H., and Li, B. J. (2017). Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on *hrpZ* gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves. *J Appl Microbiol* 122, 441-449.
- Monteil, C. L., Yahara, K., Studholme, D. J., Mageiros, L., Meric, G., Swingle, B., Morris, C. E., Vinatzer, B. A., and Sheppard, S. K. (2016). Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microb Genom* 2, e000089.

- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R., and Pitrat, M. (2000). The Relationship of Host Range, Physiology, and Genotype to Virulence on Cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from Cantaloupe Blight Epidemics in France. *Phytopathology* 90, 636-646.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., and Berge, O. (2013). The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes. *Annu Rev Phytopathol* 51, 85-104.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., Bouzar, H., Goss, E. M., Jones, J. B., Bull, C. T., and Paret, M. L. (2016). Angular Leaf Spot of Cucurbits is Associated With Genetically Diverse *Pseudomonas syringae* Strains. *Plant Dis.* 100, 1397-1404.
- Newberry, E. A., Ebrahim, M., Timilsina, S., Zlatković, N., Obradović, A., Bull, C. T., Goss, E. M., Huguet-Tapia, J. C., Paret, M. L., Jones, J. B., and Potnis, N. (2019). Inference of Convergent Gene Acquisition Among *Pseudomonas syringae* Strains Isolated From Watermelon, Cantaloupe, and Squash. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Nowell, R. W., Laue, B. E., Sharp, P. M., and Green, S. (2016). Comparative genomics reveals genes significantly associated with woody hosts in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Pathol* 17, 1409-1424.
- Paris, H. S., Doron-Faigenboim, A., Reddy, U. K., Donahoo, R., and Levi, A. (2015). Genetic relationships in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as viewed with high frequency oligonucleotide-targeting active gene (HFO-TAG) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 62, 1095-1111.
- Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A.-C., and Genin, S. (2013). Répertoire, unifiée nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species 14, 859.
- Prosen, D., Hatziloukas, E., Schaad, M. W., and Panopoulos, N. J. (1993). Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. *Phytopathology* 83, 965-970.
- Ruinelli, M., Blom, J., Smits, T. H. M., and Pothier, J. F. (2019). Comparative genomics and pathogenicity potential of members of the *Pseudomonas syringae* species complex on *Prunus* spp. *BMC Genomics* 20, 172.
- Sarkar, S. F., Gordon, J. S., Martin, G. B., and Guttman, D. S. (2006). Comparative genomics of host-specific virulence in *Pseudomonas syringae*. *Genetics* 174, 1041-56.
- Sedighian, N., Shams-bakhsh, M., Osdaghi, E., and Khodaygan, P. (2014). Etiology and host range of bacterial leaf blight and necrosis of squash and muskmelon in Iran. *J Plant Pathol* 96, 507-514.
- Xin, X. F., Kvitko, B., and He, S. Y. (2018). *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat Rev Microbiol* 16, 316-328.
- Zaccardelli, M., Spasiano, A., Bazzi, C., and Merighi, M. (2005). Identification and *in planta* detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of hrpZ<sub>Pst</sub>. *Eur J Plant Pathol* 111, 85-90.
- Zerbino, D. R., and Birney, E. (2008). Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 18, 821-829.







## Données complémentaires

Supplementary table 1. List of genome sequences used in this study and results of in silico analyses.

Strains	Origin	Host	Year	Phylogroup	Genome	in and out groups of genomes for search of phylogenetic markers										# mismatches in F-R PCR primers or in F-P-R qPCR primers and probe found with Primersearch																	
						CIA	CIB	CIC	CID	CIE	CIF	V2a	2b-a	2bs	2b	2bw	2d	CIA	CIB	CIC	CID	CIE	CIF	V2a	2b-a	2bs	2b	q2bw	2d	q2d	q48a	qRpt2	qZ5
CFBP 8693 (P99)	France	<i>Cucurbita pepo</i>	2005	PG2b-a	SAMN12305539	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P12832	France	<i>C. pepo</i>	2006	PG2b-a	SAMN12284164	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P12854	France	<i>C. pepo</i>	2002	PG2b-a	SAMN12284309	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P12855	Chile	<i>C. pepo</i>	2007	PG2b-a	SAMN12284728	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P113	Thailand	<i>C. pepo</i>	2011	PG2b-a	SAMN12288386	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P118	France	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288431	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P121	Chile	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288432	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P123	China	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288472	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P127	India	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288592	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P139	China	<i>C. pepo</i>	2015	PG2b-a	SAMN12288625	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P22	USA	<i>C. pepo</i>	2009	PG2b-a	SAMN12288683	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P5	France	<i>C. pepo</i>	2008	PG2b-a	SAMN12288805	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P79	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2b-a	SAMN12289058	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P84	China	<i>C. pepo</i>	2010	PG2b-a	SAMN12289072	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
P12831 (co7A)	France	<i>C. pepo</i>	2005	PG2b-a	SAMN12289147	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
PS711	Serbia	<i>Cucurbita sp.</i>	2013	PG2b-a	SAMN10486866	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
13-509A	Florida	<i>Cucurbita sp.</i>	2013	PG2b-a	SAMN06263769	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	0-0-0	N/A	
13-C2	Florida	<i>Citullus lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06263768	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	4-3	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
13-140A	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06256456	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	4-3	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
14-410	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06270325	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	3-4	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
14-32	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06257475	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	3-4	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
14-Gil	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06317944	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	4-3	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
P12857	France	<i>C. pepo</i>	2007	PG2b-a	SAMN12288124	out	in	out	out	out	out	in	out	out	in	out	4-3	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
<i>P. syringae</i> CC457	France	<i>Cucumis melo</i>	PG2b-a	SAMN02471568	out	in	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	3-4	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
ZUM3584	Italy	<i>Cucurbita sp.</i>	2005	PG2b-a	SAMN06318381	out	out	in	out	out	out	in	out	out	in	out	3-4	N/A	0-0	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
HS191 (pv. <i>syringae</i> )	Australia	<i>Panicum miliaceum</i>	1969	PG2b-a	SAMN03267749	out	out	out	out	out	out	in	out	out	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	4-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
P77	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288854	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
P73	USA	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288853	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
P78	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288860	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
P87	China	<i>C. pepo</i>	2011	PG2a	SAMN12289083	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
03-19A	Florida	<i>Cucumis melo</i>	2003	PG2a	SAMN06263767	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
200-1	Georgia	<i>Cucurbita sp.</i>	2000	PG2a	SAMN06318380	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
<i>Pseudomonas</i> sp BS3759	na	na	na	PG2a	SAMN05444502	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
<i>Pseudomonas</i> sp BS3767	na	na	na	PG2a	SAMN05444503	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	2-4	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
CFBP 8692 (P66)	Thailand	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12305548	out	out	out	out	in	out	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
P89	France	<i>C. pepo</i>	2011	PG2a	SAMN12289141	out	out	out	out	in	out	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
<i>P. syringae</i> BS2122 (pv. <i>lachrym</i> )	na	na	na	PG2a	SAMN05444505	out	out	out	in	out	out	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
BS2121	California	<i>Cucurbita sp.</i>	2006	PG2a	SAMN06317958	out	out	out	out	in	out	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
ZUM3984	China	<i>Cucurbita sp.</i>	2008	PG2a	SAMN06318038	out	out	out	out	in	out	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0
13-139B	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06317916	out	out	out	out	out	in	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-3	N/A	N/A	4-1	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
13-429	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06318302	out	out	out	out	out	in	in	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	3-0	N/A	N/A	4-1	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	0-0-0	
CFBP 2356 <sup>PT</sup> (pv. <i>dysoxyl</i> )	NZ	<i>Dysoxylum spectabile</i>	1949	PG2a	SAMN12253512	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-0	0-1-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
Cit7 ( <i>P. syringae</i> )	na	<i>Citrus sinensis</i>	na	PG2a	SAMN02471314	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-1	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
<i>Pseudomonas</i> sp ICMP10191	China	<i>Actinidia deliciosa</i>	1981	PG2a	SAMN04102816	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
<i>Pseudomonas</i> sp NFAACC10-1	na	switchgrass endoph	na	PG2a	SAMN03159505	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
<i>Ps. syringae</i> BRIP39023	Australia	<i>H. vulgare</i>	1971	PG2a	SAMN02469654	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	4-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-1	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
<i>P. syringae</i> ICMP 11293	New Zealand	<i>A. deliciosa</i>	1991	PG2a	SAMN04102819	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-0	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
A2 (pv. <i>syringae</i> )	na	<i>Pyrus calleryana</i>	na	PG2a	SAMN03837777	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-1	0-2-1	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A	
<i>P. syringae</i> 31R1	na																																

Strains	Origin	Host	Year	Phylogroup	Genome	in and out groups of genomes for search of phylogenetic markers																		# mismatches in F-R PCR primers or in F-P-R qPCR primers and probe found with Primersearch										
						CIA	CIB	CIC	CID	CIE	CIF	V2a	2b-a	2bs	2b	2bw	2d	CIA	CIB	CIC	CID	CIE	CIF	V2a	2b-a	2bs	2b	q2bw	2d	q2d	q48a	qRpt2	qZ5	
						out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A
P108	Chile	<i>C. pepo</i>	2011	PG2b	SAMN12288112	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	0-0-0	N/A	N/A
CFBP 1617 <sup>PT</sup> (pv. aptata)	USA	<i>Beta vulgaris</i>	1959	PG2b	SAMN03976295	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
P. syringae CC440	France	<i>Cucumis melo</i>	2002	PG2b	SAMN02471571	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
DSM 50252 (pv. aptata)	USA	<i>sugar beet</i>	1902	PG2b	SAMN02471325	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
P. syringae BS3825	na	na	na	PG2b	SAMN05444063	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae BS3829	na	na	na	PG2b	SAMN05444062	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
CRAFRU11 (pv syringae)	Italy	<i>C. avellana</i>	2004	PG2b	SAMN03482996	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
FF5 (pv syringae)	USA	<i>Pyrus calleryana</i>	1988	PG2b	SAMN00002873	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
Alf3 (pv syringae)	USA	<i>Medicago</i>	2004	PG2b	SAMN02870642	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
P. syringae BSO292	na	na	na	PG2b	SAMN05444065	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae BS3827	na	na	na	PG2b	SAMN05444507	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
CFBP 1392 <sup>T</sup> (pv. syringae)	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	1951	PG2b	SAMN03976255	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae BRIP34876	Australia	<i>Hordeum vulgare</i>	1971	PG2b	SAMN02469653	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae BRIP34881	Australia	<i>H. vulgare</i>	1971	PG2b	SAMN02469652	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae CC1458	USA	<i>Primula pauciflora</i>	2005	PG2b	SAMN02471556	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
P. syringae CC1543	France	lake water	2006	PG2b	SAMN02471554	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
P. syringae DSM 10604	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	na	PG2b	SAMN02952971	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae ICMP 11168	New Zealand	<i>A. deliciosa</i>	1991	PG2b	SAMN04102817	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
P. syringae KCTC 12500	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	1951	PG2b	SAMN02404616	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
LMG 5095 <sup>1</sup> (pv atrofaciens)	New Zealand	<i>Triticum</i>	1968	PG2b	SAMN02687465	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
ICMP 4394 (pv atrofaciens)	New Zealand	<i>Triticum aestivum</i>	na	PG2b	SAMN03976252	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
DSM_50255 (pv atrofaciens)	na	<i>Triticum</i>	na	PG2b	SAMN02471577	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
MAFF 301072 PT (pv japonica)	na	<i>H. vulgare</i>	na	PG2b	SAMN02471312	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
ATCC 10859 (pv lapsa)	na	<i>T. aestivum</i>	2014	PG2b	SAMN03774723	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
ICMP 3947 (pv lapsa)	na	seed of Zea sp.	1968	PG2b	SAMN03976249	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
LMG 2367 (pv panici)	na	<i>Panicum miliaceum</i> L	na	PG2b	SAMN02472179	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-3	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
642 (pv syringae)	USA	unidentified weed	2007	PG2b	SAMN02472094	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
B64 (pv syringae)	USA	<i>T. aestivum</i>	na	PG2b	SAMN02472031	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
41a (pv syringae)	France	<i>Prunus armeniaca</i>	2011	PG2b	SAMN03328983	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
MB03 (pv syringae)	China	<i>Populus lasiocarpa</i> O	2006	PG2b	SAMN03418705	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
2507 (pv syringae)	Russia	<i>T. aestivum</i>	2012	PG2b	SAMN05182240	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A	
1845 (pv syringae)	Russia	<i>Helianthus annuus</i>	2010	PG2b	SAMN05182452	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
SM (pv syringae)	USA	<i>Triticum aestivum</i>	na	PG2b	SAMN02472030	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
UB0390 (pv syringae)	France	river water	2007	PG2b	SAMN02929202	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
P. syringae B576	China	na	na	PG2b	SAMN03104821	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0	0-0-0	N/A	N/A	3-0-2	N/A	N/A
1704B (pv pisi)	na	na	na	PG2b	SAMN02471313	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	2-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
PP1 (pv pisi)	Japan	<i>Pisum sativum</i>	na	PG2b	SAMN02471574	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
CRAFRU12 (pv syringae)	Italy	<i>C. avellana</i>	2004	PG2b	SAMN03482997	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
NCPPB 4273 <sup>PT</sup> (pv. coryli)	Italia	<i>Corylus avellana</i>	1995	PG2b	SAMN03481961	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
ISPaVe013 (pv avellananae)	Italy	<i>C. avellana</i>	1991	PG2b	SAMN02471968	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	4-2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
ISPaVe037 (pv avellananae)	Italy	<i>C. avellana</i>	1993	PG2b	SAMN02471963	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
ICMP 17001 <sup>PT</sup> (pv coryli)	Italy	<i>C. avellana</i>	na	PG2b	SAMN03976285	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	4-4	N/A	0-0	0-0-0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
CFBP 7019 <sup>PT</sup> (P. congelans)	Germany	<i>Poaceae</i>	1994	PG2c	SAMN03976302	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
P. congelans LMG 21466 <sup>T</sup>	Germany	phyllosphere of gras	2002	PG2c	SAMN05216596	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	3-4	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
P129	China	<i>C. pepo</i>	2013	PG2d	à déposer	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0-0-1	0-0	0-0-0	0-0-0	N/A	N/A		
P135	India	<i>C. pepo</i>	2014	PG2d	à déposer	out	out	out	out	out	out	out	out	in	in	in	in	out	N/A	N/A	N/A													



Supplementary Table 2. Results of Primersearch for in silico annealing of primers. Result for classical PCRs.

Tableau très large, envoi sur demande par e-mail : [lacault.caroline@gmail.com](mailto:lacault.caroline@gmail.com)

Supplementary table 3. Mean Cq value (SEM) for each qPCR in Multiplex on calibrated bacterial suspensions

	[P99]	Mean Cq (SEM) for each reaction in Multiplex				[P66]	Mean Cq (SEM) for each reaction in Multiplex				[P135]	Mean Cq (SEM) for each reaction in Multiplex			
	cfu/mL	q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d	cfu/mL	q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d	cfu/mL	q4Ba	qRpt2	qZ5	q2d
First experiment	2.46 x 10 <sup>7</sup>	21.51 (0.18)	22.59 (0.13)	na	na	3.22 x 10 <sup>7</sup>	22.68 (0.16)	na	19.85 (0.22)	na	5.80 x 10 <sup>7</sup>	21.77 (0.22)	na	na	18.94 (0.20)
	2.46 x 10 <sup>6</sup>	24.32 (0.06)	25.41 (0.18)	na	na	3.22 x 10 <sup>6</sup>	26.42 (0.08)	na	22.89 (0.13)	na	5.80 x 10 <sup>6</sup>	24.6 (0.27)	na	na	22.2 (0.27)
	2.46 x 10 <sup>5</sup>	27.57 (0.08)	29.18 (0.12)	na	na	3.22 x 10 <sup>5</sup>	30.4 (0.04)	na	25.92 (0.10)	na	5.80 x 10 <sup>5</sup>	27.63 (0.47)	na	na	25.43 (0.15)
	2.46 x 10 <sup>4</sup>	32.39 (0.35)	33 (0.26)	na	na	3.22 x 10 <sup>4</sup>	34.58	na	29.32 (0.60)	na	5.80 x 10 <sup>4</sup>	32.56 (0.76)	na	na	28.06 (0.18)
	2.46 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	na	3.22 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	na	5.80 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	32.22 (0.96)
	2.46 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na	3.22 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na	5.80 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na
	2.46 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na	3.22 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na	5.80 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na
	0 to 3	na	na	na	na	0 to 4	na	na	na	na	0 to 6	na	na	na	na
Efficiency		89.9%	93.00%				83%		99.4%			0.916			103.5%
R <sup>2</sup>		0.979	0.991				0.996		0.98			0.953			0.976
Slope		-3.59	-3.501				-3.804		-3.336			-3.541			-3.241
Second experiment	3.28 x 10 <sup>7</sup>	20.91 (0.36)	21.6 (0.65)	na	na	4 x 10 <sup>7</sup>	21.37 (0.31)	na	21.27 (0.16)	na	2.04 x 10 <sup>7</sup>	22.39 (0.08)	na	na	20.32 (0.10)
	3.28 x 10 <sup>6</sup>	24.25 (0.07)	25.2 (0.12)	na	na	4 x 10 <sup>6</sup>	24.45 (0.06)	na	24.14 (0.07)	na	2.04 x 10 <sup>6</sup>	25.08 (0.02)	na	na	23.44 (0.05)
	3.28 x 10 <sup>5</sup>	27.27 (0.03)	28.28 (0.07)	na	na	4 x 10 <sup>5</sup>	27.73 (0.07)	na	27.12 (0.05)	na	2.04 x 10 <sup>5</sup>	28.00 (0.26)	na	na	26.38 (0.26)
	3.28 x 10 <sup>4</sup>	31.09 (0.31)	33 (0.32)	na	na	4 x 10 <sup>4</sup>	30.87 (0.54)	na	30.75 (0.38)	na	2.04 x 10 <sup>4</sup>	32.56 (0.26)	na	na	29.14 (0.12)
	3.28 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	na	4 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	na	2.04 x 10 <sup>3</sup>	na	na	na	33.66 (0.80)
	3.28 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na	4 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na	2.04 x 10 <sup>2</sup>	na	na	na	na
	3.28 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na	4 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na	2.04 x 10 <sup>1</sup>	na	na	na	na
	0 to 4	na	na	na	na	0 to 4	na	na	na	na	0 to 3	na	na	na	na
Efficiency		100.1%	87.1%				106.5%		107.6%			0.991			103.7%
R <sup>2</sup>		0.989	0.975				0.984		0.99			0.976			0.976
Slope		-3.319	-3.675				-3.175		-3.152			-3.344			-3.237

Means were calculated with at least two positive Cq values. Cq values in italics mean that only one repetition out of three gave a value.



Supplemental Table 4. Cq values and population sizes in spiked seed samples calculated with the standard curve of pure bacterial suspensions

Bacterial load (cfu/ml) in seed extract before DNA extraction			Mean population sizes (Log <sub>10</sub> cfu/ml) (SEM) of the sample determined for each qPCR test					
P99	P66	P135	P99 q4Ba	P99 qRpt2	P66 q4Ba	P66 qZ5	P135 q4Ba	P135 q2d
<i>First experiment</i>								
2.46 x 10 <sup>7</sup>	3.22 x 10 <sup>7</sup>	5.80 x 10 <sup>7</sup>	8.43 (0.06)	8.60 (0.02)	8.25 (0.003)	8.15 (0.01)	8.38 (0.06)	8.44 (0.06)
2.46 x 10 <sup>6</sup>	3.22 x 10 <sup>6</sup>	5.80 x 10 <sup>6</sup>	7.34 (0.04)	7.49 (0.05)	7.17 (0.01)	6.98 (0.008)	7.61 (0.05)	7.58 (0.03)
2.46 x 10 <sup>5</sup>	3.22 x 10 <sup>5</sup>	5.80 x 10 <sup>5</sup>	6.35 (0.06)	6.42 (0.03)	6.49 (0.03)	6.15 (0.01)	6.80 (0.02)	6.70 (0.10)
2.46 x 10 <sup>4</sup>	3.22 x 10 <sup>4</sup>	5.80 x 10 <sup>4</sup>	5.69 (0.03)	5.77 (0.01)	5.67 (0.02)	5.42 (0.03)	5.85 (0.04)	5.47 (0.05)
2.46 x 10 <sup>3</sup>	3.22 x 10 <sup>3</sup>	5.80 x 10 <sup>3</sup>	4.78 (0.04)	4.76 (0.10)	NA	3.72 (0.21)	4.49 (0.13)	4.94 (0.05)
2.46 x 10 <sup>2</sup>	3.22 x 10 <sup>2</sup>	5.80 x 10 <sup>2</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	3.58 (0.17)
2.46 x 10 <sup>1</sup>	3.22 x 10 <sup>1</sup>	5.80 x 10 <sup>1</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	3.14
0 to 3	0 to 4	0 to 4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Efficiency and standard curve parameters								
Efficiency			89.9	93	83.2	99.4	91.6	103.5
R <sup>2</sup>			0.979	0.991	0.996	0.98	0.953	0.976
Slope			-3.59	-3.501	-3.804	-3.336	-3.541	-3.241
<i>Second experiment</i>								
3.28 x 10 <sup>7</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>	2.04 x 10 <sup>7</sup>	8.24 (0.06)	8.15 (0.06)	8.27 (0.02)	8.14 (0.02)	8.03 (0.06)	8.12 (0.05)
3.28 x 10 <sup>6</sup>	4 x 10 <sup>6</sup>	2.04 x 10 <sup>6</sup>	7.25 (0.08)	7.30 (0.04)	7.06 (0.05)	6.90 (0.03)	7.27 (0.05)	7.31 (0.07)
3.28 x 10 <sup>5</sup>	4 x 10 <sup>5</sup>	2.04 x 10 <sup>5</sup>	6.11 (0.18)	6.19 (0.08)	6.49 (0.05)	6.38 (0.03)	6.24 (0.04)	6.11 (0.15)
3.28 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	2.04 x 10 <sup>4</sup>	5.75 (0.04)	5.75 (0.02)	5.27 (0.13)	4.97 (0.05)	5.44 (0.07)	5.25 (0.04)
3.28 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>3</sup>	2.04 x 10 <sup>3</sup>	4.00 (0.09)	4.28 (0.25)	NA	3.26 (0.46)	4.27 (0.62)	4.31 (0.05)
3.28 x 10 <sup>2</sup>	4 x 10 <sup>2</sup>	2.04 x 10 <sup>2</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	2.21
3.28 x 10 <sup>1</sup>	4 x 10 <sup>1</sup>	2.04 x 10 <sup>1</sup>	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0 to 4	0 to 4	0 to 3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Efficiency and standard curve parameters								
Efficiency			100.1	87.1	106.5	107.6	99.1	103.7
R <sup>2</sup>			0.989	0.975	0.984	0.99	0.976	0.976
Slope			-3.319	-3.675	-3.175	-3.152	-3.344	-3.237

(a) Mean population sizes (Log cfu/ml) were calculated with the standard curve obtained in similar experiments with bacterial suspensions without DNA extraction, and considering each spiked sample as an unknown sample.





## CHAPITRE 4.

### **Voies et efficacité de la transmission par les semences des *P. syringae* du phylogroupe 2 responsables de la nervation blanche de la courgette.**



## **Voies et efficacité de la transmission par les semences de souches de *P. syringae* du phylogroupe 2 responsables de la nervation blanche de la courgette.**

Les deux chapitres précédant ont permis de caractériser les souches responsables de la nervation blanche de la courgette et de dessiner des outils PCR sensibles et spécifiques pour les détecter et les identifier. Le test q-PCR multiplex permet de détecter les souches responsables de la nervation blanche à gamme d'hôtes étroite (cluster A) et les souches des autres clusters à gamme d'hôtes large (cluster B, D et E) et les souches non-VCZ du clade 2d à un seuil de détection de  $5 \times 10^5$  bactéries dans 500 graines.

Le chapitre 4 présente le volet épidémiologique du travail de thèse. Il contient un typage MLST des contaminations des lots de semences détectés contaminés sur une période récente (2018-2019) et produits dans différents pays afin de révéler la fréquence de contamination par les différents clusters de souches. A échelle locale, en France, nous avons réalisé un suivi épidémiologique de parcelles de courgettes porte-graines dans les deux principaux bassins de production de semences de courgettes pour identifier l'impact des conditions environnementales sur des contaminations provenant de la semence et mesurer d'éventuelles contaminations provenant de l'environnement des parcelles de production. Les lots de semences produits dans ces parcelles ont été analysés et comparés aux lots de semences parentales et aux résultats des analyses faites en végétation. En parallèle de ce suivi, une analyse des voies de transmission aux graines de deux souches responsables de la nervation blanche (cluster A et cluster E) a été conduite. La transmission de la graine à la plantule a également été étudiée.

Les résultats de ces travaux sont présentés sous la forme d'une première version d'un article rédigé en français et intitulé « Voies et efficacité de la transmission par les semences de *P. syringae* du phylogroupe 2 responsables de la nervation blanche de la courgette ». Cette version devra être améliorée, voire complétée avant d'être soumise pour publication.

Implication personnelle : J'ai participé à l'élaboration du protocole expérimental. Les échantillons ont été collectés en collaboration avec Armelle. Je me suis occupée de l'ensemble des essais et des analyses présentés dans l'article. Une partie des résultats de la transmission ont été obtenus par Stacy, une stagiaire que j'ai encadrée pendant six mois. J'ai rédigé l'article en collaboration avec les co-auteurs.



## Voies et efficacité de la transmission par les semences des *P. syringae* du phylogroupe 2 responsables de la nervation blanche de la courgette.

### Introduction

La nervation blanche affectant les plantules de courgette (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*) est causée par plusieurs groupes de souches appartenant au phylogroupe 2 du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae* (Lacault et al. 2020). La semence contaminée constitue une source d'inoculum primaire de cette maladie (Manceau et al. 2011). Les plantules malades présentent des nécroses des cotylédons et des jeunes feuilles, des déformations, un blanchiment des nervures des feuilles et des retards de croissance. Dans les cas les plus sévères, la croissance des plantes est bloquée. La maladie s'exprime particulièrement lorsque les conditions de production des plants en pépinière sont fraîches et humides.

Le phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae* contient six clades (2a à 2e et 2b-a) dont certains correspondent à des espèces formellement décrites. Ainsi, le clade 2a correspond à *Pseudomonas cerasi*, le clade 2b à *P. syringae*, le clade 2c à *Pseudomonas congelans* et le clade 2d à l'espèce phylogénomique A proposée par Gomila et collègues (Berge et al. 2014; Gomila et al. 2017). Le clade 2e ne contient pas de souche taxonomiquement pertinente (Bull and Koike 2015). Le clade 2b-a a été décrit sur la base d'analyses génomiques qui mettent en évidence l'émergence de ce clade suite à de nombreux événements de recombinaison entre les clades 2b et 2a (Newberry et al. 2019). Plusieurs souches du phylogroupe 2 sont pathogènes des Cucurbitacées et appartiennent aux clades 2a, 2b, 2b-a et 2d (Inglis and Tymon 2019; Newberry et al. 2016, 2017a, 2017b, 2019; Riffaud et al. 2003). Des souches associées à l'environnement dont certaines sont phytopathogènes appartiennent également à ce phylogroupe 2 et sont distribuées dans les clades 2a, 2b, 2c, 2d et 2e (Diallo et al. 2012; Morris et al. 2000, 2008, 2010; Monteil et al. 2016).

Une analyse des séquences de plusieurs loci (multi-locus sequence analysis, MLSA) basée sur 4 gènes de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB* et *rpoD*) a montré que les souches responsables de la nervation blanche de la courgette (vein clearing of zucchini, VCZ) appartiennent aux clades 2a et 2b-a (Lacault et al. 2020). Au sein de ces deux clades, les souches VCZ sont regroupées avec des souches pathogènes des courges (*C. pepo*), des melons (*Cucumis melo*) et des pastèques (*Citrullus lanatus*) (Lacault et al. 2020; Newberry et al. 2019). Les génomes complets de 23 souches VCZ ont été séquencés et leur pouvoir pathogène déterminé sur une gamme de Cucurbitacées (Lacault et al. 2020). L'analyse génomique comparative des séquences des souches VCZ et de quelques autres souches pathogènes de diverses cucurbitacées (Newberry et al. 2019) a conduit à l'identification de six clusters (A à F) (Lacault et al. 2020). Ces six clusters ont été décrits sur la base de la phylogénie, de la gamme d'hôtes des souches ainsi que de leur répertoire d'effecteurs de type III (Lacault et al. 2020). La majorité des souches VCZ appartient au cluster A (clade 2b-a) et possède une gamme d'hôtes étroite restreinte aux *Cucurbita* spp.





Toutes les souches du cluster A possèdent l'effecteur de type III *avrRpt2* mais jamais l'effecteur *hopZ5*. Les autres souches se distribuent dans les clusters B (clade 2b-a), D et E (clade 2a) et ont une gamme d'hôtes large comprenant des *Cucurbita* spp., *Cucumis* spp. et *Citrullus lanatus*. Toutes ces souches possèdent l'effecteur *hopZ5* mais jamais l'effecteur *avrRpt2*. Quelques autres souches ont été isolées de semences de courgette, cependant elles ne forment pas de lignées mais sont distribuées dans le clade 2b, comprenant le pv. *aptata*, et le clade 2d. Leurs répertoires d'effecteurs de type 3 sont réduits et n'inclut pas les effecteurs *avrRpt2* et *hopZ5* (Lacault et al. 2020; Lacault et al. en préparation). Elles sont moyennement à faiblement agressives sur courgette, mais la gamme des symptômes engendrés ne recouvre pas la totalité des symptômes associés à la VCZ, en particulier elles n'entraînent pas de blocage de la croissance des plantules bien que des retards puissent être observés (Lacault et al. 2020; Lacault et al. en préparation). Un nouveau schéma MLSA basé sur sept gènes de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3420*, *Psyr4880* et *Psyr3208*) a été proposé pour assigner les souches responsables de la nervation blanche et les souches pathogènes des Cucurbitacées dans ces différents clusters (Lacault et al. 2020; Lacault et al. en préparation).

Des outils moléculaires ont été développés pour permettre la détection et l'identification des souches VCZ (Lacault et al. en préparation). Un test de détection basé sur la technologie q-PCR Taqman cible un fragment du gène *syIC* (Manceau et al. 2011) impliqué dans la biosynthèse de la syringoline A (Amrein et al. 2004). Ce test permet de détecter toutes les souches VCZ appartenant aux clades 2a et 2b-a ainsi que les autres souches phytopathogènes ou associées à la courgette appartenant aux clades 2b et 2d (Lacault et al. en préparation). Un test multiplex en q-PCR Taqman ciblant les gènes *syIC*, *avrRpt2*, *hopZ5* et le gène DND47\_RS21810 a été mis au point (Lacault et al. en préparation). Ainsi, sur la base de ce test, les souches du cluster A sont identifiées par la présence simultanée de *syIC* et *avrRpt2*, les souches des autres clusters (B, C, D, E et F) sont détectées collectivement par la présence simultanée de *syIC* et *hopZ5*, les souches associées à la courgette du clade 2b par la présence de *syIC* uniquement et celles du clade 2d par la présence simultanée de *syIC* et du gène DND47\_RS21810. Ces outils de détection et d'identification des souches VCZ et des souches pathogènes de Cucurbitacées sont particulièrement intéressants pour contrôler l'état sanitaire de lots de semences de courgette produits dans différents pays.

La semence contaminée est la source d'inoculum primaire de nombreuses phyto bactérioses, dont des maladies dues à des bactéries appartenant au complexe d'espèces *P. syringae*. C'est le cas de *P. syringae* pv. *lachrymans* transmis par les semences de concombre (Shila et al. 2013; Leben 1981) ou de *P. savastnoi* pv. *phaseolicola* transmis par semences de haricot, dont l'impact est si grand que la législation de l'Idaho aux Etats Unis exige la destruction de toute culture infectée par cet agent phytopathogène (Arnold et al. 2011; Taylor et al. 1979b). Trois voies de transmission sont empruntées par les bactéries phytopathogènes pour contaminer les semences (Maude 1996). (i) La voie florale consiste en une invasion du pistil de la fleur par les bactéries à partir du stigmate en passant par le style pour contaminer l'ovule. (ii) La voie vasculaire consiste en une transmission des bactéries par le xylème de la plante-mère à la graine, *via* le funicule au niveau de la région du hile de la graine. (iii) La voie par contact résulte d'une contamination de la graine par contact avec des tissus symptomatiques du fruit ou des débris de tissus végétaux lors des opérations de récolte. La localisation des bactéries dans les graines est dépendante de la voie de transmission qu'elles ont emprunté (Shade et al. 2017).

Tableau 1. Collection de souches typées en MLST

Souche	Pays	Année	clade/cluster	ST	Allèles aux différents loci						
					<i>Psyr3208</i>	<i>Psyr3420</i>	<i>Psyr4880</i>	<i>gapA</i>	<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
P102	na*	2011	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P62	France	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P70	Thaïlande	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P71	na*	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P72	na*	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P73	USA	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P77	France	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P78	France	2010	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P87	Chine	2011	2a/D	1	1	1	1	1	1	1	1
P104	na*	2011	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P65	na*	2010	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P66	Thaïlande	2010	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P89	France	2011	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P90	USA	2011	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P94	na*	2011	2a/E	5	3	1	1	1	1	1	1
P101	na*	2011	2b	14	7	9	11	8	10	8	9
P108	Chili	2011	2b	13	6	8	10	7	9	8	8
P138	France	2015	2b	15	8	10	12	9	11	9	10
P112	Chili	2011	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P113	Thaïlande	2011	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P118	France	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P119	France	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12	France	2006	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P120	France	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P121	Chili	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P123	Chine	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P125	Chine	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12831	France	2005	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12832	France	2006	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12833	France	2005	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12854	France	2002	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12855	Chili	2007	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P12856	France	2005	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P130	Thaïlande	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P131	Chine	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P133	Thaïlande	2013	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P137	France	2014	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P139	Chine	2015	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P22	USA	2009	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P24	France	2008	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P4	France	2005	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P5	France	2008	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P68	USA	2010	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P79	France	2010	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P84	Chine	2010	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P99	France	2005	2ba / A	4	2	4	4	3	3	3	3
P1	France	2005	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P12836	France	2005	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P12857	France	2007	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P14	na*	2008	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P55	Chili	2009	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P56	na*	2009	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P69	USA	2010	2ba / B	3	2	3	3	3	3	3	3
P88	Chine	2011	2ba / C	6	4	3	5	3	3	3	3
P100	na*	2011	2ba / C	6	4	3	5	3	3	3	3
P103	na*	2011	2d	10	5	6	8	6	7	6	6
P129	Chine	2013	2d	11	5	7	9	6	8	5	7
P134	na*	2014	2d	12	5	6	9	6	7	7	5
P135	Inde	2014	2d	9	5	5	7	5	6	5	5

\*na information manquante



Ainsi, une transmission par la voie florale et par la voie vasculaire est généralement associée à des contaminations externes (testa) et internes (axe embryonnaire et cotylédons) de la graine (Darrasse et al. 2018; Dutta et al. 2012; Glassner et al. 2018; Mitter et al. 2017). La voie par contact conduit généralement à des contaminations externes de la graine (Barret et al. 2016b). *A. citrulli* est ainsi observée dans le testa, l'endosperme-périsperme et dans l'embryon pour des transmissions florales et par contact des graines de pastèque. La voie florale engendre des contaminations de l'embryon pour 90 % des graines analysées, mais pour moins de 10 % des graines contaminées par contact (Dutta et al. 2012). *X. citri* pv. *fuscans* infectant les graines suite à inoculation des fleurs de haricot est localisé à la surface du testa, dans les espaces intercellulaires du testa (parenchymes), dans l'espace entre le testa et les cotylédons. Cette bactérie est également observée à l'intérieur de l'embryon lorsque la charge bactérienne est très élevée, les tissus de la graine sont alors particulièrement endommagés et la graine est certainement non viable (Darrasse et al. 2018).

L'environnement de la culture et en particulier les bordures des parcelles et les adventices présentes dans les parcelles peuvent constituer des réservoirs pour les bactéries du complexe d'espèces *P. syringae* (Lindow and Brandl 2003; Lamichhane et al. 2015). Par exemple *P. amygdali* pv. *phaseolica* peut survivre plusieurs semaines sur des adventices comme *Fumaria* sp, *Mercurialis annua*, *Solanum nigrum* et *Sonchus oleraceus* après une culture de haricot en attendant l'implantation d'un nouveau cycle cultural (Fernández-Sanz et al. 2016). La litière végétale, les débris de culture et le sol peuvent constituer des réservoirs de nombreuses souches de *P. syringae* (Monteil et al. 2012). L'eau de pluie ou d'irrigation pourrait permettre la survie et donc servir de source d'inoculum des *P. syringae* pour les cultures (Morris et al. 2008 ; Riffaud and Morris 2002).

Pour améliorer le contrôle de la nervation blanche de la courgette, l'objectif de cette étude a été de préciser le rôle de la contamination initiale des semences dans la production de graines contaminées. Trois approches complémentaires ont été suivies : (i) Préciser les types de souches contaminant les lots de semences produits depuis 2002 par échantillonnage et typage des souches avec le nouveau schéma MLSA (Lacault et al. 2020 ; Lacault et al. en préparation) et la qPCR multiplex (Lacault et al. en préparation). (ii) Effectuer un suivi de la contamination pour quelques lots de semences semés dans les principaux bassins de production jusqu'à la récolte des graines en incluant le prélèvement d'adventices pour tester une éventuelle contamination par l'environnement. (iii) Caractériser la transmission aux graines et aux plantules des deux groupes majoritaires de souches VCZ.

## Matériel et méthodes

**Collection de souches et conditions de culture.** Une collection de 55 souches (52 VCZ et trois du clade 2b) provenant de lots de semences produits dans différents pays entre 2002 et 2014 (Lacault et al. 2020) et quatre souches non VCZ (P103, P129, P134 et P135) également isolées de semences et appartenant au phylogroupe 2 ont été utilisées (Tableau 1). Au cours de ce travail, un jeu de 44 souches a été isolé de lots de semences (Po5, Po8 et Br2019) et de plantes (21 souches isolées de feuilles de courgettes et 20 souches isolées d'adventices) dans les parcelles de production de semences de courgette (Tableau supplémentaire 1). Les souches étaient



conservées à - 80°C dans de l'eau stérile glycérolée (concentration finale de glycérol 40 %) et cultivées en routine sur milieu TSA 10% (3 g/L de milieu Tryptone Soja et 15 g/L d'agar). Les isollements étaient réalisés sur milieu LBCAL (2 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de Bactopeptone, 50 g/L de saccharose, 1,5 g/L d'acide borique, 15 g/L d'agar et 2 mL NaOH 1 N, 40 mg/L de cephalaxine, 50 mg/L de lincomycine et 50 mg/L d'actidione). Les suspensions étaient faites à partir de cultures âgées de 24 h dans de l'eau distillée stérile et étaient calibrées à  $DO_{650\text{ nm}} = 0,1$  ( $10^8$  ufc/mL) et ajustées par dilution à la concentration souhaitée. Des suspensions-dilutions au dixième étaient étalées sur milieu TSA10% pour déterminer précisément les tailles de populations bactériennes par dénombrement des colonies après 48 h de croissance à 28°C. Les souches P99-R et P66-R sont des variants résistants à la rifamycine des souches sauvages P99 et P66. Les souches P99-R et P66-R possèdent les mêmes caractéristiques biologiques que les souches parentales sauvages (document supplémentaire 1). P99-R et P66-R étaient cultivées en routine sur milieu TSA10% ou milieu LBCAL supplémentés de rifamycine à 100 mg/L. Sur le milieu LBCAL, ces deux souches sont morphologiquement distinctes, P99-R étant bombée, muqueuse et de couleur ivoire et P66-R étant rasante et légèrement jaunâtre.

**Détection et identification des souches présentes dans les échantillons végétaux.** Un test q-PCR Taqman, ciblant un fragment du gène *syIC*, permet de détecter, au moyen des amorces (5'CTTTGAGTACGCCAAGAGC3', 5'GGAGGCAGTGCTGACGTA3') et d'une sonde marquée à la fluorescéine (FAMTCGGAGCGCATCATGCAGATBHQ1), toutes les souches VCZ ainsi que d'autres souches appartenant aux clades 2a, 2b et 2d du complexe d'espèces *P. syringae* (Lacault et al. en préparation). Un test q-PCR multiplex, comprenant le test q-PCR basé sur le gène *syIC* et trois autres cibles dont les gènes d'ET3 *avrRpt2* et *hopZ5* et le gène DND47\_RS2 spécifique du clade 2d, permet de différencier les souches VCZ en fonction de leur pouvoir pathogène (Lacault et al. en préparation). Les amorces qRpt2-F 5'CTGCGCAAGAATGGTTGGC3' et qRpt2-R 5'GGCCCTCCCTCCCTCAT3' et la sonde qRpt2-P HEXGCCTCGCCTAGGGCTGCCGGBHQ1 détectent une cible de 80 pb dans le gène *avrRpt2*. Pour le gène *hopZ5*, les amorces qZ5-F 5'GCCTGGCTATCTTCAGATGC3' et qZ5-R 5'TCCAAGTTGGATGACAGCCA3' associées à la sonde qZ5-P TxRedACGCTCAGGATAACGGCCGCBHQ2 ciblent un fragment de 79 pb. Les amorces q2d-F 5'CGTGCTGCTCAAATCGCC3' et q2d-R 5'TCCTGTCAGCCATTGGGG3' et la sonde q2d-P Cy5CGCGACGGTGCTCGGTTTCGCBHQ2 détectent une séquence de 80 pb. Ce test q-PCR multiplex permet d'identifier les souches VCZ du cluster A à gamme d'hôtes étroite (positives avec les tests *syIC* et *avrRpt2*), les souches VCZ à large gamme d'hôtes (positives avec *syIC* et *hopZ5*) et les souches faiblement pathogènes sur courgette appartenant au clade 2d. Par déduction, les souches positives uniquement avec le test *syIC* appartiennent au clade 2b. Le test q-PCR *syIC* était réalisé dans un volume final de 20 ou 10 µL comprenant 10 µL ou 5 µL de MasterMix (Eurogentec, Belgique), 2 µM de chaque amorce, 0,03 µM de sonde et 5 µL ou 1 µL d'échantillon à tester. Le test q-PCR multiplex était effectué dans un volume final de 10 µL contenant 5 µL de Sso Advanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad), 6 nM de chaque amorce, 200 nM de chaque sonde et 1 µL d'échantillon à tester. Le programme PCR comprend une dénaturation de 3 min à 95 °C puis 40 cycles de 15 s à 95 °C et 30 s à 60 °C dans des thermocycleurs Bio-Rad CFX96 Touch ou Bio-Rad CFX384 Touch. Les résultats étaient analysés avec le logiciel Bio-Rad CFX Manager 3.1. Pour chaque réaction, la courbe d'équation, l'efficacité de la q-PCR ( $E = 10^{(-1 / \text{pente})}$ ) et le coefficient de corrélation R2 étaient déterminés à l'aide de gammes étalons réalisées à partir de suspensions bactériennes fraîches calibrées à  $10^8$  ufc/mL et diluées au dixième



jusqu'à  $10^3$  ufc/mL. La souche P99 a été utilisée pour calibrer les q-PCR ciblant *sy/C* et *avrRpt2*, la souche P66 pour *hopZ5* et la souche P129 pour le clade 2d.

**Echantillonnage des végétaux dans les parcelles de courgette et analyses.** Les prélèvements étaient effectués dans des parcelles de production de semences hybrides. Les mêmes lots de semences de base étaient semés dans plusieurs localités. Deux grandes régions de production de semences de courgette étaient ciblées (i) La Limagne, située au centre de la France et (ii) La vallée du Rhône, dans le sud-est de la France. Une troisième zone de production de semences, l'Anjou, située à l'ouest de la France a également été échantillonnée pour un couple de génotypes parentaux communs avec les deux autres régions. Les campagnes d'échantillonnage des parcelles de courgettes porte-graines étaient réalisées en 2018 et 2019 sur des plants de courgettes symptomatiques, des adventices et des plantes en bordure des parcelles cultivées voisines. Les parents femelles et mâles de sept variétés de courgettes étaient échantillonnés ( $\text{♀A} \times \text{♂B}$  ;  $\text{♀C} \times \text{♂D}$  ;  $\text{♀E} \times \text{♂F}$  ;  $\text{♀G} \times \text{♂H}$  et  $\text{♀P} \times \text{♂P}$ ) dans 20 parcelles différentes. La variété  $\text{♀P} \times \text{♂P}$  correspond à un auto-croisement réalisé sous abri alors que pour les autres variétés, il s'agit de croisements hybrides réalisés en plein champ. Pour une même parcelle, le semis des parents mâles et femelles a été effectué en décalé. Les plantes étaient échantillonnées un mois et demi après le semis des parents mâles et un mois après le semis des parents femelles. Les échantillons de courgettes étaient des fragments de feuilles symptomatiques, des plantules, des fleurs entières ou du pollen. Les échantillons d'adventices étaient des feuilles symptomatiques ou non, ou la partie aérienne des plantes lorsqu'elles étaient de petite taille. Les fruits étaient récoltés à maturité et les semences extraites selon les méthodes classiques en production de semences. Entre 1000 et 2000 graines produites dans les parcelles visitées étaient échantillonnées pour les analyses sanitaires.

**Traitement des échantillons prélevés au champ.** Le pollen était prélevé pour les fleurs mâles et le pistil pour les fleurs femelles, un fragment de tissu asymptotique situé en bordure de symptôme était découpé pour les échantillons symptomatiques et un fragment de plantule ou de feuille pour les échantillons sans symptôme. Un fragment de surface équivalente (environ 3 x 6 cm) était broyé avec un broyeur à plateaux (MixWell, Alliance Bio Expertise, France) avec 5 ml d'eau stérile pour tous les échantillons prélevés. Une aliquote de 200  $\mu\text{L}$  du macérât était conservée dans du glycérol à 40 % à  $-80^\circ\text{C}$  et un ml de macérât a été centrifugé 10 min à 15 000 g. L'ADN était extrait à partir des culots en utilisant un kit d'extraction (ADN végétal QuickPick SML, Bio-Nobile, Finlande) et un système automatisé (Caliper Zephyr, PerkinElmer). Chaque échantillon a été testé deux fois avec le test q-PCR *sy/C* avec 5  $\mu\text{L}$  d'ADN. La taille de population a été déterminée pour chaque échantillon (fragment foliaire de surface équivalente). Le seuil de détection en q-PCR était de 150 bactéries par fragment foliaire. Pour les échantillons testés positifs, le macérât restant a été étalé sur milieu LBCAL et incubé 24 h à  $28^\circ\text{C}$  afin d'isoler des souches.

**Analyse des semences.** Les échantillons de graines de courgette étaient mis à macérer dans 3 mL/g de graines ou 1 mL/ graine individuelle de tampon phosphate salin (PBS, Sigma) stérile additionné de 100  $\mu\text{L/L}$  de tween 20 pendant 2 h à 105 rpm. Ensuite, soit (i) l'ADN était extrait directement à partir d'un mL culoté après centrifugation (15000 G pendant 20 min) suivant les instructions du kit QuickPick SML, (ii) soit chaque macérât et des dilutions





au dixième étaient étalés sur milieu LBCAL et incubés pendant 24 h à 28°C. Après incubation, soit (i) les colonies bactériennes individuelles étaient suspendues dans de l'eau distillée stérile, et bouillies (5min à 95°C) pour lyser les cellules (ii), soit l'ensemble du tapis bactérien a été récolté dans 3 mL de PBS à 0,85%. Un mL de cette suspension a été centrifugé 5 min à 13 000 g. Le culot a été lysé avec 500 µL de NaOH 0,5 N, incubé 10 min à 65°C puis placé sur glace. La solution d'ADN a été diluée au centième dans du tampon TrisHCl 20 mM à pH 8 et a été analysée directement, c'est une analyse de type Bio-PCR (Schaad et al. 1995). Chaque échantillon a été testé une à trois fois indépendamment avec le test q-PCR *sy/C*. Le test q-PCR multiplex a été utilisé pour identifier les souches des lots de semences et graines du suivi des parcelles.

**Calcul du taux de contamination d'un lot de semences.** Le taux de contamination des lots de semences a été déterminé par l'analyse de plusieurs sous-échantillons. Le calcul a été fait soit (i) à partir du nombre de sous-échantillons contaminés en utilisant les tableaux des nombres les plus probables (Swaroop 1951) (ii) soit par un calcul de probabilité basé sur le nombre de groupes sains parmi (N) groupes de taille identique contenant chacun (n) graines (Maury et al. 1986). Pour les lots de semences produits après inoculation des plantes ou des fruits un échantillon de 50 graines a été analysé pour chaque lot de semences si son effectif le permettait. Puis, (i) en cas d'échantillon positif, cinq lots de 10 semences et cinq semences individuelles étaient analysés, le taux de contamination du lot a été estimé avec les tables de Swaroop (1951) (ii) en cas d'échantillon négatif, deux autres lots de 50 semences étaient analysés, le taux de contamination des lots a alors été estimé par la formule de Maury avec  $N = 3$  et  $n = 50$ . Pour les petits lots, les analyses étaient faites sur des sous-échantillons de 10 graines ou des graines individuelles et le taux de contamination a été déterminé avec la formule de Maury. Les seuils de détection théoriques pour les différentes analyses de graines étaient les suivants : 300 bactéries pour 100 graines et 1500 bactéries pour 500 graines avec la q-PCR ciblant *sy/C* et 1500 bactéries pour 100 graines et 7500 bactéries pour 500 graines avec la q-PCR multiplex. Pour les analyses de 10 graines, le seuil de détection était de 30 bactéries pour le test q-PCR ciblant *sy/C* et de 150 bactéries pour la q-PCR multiplex. Pour les analyses de semences individuelles, le seuil de détection en q-PCR ciblant *sy/C* était de six bactéries et de 30 bactéries en q-PCR multiplex. Les analyses avec les variants résistants à la Rif par dénombrement sur milieu sélectif avaient un seuil de détection pouvant descendre à 1 ufc par échantillon quand la totalité macérât était étalé.

**Transmission de P66-R et P99-R aux graines de courgette.** Un lot commercial de semences de courgettes du cultivar Divonne a été utilisé lors des essais transmission des souches P99-R and P66-R aux graines. Ce lot était indemne de contamination par des souches VCZ sur la base de l'analyse négative de 2 000 graines avec le test q-PCR ciblant *sy/C*. Les essais ont été menés en serre en 2018, 2019 et 2020. Les semences étaient semées en pots individuels de 9 x 9 cm contenant du Substrat 4 (Klassman). Trois semaines après semis, les plantules étaient transplantées en pots de 15 L. Les plantes étaient arrosées chaque jour avec un système de ferti-irrigation avec un ratio NPK de 12/7/25 et une valeur d'échange de cation effective de 1,8. Au moment de l'anthèse, une fleur femelle juste éclosée par plante était pollinisée tôt le matin avec un pinceau désinfecté contenant le pollen d'une fleur mâle provenant d'une plante saine. Les fleurs femelles étaient inoculées juste après pollinisation avec des suspensions de P99-R et P66-R calibrées à  $1 \times 10^5$  ufc/mL en 2018 et  $1 \times 10^7$  ufc/mL en 2019 et 2020. Pour chaque souche et chaque année, trois voies de contamination étaient testées chacune sur cinq plantes, à l'exception de la voie par contact en 2018 (trois plantes). (i) Pour la voie vasculaire, le pédoncule de la fleur

Tableau 2. Séquences génomiques utilisées pour l'analyse phylogénétique sur les gènes Psyr3208, Psyr3420 et Psyr4880

Souche	Origine géographique	Hôte	Année isolement	Phylogoupe	Biosample
03-19A	Florida	<i>Cucumis melo</i>	2003	PG2a	SAMN06263767
13-139B	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06317916
13-429	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2a	SAMN06318302
200-1	Georgia	<i>Cucurbita</i> sp.	2000	PG2a	SAMN06318380
BS2121	California	<i>Cucurbita</i> sp.	2006	PG2a	SAMN06317958
CFBP 1754 (pv <i>papulans</i> )	Canada	<i>M. sylvestris</i>	1973	PG2a	SAMN03992216
CFBP 2356 <sup>PT</sup> (pv. <i>dysoxyli</i> )	NZ	<i>Dysoxylum spectabile</i>	1949	PG2a	SAMN12253512
CFBP 8692 (P66)	Thailand	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12305548
Cit7 ( <i>P. syringae</i> )	na	<i>Citrus sinensis</i>	na	PG2a	SAMN02471314
<i>P. cerasi</i> CFBP 8305 <sup>T</sup>	Poland	<i>Prunus cerasus</i>	2007	PG2a	SAMEA3894894
<i>P. syringae</i> ICMP 11293	New Zeland	<i>A. deliciosa</i>	1991	PG2a	SAMN04102819
P73	USA	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288853
P77	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288854
P78	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2a	SAMN12288860
P87	China	<i>C. pepo</i>	2011	PG2a	SAMN12289083
P89	France	<i>C. pepo</i>	2011	PG2a	SAMN12289141
<i>Ps. syringae</i> BRIP39023	Australia	<i>H. vulgare</i>	1971	PG2a	SAMN02469654
<i>Pseudomonas</i> sp ICMP10191	China	<i>Actinidia deliciosa</i>	1981	PG2a	SAMN04102816
<i>Pseudomonas</i> sp NFACC10-1	na	<i>Panicum virgatum</i>	na	PG2a	SAMN03159505
ZUM3984	China	<i>Cucurbita</i> sp.	2008	PG2a	SAMN06318038
1704B (pv <i>pisi</i> )	na	na	na	PG2b	SAMN02471313
2507 (pv <i>syringae</i> )	Russia	<i>T. aestivum</i>	2012	PG2b	SAMN05182240
ATCC 10859 (pv <i>lapsa</i> )	na	<i>T. aestivum</i>	2014	PG2b	SAMN03774723
CRAFRU11 (pv <i>syringae</i> )	Italy	<i>C. avellana</i>	2004	PG2b	SAMN03482996
DSM 50252 (pv. <i>aptata</i> )	USA	<i>Beta vulgaris</i>	1902	PG2b	SAMN02471325
DSM_50255 (pv <i>atrofaciens</i> )	na	<i>Triticum</i>	na	PG2b	SAMN02471577
ICMP 17001 <sup>PT</sup> (pv <i>coryli</i> )	Italy	<i>C. avellana</i>	na	PG2b	SAMN03976285
LMG 2367 (pv <i>panici</i> )	na	<i>Panicum miliaceum</i> L.	na	PG2b	SAMN02472179
MAFF 301072 PT (pv <i>japonica</i> )	na	<i>H. vulgare</i>	na	PG2b	SAMN02471312
<i>P. syringae</i> B576	China	na	na	PG2b	SAMN03104821
<i>P. syringae</i> BRIP34881	Australia	<i>H. vulgare</i>	1971	PG2b	SAMN02469652
<i>P. syringae</i> BS0292 (pv. <i>aptata</i> )	na	na	na	PG2b	SAMN05444065
<i>P. syringae</i> CC1458	USA	<i>Primula pauciflora</i>	2005	PG2b	SAMN02471556
<i>P. syringae</i> CC1543	France	lake water	2006	PG2b	SAMN02471554
<i>P. syringae</i> CC440	France	<i>Cucumis melo</i>	2002	PG2b	SAMN02471571
<i>P. syringae</i> ICMP 11168	New Zeland	<i>A. deliciosa</i>	1991	PG2b	SAMN04102817
P108	Chile	<i>C. pepo</i>	2011	PG2b	SAMN12288112
13-140A	Florida	<i>C. lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06256456
13-509A	Florida	<i>Cucurbita</i> sp.	2013	PG2b-a	SAMN06263769
13-C2	Florida	<i>Citrullus lanatus</i>	2013	PG2b-a	SAMN06263768
14-32	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06257475
14-410	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06270325
14-Gil	Florida	<i>C. lanatus</i>	2014	PG2b-a	SAMN06317944
CFBP 8693 (P99)	France	<i>Cucurbita pepo</i>	2005	PG2b-a	SAMN12305539
HS191 (pv. <i>syringae</i> )	Australia	<i>Panicum miliaceum</i>	1969	PG2b-a	SAMN03267749
<i>P. syringae</i> CC457	France	<i>Cucumis melo</i>	na	PG2b-a	SAMN02471568
P113	Thailand	<i>C. pepo</i>	2011	PG2b-a	SAMN12288386
P118	France	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288431
P121	Chile	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288432
P123	China	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288472
P127	India	<i>C. pepo</i>	2013	PG2b-a	SAMN12288592
P12831 (co7A)	France	<i>C. pepo</i>	2005	PG2b-a	SAMN12289147

(A suivre...)

femelle était traversé à deux reprises avec une aiguille (Terumo 18 g pink 1.2 mm x 38 mm) préalablement remplie de suspension bactérienne par capillarité. Le volume total infiltré a été estimé à 2 µL. (ii) Pour la voie florale, une goutte de 50 µL de suspension bactérienne était déposée sur le stigmate de la fleur femelle. (iii) Pour la voie par contact, un carré de papier filtre stérile de 5 x 5 cm imbibé avec 200 µL de suspension bactérienne était apposé sur le péricarpe d'un fruit âgé d'une semaine.

En 2019 et 2020, les charges bactériennes inoculées étaient d'approximativement de  $2 \times 10^4$  CFU par pédoncule,  $5 \times 10^5$  CFU par stigmate et  $2 \times 10^6$  CFU par fruit. En 2018 l'inoculum était 100 fois moins concentré que les autres années pour chacun des tissus. Des contrôles négatifs avec de l'eau distillée étaient inclus dans chaque expérimentation.

Après pollinisation, les plantes étaient cultivées jusqu'à maturité des fruits soit  $75 \pm 5$  jours en suivant les standards de la culture de la courgette en serre. A la récolte, la surface des fruits était désinfectée à l'alcool à 70 %. Pour chaque fruit, seules les graines matures étaient extraites, rincées avec de l'eau distillée stérile et séchées sur papier filtre à température ambiante pendant une semaine. Chaque lot de graines correspondait à un fruit (entre 1 à 300 graines par fruit). Les lots de graines étaient conservés à 9°C jusqu'à leur analyse.

**Analyse des plantules.** Pour étudier la transmission des bactéries aux plantules, deux lots de semences très contaminés étaient utilisés (i) un lot de graines de courgette (*C. pepo* subsp. *pepo*) contaminé à 71 % provenant des plantes inoculées par voie vasculaire avec la souche P66-R et (ii) un lot de graines de citrouille (*C. pepo* subsp. *pepo*) naturellement contaminées à un taux de 63 % par des bactéries appartenant au cluster A. Trente graines par lot étaient analysées individuellement et 30 graines étaient semées en pots individuels de 9 x 9 cm contenant le substrat 4 (Klassman) dans une mini serre avec une humidité relative saturée. A sept jours, les plantules au stade cotylédonaire étaient évaluées pour leur état sanitaire (0 : plante saine, 1 : présence de symptômes macroscopiques). Les parties aériennes des plantules étaient prélevées en les coupant individuellement à la base du collet. Les échantillons végétaux étaient placés individuellement dans un sac en plastique contenant 15 ml d'eau stérilisée et broyées pendant 5 min. En parallèle, pour les plantules du lot citrouille, un disque dans un cotylédon pour chaque plantule était prélevé avec à un emporte-pièce de diamètre 1 cm et analysé séparément. Chaque disque foliaire était placé dans 5 mL d'eau avant d'être broyé 3 min dans un stomacher. Pour chaque échantillon, un millilitre de macérât et les dilutions appropriées étaient étalés sur milieu LBCAL et incubés 24 h à 28°C. Les colonies VCZ typiques étaient comptées selon leur morphologie caractéristique sur LBCA (les souches du cluster A présentant comme la souche P99-R des colonies bombées, muqueuses de couleur ivoire). L'identité des souches P66-R et des souches cluster A a été vérifiée par test qPCR.

**Typage des séquences de 7 loci.** Les 59 souches isolées de lots de semences détectés contaminés entre 2002 et 2014 ont été typés sur sept de ménage (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3420*, *Psyr4880* et *Psyr3208*) comme décrit dans Lacault et al. en préparation. Pour chaque locus, un numéro d'allèle a été attribué à chaque séquence unique par le logiciel Bionumerics version 7.6.3. Chaque combinaison d'allèles aux 7 loci correspond à un Sequence Type (ST). Un arbre de recouvrement minimum (MST pour minimum spanning tree) a été calculé pour explorer les relations entre les ST (BioNumerics 7.6). Des complexes clonaux étaient définis comme des groupes d'au moins 2 souches partageant au moins cinq haplotypes sur sept.

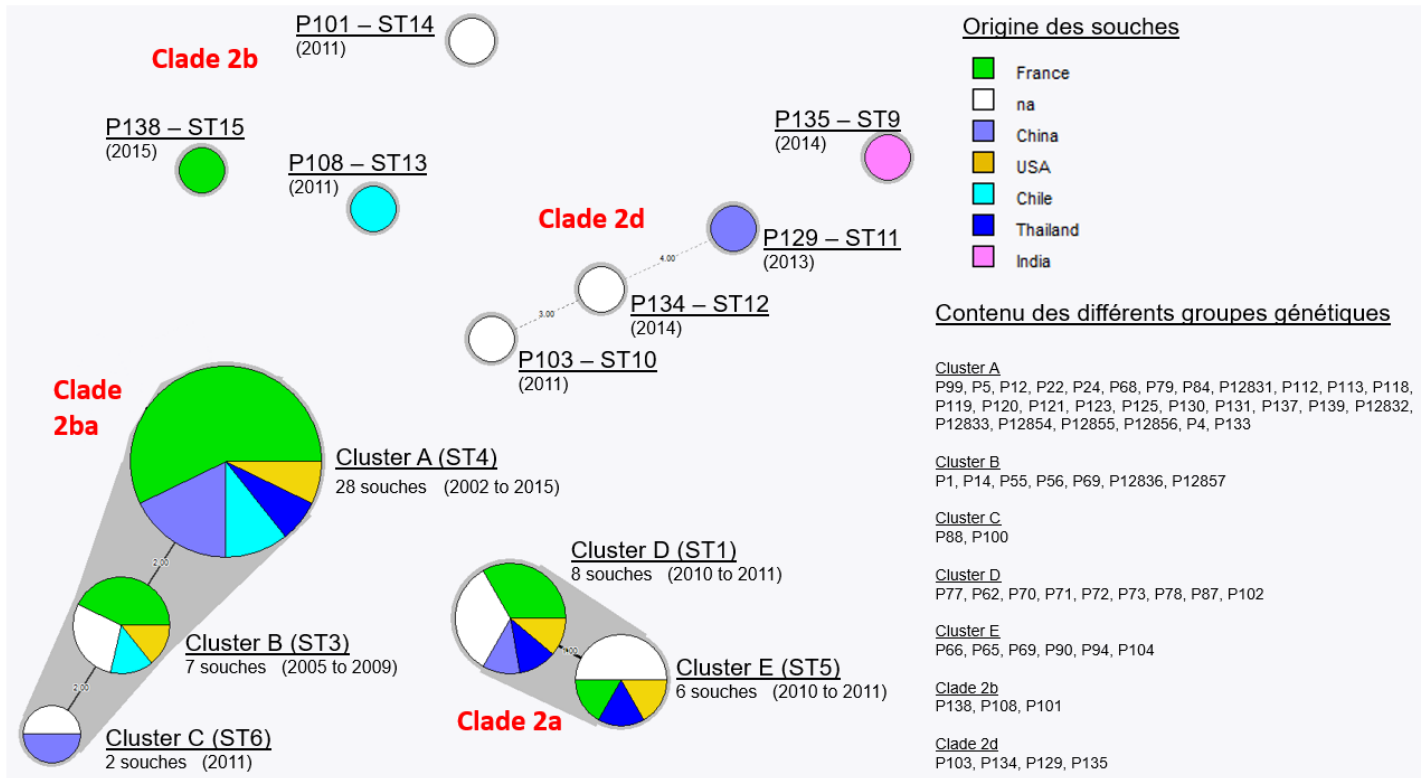
Souche	Origine géographique	Hôte	Année isolement	Phylogroupe	Biosample
P12832	France	<i>C. pepo</i>	2006	PG2b-a	SAMN12284164
P12854	France	<i>C. pepo</i>	2002	PG2b-a	SAMN12284309
P12855	Chile	<i>C. pepo</i>	2007	PG2b-a	SAMN12284728
P12857	France	<i>C. pepo</i>	2007	PG2b-a	SAMN12288124
P139	China	<i>C. pepo</i>	2015	PG2b-a	SAMN12288625
P22	USA	<i>C. pepo</i>	2009	PG2b-a	SAMN12288683
P5	France	<i>C. pepo</i>	2008	PG2b-a	SAMN12288805
P79	France	<i>C. pepo</i>	2010	PG2b-a	SAMN12289058
P84	China	<i>C. pepo</i>	2010	PG2b-a	SAMN12289072
PS711	Serbia	<i>Cucurbita</i> sp.	2013	PG2b-a	SAMN10486866
ZUM3584	Italy	<i>Cucurbita</i> sp.	2005	PG2b-a	SAMN06318381
B301D-R (pv <i>syringae</i> )	UK	<i>Pyrus communis</i>	1969	PG2d	SAMN02585144
B728A (pv. <i>syringae</i> )	USA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	na	PG2d	SAMN02604347
HRI-W 7924 (pv <i>syringae</i> )	UK	<i>Prunus cerasus</i>	2000	PG2d	SAMN03992221
ICMP 16925 <sup>PT</sup> (pv. <i>solidagae</i> )	Japon	<i>Solidago altissima</i>	na	PG2d	SAMN03976256
<i>P. syringae</i> CC94	France	<i>Cucumis melo</i>	1997	PG2d	SAMN02471551
<i>P. syringae</i> ICMP 13102	France	<i>A. deliciosa</i>	1985	PG2d	SAMN04102820
P129	China	<i>C. pepo</i>	2013	PG2d	à déposer
P135	India	<i>C. pepo</i>	2014	PG2d	à déposer
P2339 (pv <i>syringae</i> )	Hungary	<i>Prunus avium</i>	1984	PG2d	SAMN03992218
02-B4	USA	<i>Citrullus lanatus</i>	2002	PG2d	SAMN06317767
ICMP 508	New Zeland	<i>Prunus</i> sp.	2010	PG2d	SAMN04092592
ICMP 2802 (pv. <i>aceris</i> )	USA	<i>Acer</i> sp.	na	PG2d	SAMN03976301
ICMP 4122	New Zeland	<i>Prunus armeniaca</i>	2010	PG2b	SAMN04092607
ICMP 3023 (pv. <i>syringae</i> )	UK	<i>Syringa vulgaris</i>	na	PG2b	SAMN03976255
ICMP 459 (pv. <i>aptata</i> )	USA	<i>Beta vulgaris</i>	na	PG2b	SAMN03976295
ICMP4967	USA	<i>Eriobotrya japonica</i>	na	PG2b	SAMN03976465
1188	USA	<i>Cucurbita pepo</i> var.	na	PG2b	SAMN03976479
ICMP3272 (viridiflava)	New Zeland	<i>Actinidia deliciosa</i>	1975	PG8	SAMN03976434

\*na information non disponible

**Positionnement phylogénétique des nouveaux isolats.** Les analyses phylogénétiques étaient réalisées sur la séquence concaténée (1452 pb) des gènes *Psyr3420*, *Psyr4880* et *Psyr3208* pour 44 souches nouvellement isolées en prospection (Tableau supplémentaire 1).

L'arbre a été construit en incluant la séquence concaténée de 59 souches de la collection (Tableau 1), de 14 souches isolées de Cucurbitacées (Newberry et al. 2019) et 41 souches représentant la diversité du complexe d'espèces *P. syringae* (Tableau 2). Les séquences de la souche de *P. viridiflava* (ICMP 3272) ont été utilisées pour enraciner l'arbre (Tableau 2). Un arbre en maximum de vraisemblance (ML) a été généré avec MEGA 7 (Kumar et al. 2016) en utilisant le modèle de Tamura-Nei avec distribution gamma des sites invariants (G + I) et 1000 bootstraps.

**Tests statistiques.** Les analyses statistiques ont été conduites avec le logiciel Rx64 3.6.1. Les données de tailles de population transformées en log ont été analysées avec un test de student.



**Figure 1.** Arbre de recouvrement minimal (MST) construit sur 59 souches isolées de lots de semences de courgettes entre 2002 et 2014. L'arbre a été construit en fonction du profil allélique de chaque souche pour la combinaison des sept (loci *gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*, *Psyr3208*, *Psyr3420* et *Psyr4880*). Chaque cercle correspond à un ST unique. Les souches VCZ sont réparties dans les clusters A à E au sein des clades 2b-a et 2a. Les lignes relient deux ST et le chiffre indiquent le nombre de locus qui diffèrent sur les sept analysés. L'origine des souches est indiquée avec des couleurs (Chine en pourpre, Chili en bleu clair, Thaïlande en bleu foncé, Inde en rose, USA en jaune, France en vert, et origine inconnue en blanc).



## Résultats

**Les souches isolées de lots de semences contaminées entre 2002 et 2015 sont regroupées en deux complexes clonaux majoritaires, sans structuration en lien avec l'origine géographique des lots.** Douze ST différents représentant la diversité des sept loci concaténés typaient les 59 souches de notre collection (Tableau 1). Deux complexes clonaux étaient mis en évidence dans l'arbre MST (Figure 1). Le premier complexe clonal comprenait les souches des clusters A (49%), B (12%) et C (3%) inclus dans le clade 2b-a et le second complexe clonal comprenait des souches des clusters D (14%) et E (10%) inclus dans le clade 2a (Figure 1). Chaque cluster identifié contenait uniquement des souches présentant le même ST. Le cluster A correspondait au ST4, le cluster B au ST3 et le cluster C au ST6 (Figure 1). Les souches des clusters A, B et C partageaient les mêmes allèles aux loci *gapA*, *gltA*, *gyrB* et *rpoD* mais les allèles différaient aux loci *Psyr3208*, *Psyr3420* et *Psyr4880* (Tableau 1). Les souches des clusters E et D partageaient les mêmes allèles à six des sept loci étudiés mais différaient pour le locus *Psyr3208* (Tableau 1). Sept souches possédaient un ST unique et étaient isolées dans l'arbre (P135, P129, P134, P103, P138, P108, P101). Ces souches appartenaient aux clades 2b (5%) et 2d (7%) (Figure 1). Les différents complexes clonaux, et même les différents clusters contenaient des souches isolées de lots de semences produits dans des pays différents et à des dates différentes. Aucune de structuration des groupes de souches par origine géographique ou année d'isolement n'était visible.

**Les souches du cluster A prédominent également dans des lots de semences de *C. pepo* subsp. *pepo* produits récemment (entre 2018 et 2020) dans différents pays.** Les échantillons d'ADN extraits à partir de tapis bactériens après une étape d'enrichissement sur milieu de culture provenaient de 27 lots de semences de courge, principalement des courgettes et des citrouilles (*C. pepo* subsp. *pepo*), testés positifs lors des contrôles avec le test de bio-qPCR ciblant *syIC*. S'agissant d'échantillons Bio-PCR, les tailles de population n'ont pas été quantifiées dans les lots de semences. Ils ont ensuite été caractérisés avec le test q-PCR multiplex (Tableau 3). Sur les 27 lots positifs, 22 (81%) étaient contaminés par des bactéries du cluster A (présence simultanée de *syIC* et *avrRpt2*) (Tableau 3). Trois lots étaient contaminés par des bactéries possédant *syIC* et l'effecteur *hopZ5*, donc des souches à gamme d'hôtes large. Deux lots étaient contaminés par des bactéries appartenant au clade 2d. Enfin, pour quatre lots une amplification a été obtenue simultanément pour *syIC*, *avrRpt2* et *hopZ5*, indiquant potentiellement une contamination par des souches VCZ à gamme d'hôte étroite et par des souches VCZ à gamme d'hôtes large dans un même lot.

Tableau 3. Identification des souches contaminant les lots de semences produits dans différents pays entre 2018 et 2020 et déclarés positifs par le test bio-qPCR ciblant syIC.

Code du lot*	Espèce	Type	Pays (Region)**	Année	Détection***	Résultats du test qPCR multiplex pour chaque marqueur***				
					syIC	syIC	avrRpt2	hopZ5	PG 2d	
Lot 1	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 2	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 3	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 4	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 5	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 6	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 7	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 8	inconnu	inconnu	inconnu	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 9	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 10	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	France (V)	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 11	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 12	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 13	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 14	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 15	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 16	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 17	<i>C. moschata</i>	butternut	Inde	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 18	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	citrouille	Chine	2018	+	+	+	(A)	-	-
Lot 19	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	+	-
Lot 20	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	+	(A)	+	(E)
Lot 21	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	France (A)	2018	+	+	-	-	-	+
Lot 22	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	France (V)	2018	+	+	-	-	-	+
Lot 23	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2018	+	+	-	-	+	-
Lot 24	<i>C. moschata</i>	butternut	Thaïlande	2018	+	+	-	-	+	-
Lot 25	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chili	2018	+	+	-	-	+	-
Lot 26	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2020	+	+	+	+	+	-
Lot 27	<i>C. pepo</i> subsp. <i>pepo</i>	courgette	Chine	2020	+	+	+	+	+	-
Total					27	27	22	7	2	

**Des contaminations par des souches VCZ sont détectées dans les lots parentaux de semences des parcelles faisant l'objet d'un suivi épidémiologique, elles concernent au moins 20% des lots en 2018 et au moins 38% en 2019.** Les semences étaient analysées, après extraction d'ADN directe sur les macérats avec le test qPCR basé sur *sy/C* et avec le test qPCR multiplex. Les souches VCZ du cluster A n'ont pas été détectées dans ces semences, puisqu'aucun résultat ne montrait la présence simultanée de *sy/C* et *avrRpt2*, mais certains lots étaient contaminés par des souches VCZ à gamme d'hôtes large (*sy/C* + *hopZ5*) (Tableau 4). En 2018, cinq lots de semences (♀G, ♂H, ♀E, ♂F et ♀♂P) ont été semés dans les parcelles et seul le lot parental P était contaminé à 0,14 % (qPCR ciblant *sy/C*) avec une charge bactérienne de  $1 \times 10^4$  ufc dans 500 graines (Tableau 4). Le lot ♀E, était considéré comme douteux (un seul replicat sur les deux était positif) avec un taux de contamination de 0,08% et  $3,5 \times 10^3$  ufc dans un échantillon de 500 graines. Le lot ♂F n'a pas été détecté contaminé et les lots ♀G et ♂H n'ont pas été testés. En 2019, trois (♀A, ♂B, et ♂F) des huit lots parentaux étaient détectés contaminés (Tableau 4). Les taux de contamination étaient compris entre 0,13 % et 0,2 % sur la base des analyses avec le test q-PCR *sy/C*. Les charges bactériennes étaient quantifiées à  $7,2 \times 10^4$  ufc pour 100 graines (lot ♀A) et de  $2$  à  $4 \times 10^3$  ufc pour 500 graines (lots ♂B et ♂F). Dans ces trois lots, des bactéries possédant l'effecteur *hopZ5* étaient identifiées avec le test q-PCR multiplex. Globalement, dans ces lots et pour les mêmes sous-échantillons, la charge bactérienne quantifiée avec le test qPCR ciblant *sy/C* correspondait à celle quantifiée par le test *hopZ5* suggérant que la contamination correspondait à des bactéries possédant à la fois *sy/C* et *hopZ5*, donc potentiellement des bactéries VCZ à gamme d'hôtes large (Tableau 4, Tableau supplémentaire 2). Les lots parentaux ♀C, ♂D, avec une répétition sur deux positive, ont été considérées comme douteux et avaient un taux de contamination estimé à 0,22%. Une contamination potentielle avec  $7 \times 10^2$  ufc positives pour *hopZ5* pour 100 graines du lot ♂D a été détectée avec le test q-PCR multiplex. Dans le lot parental ♀C, seulement *sy/C* a été identifié indiquant une contamination potentielle par des bactéries du clade 2b ou une contamination sous le seuil de détection pour le test qPCR multiplex. Ainsi, pour les deux années, aucun lot parental n'était détecté contaminé par des souches VCZ du cluster A, ni par des souches appartenant au clade 2d (Tableau 4).

**Des souches de *P. syringae* possédant le gène *sy/C* sont mises en évidence sur courgettes et sur adventices dans les parcelles de production de semences de courgettes.** L'état sanitaire global des parcelles était bon, avec peu de plantes symptomatiques. Des plantes avec divers symptômes foliaires ont toutefois été observées et prélevées. La plupart des symptômes observés consistaient en des taches nécrotiques localisées circulaires ou angulaires sur les feuilles, parfois entourées d'un halo jaune, des chloroses, des épaissements du collet et des retards de croissance. Les 1182 échantillons collectés dans les 20 parcelles étaient analysés en duplicat avec les tests q-PCR *sy/C* sur les ADN extraits à partir du macérat des broyats végétaux. Au total, 102 échantillons étaient détectés positifs, dont 53 échantillons de courgette et 49 échantillons d'adventices (Tableau supplémentaire 1). Ces échantillons positifs proviennent de 14 parcelles différentes dont six en Limagne, sept en Vallée du Rhône et une en Anjou (Figure supplémentaire 1).

Tableau 4. Données représentant l'état sanitaire des lots parentaux de semences et des lots de graines produits en 2018 et 2019 dans les parcelles faisant l'objet d'un suivi épidémiologique.

Lots de semences				Résultat au Test q-PCR <i>sy/C</i>			Taux de contamination (%) <sup>4</sup>				Tailles moyennes de population quantifiée dans les échantillons de 500 ou 100 graines (log ufc/ech) (SEM) <sup>7</sup>							
Variété	Année	Région	Parcelle	Echantillonnage <sup>1</sup>	Sous-échantillons positifs <sup>2</sup>	Sous-échantillons douteux <sup>3</sup>	<i>sy/C</i>	<i>avrRpt2</i> <sup>5</sup>	<i>hopZ5</i> <sup>5</sup>	2d <sup>5</sup>	<i>sy/C</i>		<i>avrRpt2</i>		<i>hopZ5</i>		2d	
											500 graines	100 graines	500 graines	100 graines	500 graines	100 graines	500 graines	100 graines
Parent ♀ A	2019	-	-	(8 x 100) + (3 x 500)	1 + 0	0 + 0	0,13 <sup>B</sup>	< DT <sup>6</sup>	0,13 <sup>B</sup>	< DT	nt	4,86 (± 0,99)	nt	< DT	nt	4,09 (± 1,28)	nt	< DT
Parent ♂ B	2019	-	-	(5 x 100) + (1 x 500)	0 + 1	0 + 0	0,2 [0,05 ; 0,6] <sup>A</sup>	< DT	0,2 [0,05 ; 0,6] <sup>A</sup>	< DT	3,36 (± 0,47)	nt	< DT	< DT	1,92 <sup>5</sup>	nt	< DT	< DT
Production ♀ A X ♂ B	2019	VDR	Limagne PL 1	(6 x 100) + (1 x 500)	1 + 0	0 + 0	0,18 <sup>B</sup>	< DT	< DT	0,18 <sup>B</sup>	nt	4 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	4,19 (± 0,15)
			Limagne PL 2	(5 x 100) + (1 x 500)	3 + 1	0 + 0	0,9 [0,2 ; 2,1] <sup>A</sup>	< DT	< DT	0,9 [0,2 ; 2,1] <sup>A</sup>	4,53 (± 0,51)	4,67 (± 0,30)	< DT	< DT	< DT	< DT	4,99 (± 0,55)	5,48 (± 0,12)
			VDR PL 3	7 x 100	3	0	0,55 <sup>B</sup>	< DT	≥ 0,15 <sup>B</sup>	≥ 0,33 <sup>B</sup>	nt	3,78 (± 0,20)	nt	< DT	nt	2,97 (± 0,10)	nt	5,21 (± 0,03)
Parent ♀ C	2019	-	-	(5 x 100) + (3 x 500)	0 + 0	1 + 0	0,22 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	nt	3,15 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT
Parent ♂ D	2019	-	-	(5 x 100) + (2 x 500)	0 + 0	1 + 0	0,22 <sup>B</sup>	< DT	0,22 <sup>B</sup>	< DT	nt	5,3 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	2,9 <sup>5</sup>	nt	< DT
Production ♀ C X ♂ D	2019	VDR	Limagne PL 4	5 X 100	1	1	0,22 <sup>B</sup>	< DT	0,22 <sup>B</sup>	< DT	nt	4,72 (± 0,58)	nt	< DT	nt	6,02 (± 0,02)	nt	< DT
			Limagne PL 5	(9 X 100) + (2 x 500)	7 + 1	0 + 1	1,49 <sup>B</sup>	0,69 <sup>B</sup>	0,28 <sup>B</sup>	< DT	4,86 (± 0,40)	5,01 (± 0,21)	< DT	4,36 (± 0,24)	< DT	3,03 (± 0,49)	< DT	< DT
Parent ♀ E	2019	-	-	(5 x 100) + (3 x 500)	0 + 0	0 + 0	< DT	< DT	< DT	< DT	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Parent ♂ F	2019	-	-	(9 x 100) + (2 x 500)	0 + 1	0 + 0	0,14 <sup>B</sup>	< DT	0,14 <sup>B</sup>	< DT	3,68 (± 0,58)	nt	< DT	nt	2,33 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt
Production ♀ E X ♂ F	2019	Limagne	PL 6	(7 x 100) + (1 x 500)	1 + 0	4 + 1	0,15 <sup>B</sup>	< DT	< DT	0,15 <sup>B</sup>	2,72 <sup>5</sup>	3,72 (± 0,63)	< DT	< DT	< DT	< DT	< DT	6,68 (± 0,08)
			PL 7	(5 x 100) + (1 x 500)	1 + 0	1 + 0	0,1 [0,05 ; 0,4] <sup>A</sup>	< DT	< DT	< DT	nt	2,81 <sup>5</sup>	< DT	< DT	< DT	< DT	< DT	
			PL 8	5 x 100	0	2	0,51 <sup>B</sup>	< DT	0,22 <sup>B</sup>	< DT	nt	3,71 (± 1,00)	nt	< DT	nt	4,12 <sup>5</sup>	nt	< DT
Parent ♀ G	2019	-	-	nt <sup>8</sup>	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Parent ♂ H	2019	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Production ♀ G X ♂ H	2019	VDR	Limagne PL 9	7 x 100	5	0	1,24 <sup>B</sup>	< DT	1,24 <sup>B</sup>	< DT	nt	5,15 (± 0,41)	nt	< DT	nt	5,61 (± 0,3)	nt	< DT
			Limagne PL 10	7 x 100	5	0	1,24 <sup>B</sup>	< DT	1,24 <sup>B</sup>	< DT	nt	5,41 (± 0,25)	nt	< DT	nt	5,81 (± 0,02)	nt	< DT
Parent ♀ E	2018	-	-	3 x 500	0	1	0,08 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	3,54	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	nt
Parent ♂ F	2018	-	-	5 x 100	0	0	< DT	< DT	< DT	< DT	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Production ♀ E X ♂ F	2018	VDR	Limagne PL 11	6 x 100	0	1	0,18 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	nt	2,68 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT
			Limagne PL 12	6 x 100	1	0	0,18 <sup>B</sup>	< DT	0,18 <sup>B</sup>	0,18 <sup>B</sup>	4,20 (± 0,44)	nt	< DT	nt	< DT	3,05 <sup>5</sup>	< DT	1,02 <sup>5</sup>
			Limagne PL 13	(5 x 100) + (1 x 500)	4 + 1	1 + 0	≥ 5 <sup>B</sup>	0,2 [0,05 ; 0,6] <sup>A</sup>	0,5 [0,1 ; 1,3] <sup>A</sup>	< DT	4,64 (± 0,13)	4,00 (± 0,11)	< DT	< DT	3,87 (± 1,23)	< DT	< DT	< DT
			Limagne PL 14	(5 x 100) + (1 x 500)	5 + 1	0 + 0	≥ 5 <sup>B</sup>	0,2 [0,05 ; 0,6] <sup>A</sup>	0,2 [0,05 ; 0,6] <sup>A</sup>	< DT	8,68 (± 0,56)	8,42 (± 0,14)	7,11 (± 1,49)	4,07 (± 2,53)	6,71 (± 0,13)	< DT	< DT	< DT
Parent ♀ G	2018	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Parent ♂ H	2018	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
Production ♀ G X ♂ H	2018	VDR	Limagne PL 15	2 x 500	0	0	< DT	< DT	< DT	< DT	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
			Limagne PL 16	2 x 500	1	0	0,14 <sup>B</sup>	< DT	0,14 <sup>B</sup>	< DT	3,90 (± 0,29)	nt	< DT	nt	< DT	3,97	< DT	< DT
			Limagne PL 17	2 x 500	0	1	0,14 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	4,13 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	nt
Parent P	2018	-	-	(5 x 100) + (2 x 500)	0 + 1	0 + 0	0,14 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	4,11 (± 0,53)	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	nt
Production ♀ P X ♂ P	2018	VDR	Anjou PL 18	2 x 500	1	0	0,14 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	3,97 (± 0,41)	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	nt
			Limagne PL 19	3 x 500	0	1	0,14 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	4,48 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	< DT
			Limagne PL 20	3 x 500	0	1	0,14 <sup>B</sup>	< DT	< DT	< DT	3,6 <sup>5</sup>	nt	< DT	nt	< DT	nt	< DT	nt

<sup>1</sup> Nombre de sous-échantillons x nombre de graines par sous-échantillon.

<sup>2</sup> Nombre de sous-échantillons positifs au test q-PCR ciblant *sy/C* parmi les sous-échantillons testés. Un sous-échantillon est considéré positif si les duplicats sont tous les deux positifs.

<sup>3</sup> Un sous-échantillon est douteux si un seul des duplicats est positif au test q-PCR ciblant *sy/C*.

<sup>4</sup> Le taux de contamination d'un lot est calculé par les tables de Swaroop et l'intervalle de confiance est précisé (A) ou par la formule de Maury (B) selon le sous-échantillonnage utilisé. Lorsque les résultats douteux sont pris en compte, le taux de contamination est écrit en vert et en italique, si seules les données Consolidées sont utilisées, la valeur est en noir et gras.

<sup>5</sup> Pour *avrRpt2*, *hopZ5* et 2d le calcul du taux de contamination prend en compte les échantillons testés négatifs avec le test q-PCR *sy/C* qui n'ont pas été testés en q-PCR multiplex.

<sup>6</sup> (DT) Seuil de détection théorique calculé selon les volumes d'ADN extrait et les volumes de macération. Inférieur au seuil de détection fixé à 300 bactéries pour un échantillon de 100 graines et 1500 bactéries pour un échantillon de 500 graines pour le test q-PCR ciblant *sy/C* et 1500 bactéries pour un échantillon de 100 graines et 7500 bactéries pour un échantillon de 500 graines pour *avrRpt2*, *hopZ5* et 2d (test q-PCR multiplex).

<sup>7</sup> Les valeurs sans SEM indiquent que seule une répétition sur deux était au dessus du seuil de détection.

<sup>8</sup> (nt) non testé.

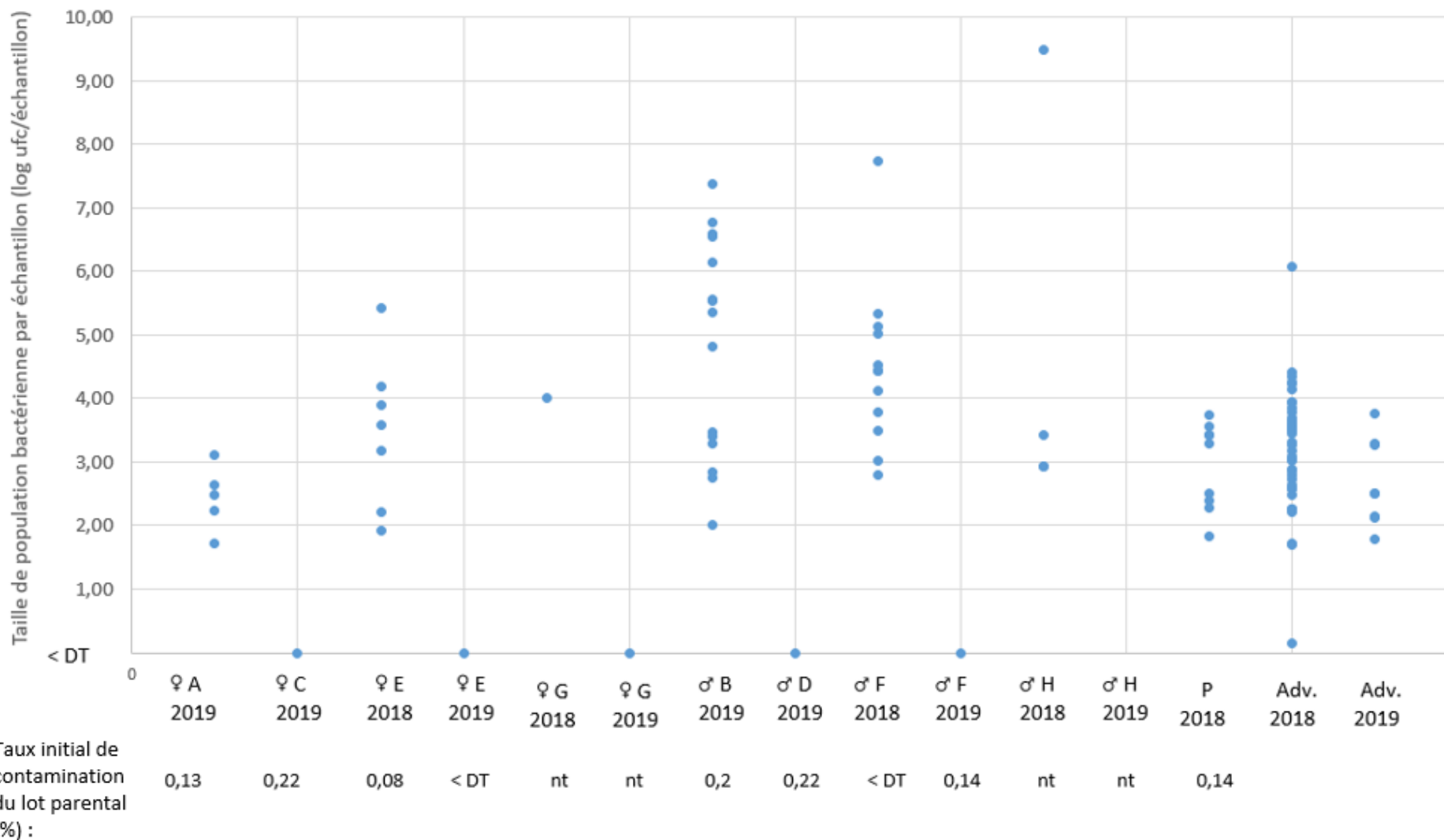


Figure 2. Distribution des tailles de populations (log ufc/échantillon) détectées avec le test q-PCR *sy/C* dans des échantillons de courgette (♀ et ♂) et des adventices (adv.) collectés en 2018 et 2019 dans les parcelles.

L'incidence de la contamination était supérieure en 2018 (12,37 %) par rapport à 2019 (4,79 %). L'incidence n'était d'ailleurs pas liée à la génétique des parents puisque la variété ♀G × ♂H était peu contaminée en 2019, mais bien plus en 2018. Pour les variétés ♀A × ♂B (2019), ♀E × ♂F (2018), ♀G × ♂H (2018) et ♀P × ♂P (2018), des échantillons foliaires de courgette d'un ou des deux parents étaient détectés contaminés dans plusieurs parcelles situées dans différentes régions (Figure supplémentaire 1). Des adventices contaminés ont également été échantillonnées dans 12 parcelles sur 20 (Figure supplémentaire 1). En moyenne, les échantillons contaminés de courgette mâle portaient une charge bactérienne de  $4,78 \times 10^4$  ( $\pm 1,23$ ) ufc par échantillon et les échantillons contaminés de courgettes femelle portaient une charge bactérienne de  $1,32 \times 10^3$  ( $\pm 1,51$ ) ufc par échantillon (Tableau supplémentaire 1, Figure 2). Ces charges bactériennes sont significativement différentes (P-valeur =  $9 \times 10^{-4}$ ; test de student). Les adventices contaminées portaient en moyenne des charges bactériennes de  $1,29 \times 10^3$  ( $\pm 1,44$ ) ufc par échantillon. Néanmoins, certaines plantes portaient des charges bactériennes relativement élevées comme la betterave ( $1,18 \times 10^6 \pm 1,02$  ufc par échantillon) ou des adventices telles la folle avoine, le chénopode blanc et la renouée persicaire ( $> 10^4$  ufc par échantillon) (Tableau supplémentaire 1).

**Aucune souche VCZ n'est isolée dans les parcelles en végétation.** Quarante et une souches ont été isolées à partir des aliquotes de macérats bruts détectés contaminés par le test qPCR ciblant *sy/C* (Tableau supplémentaire 1). Toutes les souches isolées sur les plantes en végétation appartenaient au clade 2b (28%) ou au clade 2d (72%). Au sein de ces deux clades, les souches isolées dans les parcelles sont distribuées sur de nombreuses branches, avec quelques petits regroupements (Figure 3). Ainsi, au sein du clade 2b, cinq souches, isolées dans la parcelle PL 14 en Vallée du Rhône à partir d'une courgette (♂F), de colza et d'une adventice (*Datura stramonium*), sont portées par une branche solide (supportée par valeur de bootstrap de 100%) et sont proches de la souche CC440 isolée de melon en France.

**Les lots de graines produites dans les parcelles sont contaminés par des souches du cluster A, des souches appartenant aux autres clusters VCZ à gamme d'hôtes large et des souches du clade 2d (Tableau 4).** Pour chaque parcelle visitée, un lot de graines de 1500 à 2000 graines brutes a été fourni. Les lots de graines ont été analysés par qPCR sur les ADN extraits à partir des macérats. Quatorze des 20 lots de graines produits dans les parcelles en 2018 et 2019 étaient détectés contaminés avec le test q-PCR (Tableau 4). Et cinq lots supplémentaires étaient considérés douteux car la contamination n'a été obtenue que pour l'un des deux réplicats. Les taux de contamination des lots de graines des différentes variétés étaient compris entre 0,14 % et > 5 %. Les taux de contamination des lots de graines hybrides produits étaient supérieurs ou égaux aux taux de contamination des lots parentaux (Tableau 4). Pour une même variété, les taux de contamination des lots de graines produits en Vallée du Rhône étaient supérieurs ou égaux à ceux produit en Limagne. De plus, les tailles de populations bactériennes déterminées par qPCR (test qPCR sur *sy/C*) sont également supérieures en Vallée du Rhône à celles des lots produits en Limagne ou au moins égales (Tableau 4).

Sur la base du test q-PCR multiplex et d'isolements, des bactéries appartenant au cluster A étaient identifiées dans trois lots de graines produites en Vallée du Rhône (Tableau 4, Tableau supplémentaire 1, Figure 3).



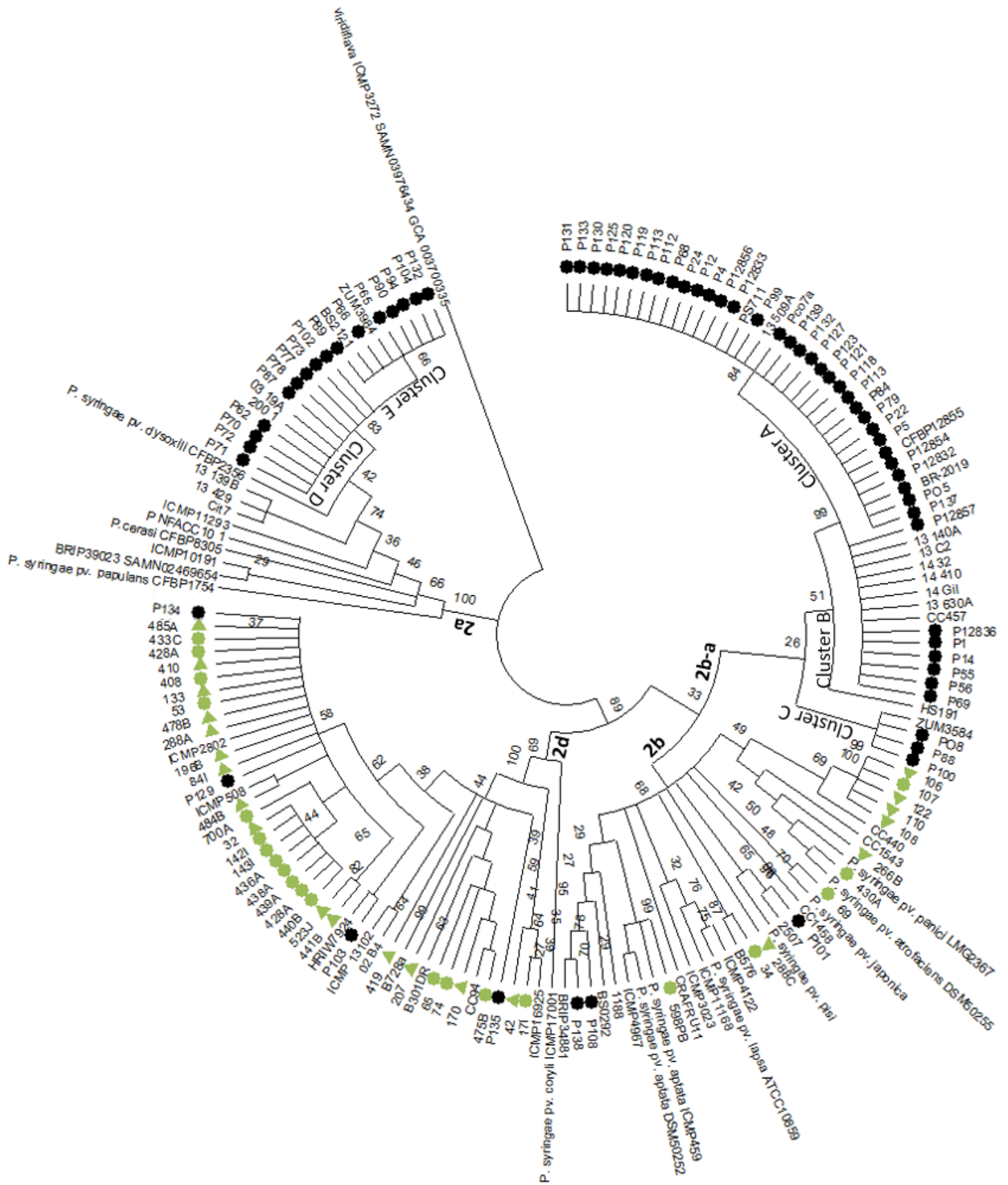


Figure 3. Arbre en maximum de vraisemblance (ML) construit sur les séquences concaténées (1452 pb) des fragments de trois gènes de ménage (*P syr3420*, *P syr4880* et *P syr3208*) de 165 souches du complexe d'espèce *P. syringae* (Phylogroupe 2). Les valeurs de bootstrap (% sur 1000 replicats) supérieures à 80% sont indiquées sur les branches. Un rond noir indique que les souches ont été isolées de lots de semences de courgette, un rond vert que les souches ont été isolées de courgette en végétation lors des prospections en 2018 et 2019 et un triangle vert que les souches ont été isolées d'adventices lors des prospections en 2018 et 2019.

Ainsi, le lot PL5 de la variété ♀C × ♂D (2019) était contaminé à 0,69 % par des souches du cluster A et une souche a été isolée (Br-2019). Le lot PL13 de la variété ♀E × ♂F (2018) était potentiellement contaminé à 0,2 % par des souches du cluster A (taux de contamination calculé avec des échantillons douteux) et le lot PL14 de la même variété était contaminé à 0,2 % et une souche a été isolée (P05). Il est intéressant de mentionner que pour ces trois lots, des souches possédant *hopZ5* étaient identifiées simultanément dans les échantillons contaminés. De plus, une souche appartenant au cluster C (P08) a été isolée dans le lot PL 14 (Tableau 4, Figure 3). Sur la base des quantifications des populations bactériennes, les tailles des populations des souches du cluster A étaient supérieures à celles des souches (*syIC* + *hopZ5*), donc des autres clusters VCZ (Tableau 4). Pour les autres lots de graines, les contaminations par des souches à large gamme d'hôtes (*syIC* + *hopZ5*) étaient détectées dans des lots de différentes variétés produits dans les parcelles en Limagne (PL4, et PL9) et en Vallée du Rhône (PL3). Ces souches n'ont néanmoins pas pu être isolées. Les tailles de population des souches à large gamme d'hôtes sont particulièrement élevées dans les lots produits en Limagne. Ainsi, les tailles de population étaient quantifiées dans les échantillons contaminés entre  $9,3 \times 10^3$  ufc dans 100 graines à  $1 \times 10^6$  ufc dans 100 graines (Tableau 4, Tableau supplémentaire 2). Enfin, quatre lots de graines appartenant à différentes variétés et produits dans les parcelles PL1, PL2, PL3 et PL6 sont contaminés par des bactéries appartenant au clade 2d. Les tailles de populations quantifiées pour le clade 2d sont parfois plus importantes que celles quantifiées avec le test qPCR *syIC* (lots PL3 et PL6), ce qui pourrait indiquer une contamination par différentes bactéries du clade 2d, certaines possédant le gène *syIC*, d'autres ne le possédant pas. Plusieurs souches appartenant au clade 2d ont été isolées dans la parcelle PL1 en végétation et celles-ci auraient peut-être pu se transmettre aux graines de courgette produites. Le lot de graines de la variété ♀P × ♂P produit sous abri en Anjou était positif comme le lot parental et probablement aussi les lots produits en Vallée du Rhône, en Limagne (douteux) qui auraient un taux de contamination identique à celui du lot parental (0,14 %). L'analyse des échantillons avec le test q-PCR multiplex n'a pas permis d'aller plus loin dans l'identification des souches présentes dans ces lots.

**Les souches P99-R (cluster A) et P66-R (cluster E) se transmettent par les voies vasculaires et florales aux graines, mais seule la souche P66-R se transmet aux graines par contact (Figure 4).** Les tests de transmission visant à identifier les voies empruntées par deux souches représentatives des clusters A et E ont été conduits sur trois années consécutives sous serre. Les plantes-mères étaient inoculées par : (i) la voie florale (ii) la voie vasculaire et (iii) par contact. En 2018, l'inoculum était calibré à  $10^5$  ufc/mL en 2019 et 2020 à  $10^7$  ufc/mL. Les lots de graines matures (un lot correspond aux graines d'un fruit, avec un seul fruit par plante inoculée) étaient analysés par bioPCR en 2018 ou par dénombrement sur milieu sélectif en 2019 et 2020. En plus, la dernière année, des qPCR étaient réalisées sur ADN extraits à partir des macérats. Les plantes inoculées n'ont pas développé de symptômes au cours de la culture et les fruits récoltés à maturité étaient non-symptomatiques, sauf pour la voie par contact où des petites protubérances sèches se sont développées sous le patch inoculé sur le péricarpe du fruit (figure supplémentaire 2). La dose d'inoculum la plus élevée a conduit à une augmentation du nombre de fruits avortés précocement pour les voies florales et vasculaires pour les deux souches et ce particulièrement en 2020 où des attaques fongiques se sont manifestées pendant le cycle cultural (Figure 4). Les fruits avortés étaient symptomatiques et fortement contaminés par les souches inoculées (données non présentées). La voie par contact n'induit pas d'avortements pour les deux doses testées et les deux souches inoculées.

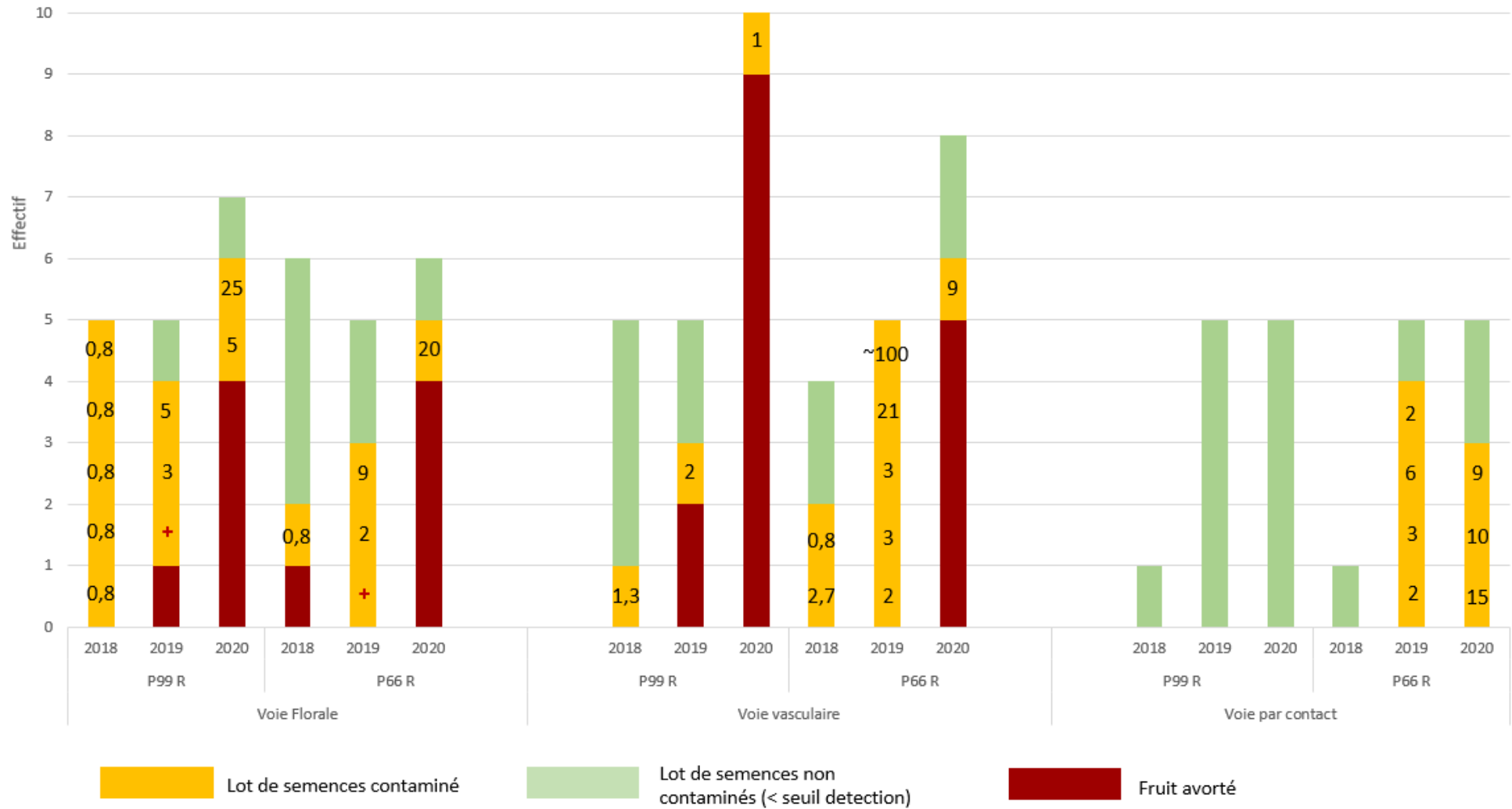


Figure 4. État sanitaire des lots de semences produits en 2018, 2019 et 2020 après inoculation des souches P99 R ou P66 R dans les plantes porte-graine par voie florale, vasculaire ou par contact. Les plantes ont été inoculées avec des suspensions bactériennes calibrées à  $1 \times 10^5$  ufc / mL en 2018 et à  $1 \times 10^7$  ufc / mL en 2019 et 2020. Une barre rouge indique que le fruit a avorté avant la récolte, une barre jaune indique que le fruit a été récolté et que les graines étaient contaminées et une barre verte indique que le fruit a été récolté mais qu'aucune contamination n'était détectable dans les graines (sous le seuil de détection, <SD). Aucun fruit avorté ni aucune contamination n'ont été détectées pour les inoculations avec de l'eau (non rapporté). Les valeurs indiquées dans les barres jaunes sont les taux de contamination des lots (%). Pour des résultats détaillés, se référer au Tableau Supplémentaire 4. (+) indique que le lot est contaminé mais que le taux de contamination n'a pas pu être déterminé par le sous-échantillonnage effectué.

Les souches P66-R et P99-R se sont transmises par la voie florale aux graines, avec les deux concentrations d'inoculum et à chaque essai. Néanmoins, l'efficacité de transmission par la voie florale de P66-R (5 fruits avortés, 5 lots contaminés et 7 lots non contaminés) était globalement inférieure à celle de P99-R (5 fruits avortés, 10 lots contaminés et 2 lots non contaminés) (Figure 4). La situation était différente pour la voie vasculaire empruntée par les deux souches à chaque essai. La souche P99-R engendrait de nombreux avortements et peu de contaminations efficaces des graines (11 fruits avortés, 3 lots contaminés et 6 lots non contaminés) alors que la souche P66-R contaminait plus efficacement les graines dans un nombre plus élevé de fruits allant à maturité (5 fruits avortés, 8 lots contaminés et 4 lots non contaminés). Aucune contamination des graines par contact avec un fruit infecté n'était détectée en 2018, et seule la souche P66-R a pu se transmettre aux graines par cette voie lorsque la concentration de l'inoculum était plus élevée en 2019 et 2020. Les plantes inoculées avec de l'eau pour chacune des voies en 2018, 2019 et 2020 n'ont pas produit de graines contaminées et aucun fruit n'a avorté.

**L'efficacité de transmission de la souche P99-R est meilleure que celle de la souche P66-R par voie florale, y compris à faible pression d'inoculum, alors que la souche P66-R se transmet de manière plus efficace par voie vasculaire que la souche P99-R.** A faible dose d'inoculum et suite à une inoculation par la voie florale, les lots de graines contaminés le sont à 0,8 % pour les cinq lots contaminés par la souche P99-R et l'unique lot contaminé par P66-R, qui avait cependant engendré l'avortement d'un autre fruit (Figure 4). Suite à une inoculation par la voie vasculaire les lots contaminés, peu nombreux pour chacune des souches, avaient un taux de contamination cependant légèrement plus élevé (de 0,8 à 2,7%) (Figure 4). Les tailles des populations bactériennes n'ont pas pu être quantifiées à cette faible pression d'inoculum.

A forte dose d'inoculum et par la voie florale, le taux de contamination des lots par P99-R était plus fort (3 à 25%) que pour P66-R (2 et 9%), et les charges bactériennes associées étaient en moyenne plus élevées pour P99-R ( $6,76 \times 10^4 (\pm 25)$  ufc par lot de 50 graines) que pour P66-R ( $3,39 \times 10^2 (\pm 2)$  ufc par lot de 50 graines) (Tableau supplémentaire 3). Par la voie vasculaire P66-R était très efficace et les nombreux lots contaminés l'étaient à des taux variant entre 2 % et ~ 100% avec des charges bactériennes allant de  $2,88 \times 10^1$  à  $7,94 \times 10^7$  ufc par lot de 50 graines, alors que la fréquence et les taux étaient inférieurs pour P99-R, les charges bactériennes également ( $3,02 \times 10^1$  ufc par lot de 10 et  $1,23 \times 10^4$  ufc par lot de 50 graines). Cette souche engendrait, de plus, de nombreux avortements de fruits. L'inoculation par contact conduisait à une forte contamination des lots de graines (7 lots sur 10) par P66-R et des taux compris entre 2 et 15 % et des tailles de population variant de  $7,94 \times 10^1$  ufc par lot de 50 graines à  $5,01 \times 10^5$  ufc par lot de 50 graines (Figure 4, Tableau supplémentaire 3).

**Les bactéries du cluster A et P66-R se transmettent très efficacement à la plantule même à partir de graines faiblement contaminées.** Pour analyser la transmission des bactéries aux plantules, deux lots de semences très contaminés par des souches du cluster A ou du cluster E étaient utilisés (Figure 5). Un lot était contaminé à 71% suite à l'inoculation du porte-graine par P66-R par la voie vasculaire (cluster E). L'autre lot comprenait des semences naturellement contaminées à un taux de 63% par des souches du cluster A (Figure 5). La distribution des contaminations dans ces lots était classique avec une majorité de graines peu ou pas contaminées (seuil de détection à 1 ufc par graine), et des charges bactériennes par graine allant à  $6,81 \times 10^7$  ufc/graine pour le lot naturellement contaminé et  $6,30 \times 10^7$  ufc par graine pour le lot contaminé par P66-R (Figure 5).

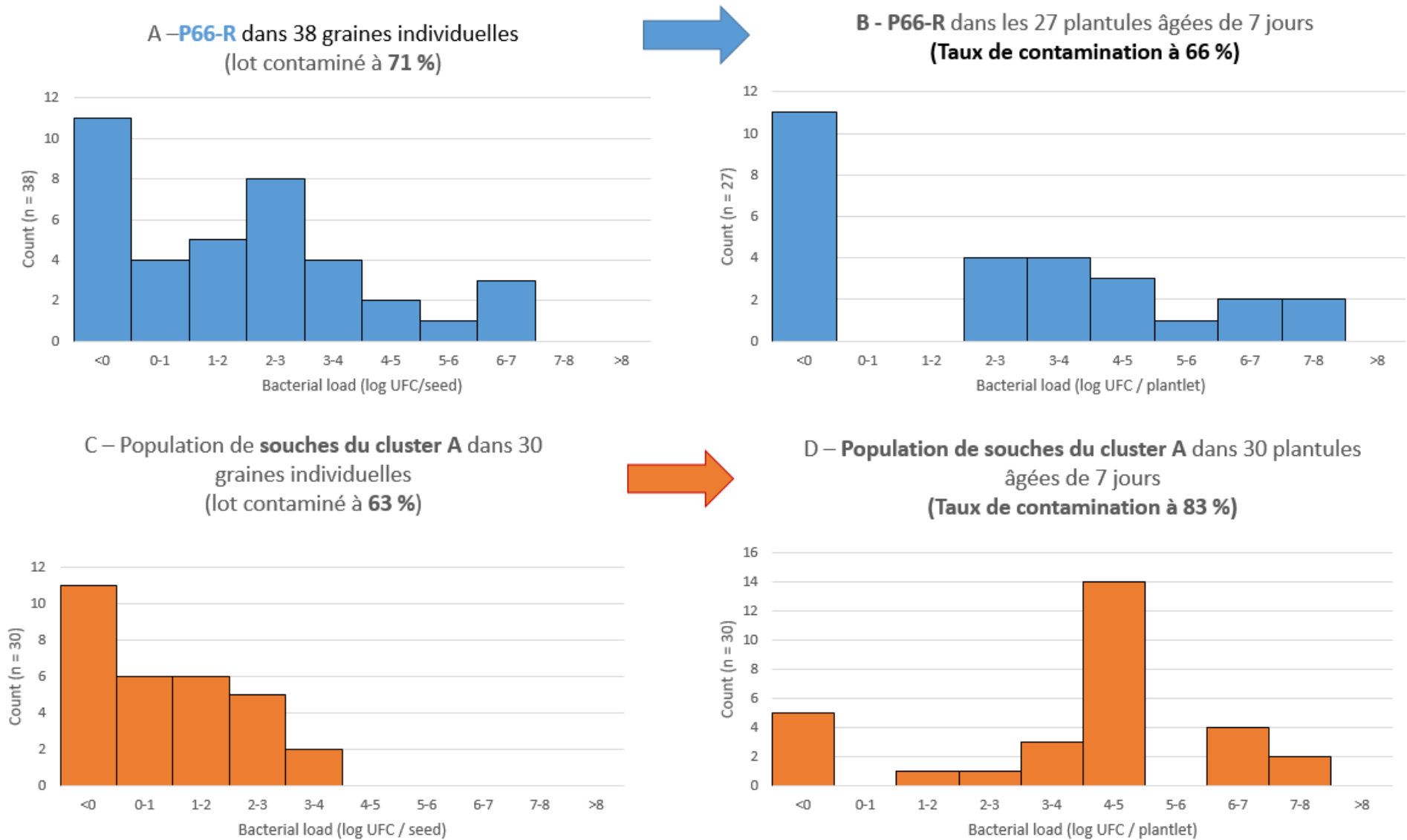


Figure 5. Transmission des bactéries des graines aux plantules. Taille des populations bactériennes dénombrées sur graines (A et C) et patrie aérienne des plantules (B et D) 7 jours après semis d'un lot de semences contaminé par P66-R (A) et d'un lot naturellement contaminé par des souches du cluster A (C).

Après semis, les taux de contamination des plantules âgées de sept jours sont similaires (cas du lot contaminé par P66-R) ou supérieur (cas du lot naturellement contaminé par des souches du cluster A) à ceux des lots de semences. Ce résultat met en évidence une transmission très efficace des bactéries aux plantules, même lorsque les graines sont faiblement contaminées (Figure 5). L'analyse des échantillons étant destructive, aucune corrélation graine et plantule individuelle ne peut être conduite. Pour le lot citrouille, le disque de cotylédon prélevé sur une plantule contaminée est également contaminé dans 84 % des cas (Tableau supplémentaire 4). Le disque n'a pas été détecté contaminé pour quatre plantules portant des charges bactériennes comprises entre 75 ufc par plantule et  $9,5 \times 10^4$  ufc par plantule.

## Discussion

La nervation blanche de la courgette est une maladie transmise par les semences et causée par diverses souches du complexe d'espèces *P. syringae* appartenant au phylogroupe 2 (Lacault et al. 2020). Des lots de semences hybrides de courgette produits en plein champ dans différents pays sont contaminés sans qu'aucune maladie ne soit été signalée sur les porte-graines. L'objectif de ce travail était d'identifier les origines possibles des contaminations de semences afin de pouvoir les prévenir pour limiter le recours aux opérations de désinfection des semences. Au cours de ce travail, les agents de la nervation blanche et principalement les souches des clusters A, à gamme d'hôtes étroite, et E, à large gamme d'hôtes, ont été détectées comme contaminant des lots de semences de courgette produites dans différentes régions du monde depuis 2002. Des lots de semences contaminés par des souches VCZ à large gamme d'hôtes ont été semés en Limagne et en Vallée du Rhône en 2019 et 2020. Ces souches n'ont pas été détectées sur les courgettes porte-graine en végétation, ni dans les adventices ou plantes des parcelles avoisinantes. Elles ont, en revanche, à nouveau été détectées dans les graines produites, indiquant une probable transmission verticale de ces souches. Ces agents de la VCZ se transmettent aux graines par les voies florales et vasculaires, et seules les souches à gamme d'hôte large (cluster E, représenté par la souche P66-R) se transmettent aux graines par contact de l'inoculum avec le fruit en développement. Ces souches VCZ se transmettent efficacement des graines aux plantules, même pour des charges bactériennes faibles (<100 ufc par graine) qui peuvent ne pas être détectées lors des analyses effectuées en routine sur des échantillons de 500 graines.

L'utilisation des outils de typage et de détection des souches VCZ préalablement développés (Lacault et al. 2020, en préparation) a permis de démontrer la prédominance des souches du cluster A dans les lots de semences produits entre 2002 et 2014, puis entre 2018 et 2020. Ces souches du cluster A présentent une gamme d'hôte étroite restreinte au genre *Cucurbita* spp. qui est associée à la présence du gène codant l'effecteur de type III *avrRpt2* et à l'absence de *hopZ5* (Lacault et al. 2020). Historiquement, ces souches avaient été considérées comme seules responsables de la nervation blanche de la courgette et nommées *P. syringae* pv. *peponis* (Manceau et al. 2011). Les autres souches VCZ (clusters B à E) associées à une gamme d'hôte plus large au sein des Cucurbitacées (Lacault et al. 2020) ont également été identifiées dans ces lots de semences mais également dans les lots semés et produits en Limagne et en Vallée du Rhône, en absence de souches du cluster A.





Les outils de détection et de typage développés pour ces souches constituent des aides précieuses pour leur suivi qui pourrait être réalisé à une échelle (i) locale pour les suivis dans les parcelles d'un même territoire sur une longue période temporelle dans différentes zones de productions de Cucurbitacées (ii) mondiale pour un suivi plus global des souches VCZ. D'autres outils, utiles lorsque la résolution de la MLST n'est pas suffisante, pourraient compléter ce set pour améliorer la résolution de nos analyses de dissémination des souches. C'est le cas de l'analyse du nombre variable des répétitions en tandem sur plusieurs loci (MLVA) pour MultiLocus Variable number of tandem repeat) (Ngoc et al. 2009; Pruvost et al. 2014). L'utilisation d'un tel outil nécessiterait cependant de choisir le ou les clusters devant être suivi et ne serait pas facile à développer, compte tenu des recombinaisons fréquentes entre les différents groupes de souches d'intérêt (Dillon et al. 2019b; Newberry et al. 2019) qui floutent le signal évolutif.

Le seuil de détection est-il un facteur limitant pour l'analyse des plantes en végétation, voire l'analyse des lots de semences ? De manière étonnante, les souches VCZ détectées dans les lots de semences n'ont pas été détectées dans les plantes en végétation issues de ces lots semés dans les parcelles des principaux bassins de production de semences de courgette en France, la Limagne et la Vallée du Rhône, mais l'ont été à nouveau dans les graines produites par ces porte-graines. Il s'agit des souches VCZ à large gamme d'hôtes, donc appartenant potentiellement aux clusters B à E. Une souche du cluster C a été d'ailleurs isolée dans l'un des lots de semences (PL4). Pour l'analyse des plantes en végétation, des fragments foliaires symptomatiques ont été échantillonnés. Les échantillons ont donc été collectés avec a priori pour augmenter les chances de détecter les souches VCZ. Il est difficile d'imaginer qu'une analyse massive du feuillage échantillonné sans a priori pourrait aboutir à une meilleure détection. D'une part, la charge bactérienne est en effet supérieure dans un symptôme que sur un tissu macroscopiquement sain, le développement des symptômes étant certainement consécutif à une régulation de type quorum-sensing, démontrée pour d'autres *P. syringae* phylogénétiquement proches (Arnold et al. 2011; Deng et al. 2009). D'autre part, l'effort d'analyse a été important (plus de 1000 échantillons foliaires analysés) et ne pourrait économiquement et humainement pas être accru de manière considérable pour augmenter les chances de détecter les souches. Pour les échantillons de semences, la détection a été réalisée à partir d'une aliquote du macérât de graine dont l'ADN total a été extrait. Les seuils de détection par q-PCR sont compris entre  $10^3$  et  $10^4$  bactéries par mL de macérât analysé (Lacault et al. en préparation). Pour d'autres outils q-PCR simplex ou multiplex récemment développées pour la détection de différentes sous espèces *X. fastiosa* ou différents pathotypes de *Xanthomonas* à partir d'échantillons de plantes et les seuils de détection sont comparables à nos outils (Dupas et al. 2019a; Fonseca et al. 2019). Certains lots de semences ou de graines auraient pu être contaminés avec des charges bactériennes inférieures à ces seuils et ainsi n'auraient pas été détectés dans nos analyses. Pour augmenter les chances de détecter les bactéries VCZ dans les échantillons de semences, une concentration des macérâts par centrifugation pourrait être envisagée. Lors des analyses graine à graine d'un lot naturellement contaminé par les souches du cluster A, de nombreuses graines portaient des charges bactériennes basses, inférieures à 100 ufc par graine (Figure 5). Certaines de ces charges bactériennes pourraient ne pas être détectées avec le test utilisé d'autant qu'il s'agit d'analyses de lots de 100 ou 500 graines, ce qui entraîne une dilution des cibles. Ces graines faiblement contaminées représentent un risque si elles ne sont pas détectées puisque nous avons montré que les contaminations même faibles se transmettent aux plantules en conditions favorables (Figure 5).



Les analyses des lots de semences produites commercialement sont généralement faites par Bio-qPCR. Cette technique est intéressante puisqu'elle inclut un enrichissement de l'échantillon en cibles par culture sur milieu et permet la détection de bactéries viables et cultivables. Cependant, cet enrichissement conduit à deux types de biais. (i) Il annule la possibilité de quantifier les charges bactériennes réellement présentes dans les lots de semences puisque les bactéries sont cultivées en amont de la qPCR et que le taux de multiplication n'est pas mesurable. (ii) Si cette méthode est utilisée sur des lots de semences préalablement désinfectés, le risque est non négligeable que les bactéries aient pu entrer dans un état viable mais non cultivable (VNC) suite au stress subi. Cet état est fréquent chez les bactéries contaminant les semences soumises à un stress (Jiang et al. 2016). L'état VNC a été rapporté pour différentes bactéries contaminant les semences dont *A. citrulli* sur pastèque, *P. syringae* pv. *lachrymans* sur concombre et *P. syringae* pv. *tomato* sur tomate et des protocoles de détection utilisant des marquages des cellules mortes (marquages au propidium monoazide ou au monoazide d'éthidium) ont été proposés (Tian et al. 2016; Meng et al. 2016; Chai et al. 2020).

Des données obtenues lors de ce travail viennent conforter l'hypothèse d'une transmission verticale par les semences des souches VCZ. En effet, dans cette étude, il a été montré que les lots de semences parentales peuvent être contaminés (de 0,13 % à 0,22 %) par des bactéries responsables de la nervation blanche de la courgette à large gamme d'hôtes identifiées par la présence simultanée des marqueurs *syIC* et *hopZ5* (Tableau 4). Ces bactéries pourraient potentiellement appartenir aux clusters B, C, D et E. Il est intéressant de souligner que trois lots de semences (PL3, PL4 et PL5) issus du croisement de ces lots parentaux contaminés (ou potentiellement contaminés) sont également détectés contaminés par le même profil de souches possédant simultanément *syIC* et *hopZ5*. Bien qu'aucune souche n'ait pu être isolée dans les lots de semences, il est tentant de faire l'hypothèse que ce sont ces mêmes souches qui ont été détectées dans les graines produites. Cette hypothèse est également appuyée par le fait qu'en conditions expérimentales, les bactéries du cluster E à large gamme d'hôtes se transmettent très efficacement verticalement de la plante-mère aux graines par les trois voies de transmission (florale, vasculaire et contact).

Les expérimentations menées avec un représentant du cluster A (P99-R) montrent que cette souche est capable de se transmettre aux graines sur le porte-graine par les voies florale et vasculaire en l'absence de symptôme. Le suivi épidémiologique de lots parentaux implantés dans 20 parcelles Françaises localisées dans trois zones de production de semences en 2018 et en 2019 n'a pas permis d'identifier la source d'inoculum des souches du cluster A qui ont été détectées et isolées dans certains lots de graines produites (les souches Br-2019 dans le lot PL5 et Po5 dans le lot PL14). Les souches du cluster A n'ont pas été détectées dans les lots de semences parentales avant semis ni dans les environnements de production. Il ne peut pas être exclu qu'une faible contamination avec une souche du cluster A ait été présente dans les lots parentaux.

Nos essais montrent la transmission de P99-R (Cluster A) par la voie florale et vasculaire aux graines et la transmission de P66-R (cluster E) par les voies florale, vasculaire et contact aux graines de courgette. Plusieurs études sur la transmission de bactéries par la semence sont disponibles.



Alors que les voies de transmission ont été décrites pour *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* sur tomate, *A. citrulli* sur pastèque, et *X. citri* pv. *fuscans* sur haricot (Tancos et al. 2013; Dutta et al. 2012a, 2015; Darsonval et al. 2008; Darrasse et al. 2018), peu de données sont disponibles concernant les souches du complexe d'espèces *P. syringae*. Ici nous montrons que les voies florales et vasculaires sont toutes les deux empruntées par les souches VCZ pour contaminer les semences de courgette. La voie florale semble particulièrement efficace pour la souche P99-R du cluster A puisque celle-ci arrive à se transmettre par cette voie à partir d'une faible dose d'inoculum et les tailles de populations associées sont élevées, en tous cas plus élevées, que pour la souche P66-R du cluster E (Figure 4, Tableau supplémentaire 3). La courgette est une espèce entomophile dont la pollinisation dépend exclusivement des abeilles (Nepi and Pacini 1993). Les abeilles pourraient inoculer les stigmates et disséminer les souches VCZ au sein des parcelles. Il a été montré qu'une abeille domestique (*Apis mellifera*) abritait en moyenne une charge bactérienne de  $1 \times 10^5$  ufc qui est susceptible d'être déposées dans les fleurs lorsque celle-ci sont visitées (Prado et al. 2020; Ushio et al. 2015; Pattemore et al. 2014). De plus, il a été montré que des colonies de *P. syringae* pv. *syringae* et de *P. syringae* pv. *actinidiae* peuvent se maintenir viables dans les ruches pendant six à quatorze jours, les abeilles pouvant ensuite disperser ces bactéries dans les parcelles (Pattemore et al. 2014). La voie vasculaire est empruntée par P66-R et P99-R lors d'une injection directe de l'inoculum dans le pédoncule de la fleur. En conditions de production, il serait possible que les souches VCZ empruntent la voie vasculaire, soit parce que transmises par les semences, elles se sont rapidement vascularisées sur les plantules, soit parce qu'apportées par voie aérienne sur les plantes, elles ont ensuite gagné le système vasculaire en pénétrant par leurs ouvertures naturelles que sont les hydathodes ou par des blessures causées par l'abrasion entre feuilles, le vent et les pratiques agricoles (passages de tracteur, effeuillage). La pénétration des bactéries par les hydathodes a été très clairement démontrée pour *X. campestris* pv. *campestris* sur chou et arabette (Cerutti et al. 2017). Les hydathodes sont des pores d'eau connectés au xylème et situés en bordure des feuilles (Cook et al. 1952). Dans des conditions de transpiration limitée et d'absorption d'eau (sols chauds et forte humidité dans l'obscurité, par exemple), la sève brute est expulsée à travers les hydathodes, c'est la guttation. Des bactéries épiphytes peuvent alors être mise en suspension dans ce fluide et être ainsi absorbées lorsque les conditions ambiantes changent.

La transmission des bactéries par les voies florale et vasculaire est dépendante de différents mécanismes moléculaires, dont la sécrétion d'effecteurs par le système de sécrétion de type III et l'adhésion (Darsonval et al. 2008, 2009). Ainsi, des mutants dans des gènes codant les régulateurs et la machinerie de sécrétion de type 3 (les gènes *hrpG*, *hrpX* et *hrcV*, par exemple) de *X. citri* pv. *fuscans* ne sont plus capables de coloniser le système vasculaire du haricot et de se transmettre aux graines. Pour la voie florale, ces mêmes mutants peuvent se transmettre mais de façon moins efficace que la souche sauvage (Darsonval et al. 2008). Chez *X. citri* pv. *fuscans*, a également été montré que l'adhésine PIIA est essentielle pour la transmission aux graines par la voie vasculaire et que les adhésines XadA1, FhaB avaient un rôle partiel dans cette transmission (Darsonval et al. 2009). Ces adhésines sont nécessaires pour la colonisation du xylème avant transmission aux graines mais elles ne sont pas nécessaires pour une transmission par la voie florale (Darsonval et al. 2009). Pour les souches VCZ, il serait intéressant d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans ces deux voies de transmission. Enfin, la souche P66-R peut se transmettre par contact à partir du péricarpe du fruit inoculé.



Cette souche pourrait pénétrer par les ouvertures naturelles, telles que stomates ou lenticelles ou par des blessures faites lors de l'inoculation, alors que la couche cuticulaire du fruit des *Cucurbita* spp. est encore assez fine (Sutherland and Hallett 1993). Chez la pastèque, il a été montré que *A. citrulli* pénètre le péricarpe du fruit *via* les stomates jusqu'à deux ou trois semaines après l'anthèse (Frankle et al. 1993). Après cette période, les stomates présents à la surface de la pastèque sont couverts d'une couche cireuse et les bactéries n'arrivent plus à emprunter ces ouvertures naturelles (Frankle et al. 1993). Il est surprenant que la transmission aux graines de la souche P66-R par inoculation en surface du fruit se fasse en l'absence de symptômes sur fruits. En effet, les bactéries transmises par cette voie induisent généralement des symptômes sur les fruits pour progresser jusqu'aux semences comme cela est décrit pour *A. citrulli* ou *P. amygdali* pv. *phaseolicola* (Dutta et al. 2015; Taylor et al. 1979b). Il est intéressant de noter que la souche P99-R, représentative du cluster A et des souches VCZ à spectre d'hôtes étroit, ne s'est pas transmise aux graines par cette voie par contact, alors que ces souches sont prédominantes dans les lots de semences, et qu'une multiplication des voies de contamination des graines pourrait être un avantage.

Les souches du cluster A se transmettent très efficacement des semences contaminées aux plantules de courgette. Il est intéressant de remarquer que ces faibles contaminations dans les graines se transmettent vraisemblablement aux plantules en conditions favorables à la colonisation bactérienne. Pour d'autres pathosystèmes, comme *X. citri* pv. *fuscans* sur haricot, une charge bactérienne d'au moins 100 bactéries par graine est nécessaire pour une transmission aux plantules (Darrasse et al. 2007). Par contre, sur la pastèque, 10 cellules d'*A. citrulli* par graine sont suffisantes pour se transmettre et contaminer la plantule (Dutta et al. 2012). Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent qu'une seule graine faiblement contaminée semée au champ pourrait potentiellement conduire à la création d'un foyer de contamination en conditions favorables. Ces graines portant une charge bactérienne basse (<100 ufc/graine) peuvent être difficilement détectables dans un échantillon de 500 graines.

Les souches du cluster A ont été détectées uniquement dans des lots de semences produits en Vallée du Rhône. La source d'inoculum n'a pas été identifiée, il pourrait s'agir d'une infection non détectée dans les semences ou d'un hôte alternatif contaminé ou infecté mais non identifié dans l'environnement des parcelles. D'une manière générale, des facteurs environnementaux auraient pu avoir été plus favorables à l'établissement des souches en Vallée du Rhône. Dans cette région, les semis de courgettes mâles ont généralement lieu fin avril et ceux des semences femelles mi-mai. En Limagne, les semis sont réalisés une dizaine de jours plus tard car il y fait généralement plus frais. En Vallée du Rhône, en mai 2018 la température moyenne minimale était de 12°C, la température moyenne maximale de 21°C avec 130 mm de précipitations cumulées et respectivement de 11°C et 20°C avec 30 mm de précipitations cumulées en 2019 (Document supplémentaire 2, onglet 2). En Limagne, elles étaient de 10°C-21°C avec 78 mm de précipitation cumulées en mai 2018 et de 9°C à 19°C avec 30 mm de précipitation cumulées en mai 2019. Les différences de température moyenne minimale ou maximales entre ces deux régions sont donc très ténues. La différence de pluviométrie est par contre très nette en 2018 avec un mois de mai très pluvieux en vallée du Rhône.





Cependant, plus que des quantités d'eau, ce seraient sans doute plutôt des nombres d'heures pendant lesquelles l'humidité relative est élevée ou au contraire très basses qui pourraient avoir un impact sur la colonisation, en favorisant la multiplication épiphyte, la guttation ou en limitant la survie épiphyte. Ainsi, l'absence de symptôme de grasse commune associée à des tailles de population de *X. citri* pv. *fuscans* demeurant basses durant la période de culture du haricot ont été associées à un déficit en nombre d'heures quotidiennes avec une humidité relative >80% ou une augmentation importante du nombre d'heures avec une HR <40% par rapport aux normales saisonnières (Darrasse et al. 2007). Pour la souche DC3000 de *P. syringae* pv. *tomato*, une humidité relative élevée (> 95%) juste après une averse augmente la multiplication de la bactérie et donc sa taille de population, ainsi, celle-ci atteint  $10^7$  cfu.cm<sup>-2</sup> en trois jours après une inoculation à  $10^5$  cfu.cm<sup>-2</sup> à une humidité de 95% alors que la population stagne à une humidité comprise en 40 et 60 % (Xin et al. 2016). L'augmentation de la taille de population à 95% d'humidité conduit à une intensité de symptôme importante sur *Arabidopsis* (Xin et al. 2016).

L'analyse d'un disque de cotylédon d'une plantule contaminée est suffisante pour détecter les bactéries VCZ dans 84 % des cas. Ce résultat est intéressant car le prélèvement d'un disque de cotylédon est non destructif de la plantule contrairement à une analyse des semences ou des plantules entières. Ce test mériterait d'être davantage étudié avec d'autres lots de plantules contaminées pour évaluer sa fiabilité. Ce type de méthode a été utilisé pour la détection de virus systémique (Cucumber green mottle mosaic virus, CGMMV) chez le concombre (Moreno et al. 2004).



## Références

- Amrein, H., Makart, S., Granado, J., Shakya, R., Schneider-Pokorny, J., and Dudler, R. 2004. Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301 D-R. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI. 17:90–97.
- Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W., and Mansfield, J. W. 2011. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean' to supermodel. *Mol. Plant Pathol.* 12:617–627.
- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. 2016. Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol. Plant Pathol.* 17:791–795.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., et al. 2014. A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS ONE.* 9(9): e105547.
- Bull, C. T., and Koike, S. T. 2015. Practical Benefits of Knowing the Enemy: Modern Molecular Tools for Diagnosing the Etiology of Bacterial Diseases and Understanding the Taxonomy and Diversity of Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:157–180.
- Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M.-C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S., et al. 2017. Immunity at Cauliflower Hydathodes Controls Systemic Infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Physiol.* 174:700–716.
- Chai, A., Ben, H., Guo, W., Shi, Y., Xie, X., Li, L., et al. 2020. Quantification of Viable Cells of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tomato Seed Using Propidium Monoazide and a Real-Time PCR Assay. *Plant Dis.* :PDIS-11-19-2397-RE.
- Cook, A. A., Walker, J. C., and Larson, R. H. 1952. Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. *Phytopathology.* 42:162.
- Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S., and Jacques, M.-A. 2018. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant Soil.* 422:115–128.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C. E., and Jacques, M.-A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:203–215.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.-A. 2009. Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 22:747–757.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., et al. 2008. The Type III Secretion System of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Is Involved in the Phyllosphere Colonization Process and in Transmission to Seeds of Susceptible Beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2669–2678.
- Deng, X., Xiao, Y., Lan, L., Zhou, J.-M., and Tang, X. 2009. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Mutants Compromised for Type III Secretion System Gene Induction. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 22:964–976.
- Diallo, M. D., Monteil, C. L., Vinatzer, B. A., Clarke, C. R., Glaux, C., Guilbaud, C., et al. 2012. *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *ISME J.* 6:1325–1335.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., and Guttman, D. S. 2019. Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20:3.

- Dupas, E., Briand, M., Jacques, M.-A., and Cesbron, S. 2019a. Novel Tetraplex Quantitative PCR Assays for Simultaneous Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies in Plant Tissues. *Front. Plant Sci.* 10: 1732.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M. G., and Walcott, R. R. 2012a. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology*. 102:461–468.
- Dutta, B., Ha, Y., Avci, U., Sparks, A. C., Johnson, K. L., and Walcott, R. R. 2015. Pathways of bacterial invasion and watermelon seed infection by *Acidovorax citrulli* - Dutta - 2015 - *Plant Pathology* - Wiley Online Library. *Plant Pathol.* 64:537–544.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R. D., and Walcott, R. R. 2012b. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96:705–711.
- Fernández-Sanz, A. M., Rodicio, M. R., and González, A. J. 2016. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolated from weeds in bean crop fields. *Lett. Appl. Microbiol.* 62:344–348.
- Fonseca, N. P., Felestrino, É. B., Caneschi, W. L., Sanchez, A. B., Cordeiro, I. F., Lemes, C. G. C., et al. 2019. Detection and identification of *Xanthomonas* pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. *PeerJ.* 7:e7676.
- Frankle, W. G., Hopkins, D., and Stall, R. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. 10.1094/PD-77-1090.
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Yaron, S., Sessitsch, A., Sauer, U., and Compant, S. 2018. Bacterial niches inside seeds of *Cucumis melo* L. *Plant Soil.* 422:101–113.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. 2017. Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Front. Microbiol.* 8: 2422.
- Inglis, D., and Tymon, L. S. 2019. *Pseudomonas* diseases on cucurbits in Western Washington. Available at: <https://research.libraries.wsu.edu:8443/xmlui/handle/2376/16850> [Accessed December 23, 2019].
- Jiang, N., Lv, Q. Y., Xu, X., Cao, Y. S., Walcott, R. R., Li, J. Q., et al. 2016. Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathol.* 65:826–836.
- Lacault, C., Briand, M., Jacques, M.-A., and Darrasse, A. 2020. Zucchini vein clearing disease is caused by several lineages within *Pseudomonas syringae* species complex. *Phytopathology*. 110(4):744-757
- Lamichhane, J. R., Messéan, A., and Morris, C. E. 2015. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:331–350.
- Leben, C. 1981. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* with cucumber seed. *Can. J. Plant Pathol.* 3:247–249.
- Lindow, S. E., and Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875–1883.
- Manceau, C., Gironde, S., Briand, B., and Lybeert, H. 2011. Moyens et methodes de detection et d'identification d'une nouvelle bacterie responsable d'affections phytosanitaires sur des plantes (courgettes) et nouvelles plantes resistantes. WO2011003984.
- Maude, R. B. 1996. Seedborne diseases and their control.

- Maury, Y., Duby, C., Bossennec, J.-M., and Boudazin, G. 1986. Group analysis using ELISA: determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. *Agronomie*. 5:405–415.
- Meng, X., Chai, A., Chen, L., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., et al. 2016. Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. *Can. J. Plant Pathol.* 38:296–306.
- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., et al. 2017. A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Front. Microbiol.*
- Monteil, C. L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C. E. 2012. Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack: *P. syringae* in snowpack. *Environ. Microbiol.* 14:2099–2112.
- Monteil, C. L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C. E. 2012. Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack: *P. syringae* in snowpack. *Environ. Microbiol.* 14:2099–2112.
- Moreno, I. M., Thompson, J. R., and Garcia-Arenal, F. 2004. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 85:749–759.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R., and Pitrat, M. 2000. The Relationship of Host Range, Physiology, and Genotype to Virulence on Cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from Cantaloupe Blight Epidemics in France. *Phytopathology*. 90:636–646.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., et al. 2010. Inferring the Evolutionary History of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* from Its Biogeography in Headwaters of Rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio*. 1:e00107-10.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., et al. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* 2:321–334.
- Nepi, M., and Pacini, E. 1993. Pollination, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Cucurbita pepo*. *Ann. Bot.* 72:527–536.
- Newberry, E. A., Babu, B., Roberts, P. D., Dufault, N. S., Goss, E. M., Jones, J. B., et al. 2017a. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon and Squash in Florida. *Plant Dis.* 102:511–518.
- Newberry, E. A., Ebrahim, M., Timilsina, S., Zlatković, N., Obradović, A., Bull, C. T., et al. 2019. Inference of Convergent Gene Acquisition Among *Pseudomonas syringae* Strains Isolated From Watermelon, Cantaloupe, and Squash. *Front. Microbiol.* 10:270.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., et al. 2016. Angular Leaf Spot of Cucurbits is Associated With Genetically Diverse *Pseudomonas syringae* Strains. *Plant Dis.* 100:1397–1404.
- Newberry, E. A., Ritchie, L., Babu, B., Sanchez, T., Beckham, K. A., Jones, J. B., et al. 2017b. Epidemiology and management of bacterial leaf spot on watermelon caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 101:1222–1229.
- Ngoc, L. B. T., Vernière, C., Jarne, P., Brisse, S., Guérin, F., Boutry, S., et al. 2009. From Local Surveys to Global Surveillance: Three High-Throughput Genotyping Methods for Epidemiological Monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1173–1184.





- Nikolić, I., Stanković, S., Dimkić, I., Berić, T., Stojšin, V., Janse, J., et al. 2018. Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* isolated from sugar beet. *Plant Pathol.* 67:1194–1207.
- Pattemore, D. E., Goodwin, R. M., McBrydie, H. M., Hoyte, S. M., and Vanneste, J. L. 2014. Evidence of the role of honey bees (*Apis mellifera*) as vectors of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Australas. Plant Pathol.* 43:571–575.
- Prado, A., Marolleau, B., Vaissière, B. E., Barret, M., and Torres-Cortes, G. 2020. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Sci. Rep.* 10:3575.
- Pruvost, O., Magne, M., Boyer, K., Leduc, A., Tourterel, C., Drevet, C., et al. 2014. A MLVA Genotyping Scheme for Global Surveillance of the Citrus Pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* Suggests a Worldwide Geographical Expansion of a Single Genetic Lineage ed. Boris Alexander Vinatzer. *PLoS ONE.* 9:e98129.
- Riffaud, C. M.-H., Glaux, C., Guilbaud, C., Prior, P., Morris, C. E., and Dominguez, H. 2003. Epidemiological Clues for Developing Methods of Control of Bacterial Blight of Cantaloupe Caused by Bacterial Blight of Cantaloupe Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. pp3-15.
- Riffaud, C.-H., and Morris, C. E. 2002. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony-staining. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:539–545.
- Schaad, N., Cheong, S., Tamaki, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N. 1995. A Combined Biological and Enzymatic Amplification (bio-Pcr) Technique to Detect *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola* in Bean Seed Extracts. *Phytopathology.* 85:243–248.
- Shade, A., Jacques, M.-A., and Barret, M. 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 37:15–22.
- Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G., and Meah, M. B. 2013. Detection of *Pseudomonas Syringae* pv. *Lachrymans* Associated with the Seeds of Cucurbits. *Univers. J. Agric. Res.* 1:1–8.
- Sutherland, P. W., and Hallett, I. C. 1993. Anatomy of fruit of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D.) surface, cuticle, and epidermis. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 21:67–72.
- Swaroop, S. 1951. The range of variation of the most probable number of organisms estimated by the dilution method. *Indian J. Med. Res.*
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., and Smart, C. D. 2013. Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6948–6957.
- Taylor, J. D., Dudley, C. L., and Gray), L. P. (née. 1979. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Ann. Appl. Biol.* 93:267–277.
- Tian, Q., Feng, J., Hu, J., and Zhao, W. 2016. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide. *Sci. Rep.* 6:35457.
- Ushio, M., Yamasaki, E., Takasu, H., Nagano, A. J., Fujinaga, S., Honjo, M. N., et al. 2015. Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Sci. Rep.* 5:8695.
- Xin, X.-F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A. C., Yao, J., Boutrot, F., et al. 2016. Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature.* 539:524–529.



## Données complémentaires

Tableau supplémentaire 1. Résultats de l'analyse des échantillons de la prospection testés positifs par le test q-PCR ciblant *sy/C*, tailles moyennes des populations par échantillon foliaire prélevé et code des souches isolées et analysées en MLSA.

Hôte	Date	Région	Parcelle	Tailles des populations log UFC/ échantillon		Code de la souche isolée	Clade
				Moyenne	SEM		
♀ A	2019	Limagne	PL1	3,11	0,10		
♀ A	2019	Limagne	PL1	2,48	0,62	433	2d
♀ A	2019	Limagne	PL1	1,73	0,56		
♂ B	2019	Limagne	PL1	4,82	0,03		
♂ B	2019	Limagne	PL1	3,29	0,08		
♂ B	2019	Limagne	PL1	6,54	0,02	428	2d
♂ B	2019	Limagne	PL1	2,01	0,34		
♂ B	2019	Limagne	PL1	6,13	0,04	430	2b
♂ B	2019	Limagne	PL1	5,36	0,08	436	2d
♂ B	2019	Limagne	PL1	6,78	0,00		
♂ B	2019	Limagne	PL1	5,57	0,00	440	2d
♂ B	2019	Limagne	PL1	3,48	0,03		
♂ B	2019	Limagne	PL1	6,59	0,02	441	2d
♂ B	2019	Limagne	PL1	2,84	0,08	408	2d
♂ B (pollen)	2019	Limagne	PL1	3,40	0,49	438	2d
♂ B (pollen)	2019	Limagne	PL1	5,54	0,09	439	2d
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	2019	Limagne	PL1	3,29	0,05	419	2d
<i>Persicaria maculosa</i>	2019	Limagne	PL1	3,76	0,10	410	2d
<i>Solanum nigrum</i>	2019	Limagne	PL1	2,51	0,10		
<i>Brassica napus</i>	2019	VDR	PL10	1,79	0,14	207	2d
<i>Solanum nigrum</i>	2018	Limagne	PL11	3,26	0,09		
<i>Solanum nigrum</i>	2018	Limagne	PL11	2,58	0,22		
<i>Solanum nigrum</i>	2018	Limagne	PL11	1,70	0,85	523J	2d
♂ F (pollen)	2018	Limagne	PL12	4,44	0,00	598PB	2b
♀ E	2018	VDR	PL13	5,42	0,04		
♀ E	2018	VDR	PL13	1,92	0,28		
♀ E	2018	VDR	PL13	3,17	0,14	65	2d
♂ F	2018	VDR	PL13	3,02	0,24		
♂ F	2018	VDR	PL13	5,01	0,06	17	2d
♂ F	2018	VDR	PL13	3,78	0,04		
♂ F	2018	VDR	PL13	5,13	0,03	53	2d
♂ F	2018	VDR	PL13	2,81	0,49	69	2b
♂ F	2018	VDR	PL13	3,50	0,01	74	2d
♂ F	2018	VDR	PL13	4,11	0,06	34	2b
<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	2018	VDR	PL13	3,63	0,17		
<i>Avena fatua</i>	2018	VDR	PL13	4,36	0,03		
<i>Beta vulgaris</i>	2018	VDR	PL13	6,07	0,01	84	2d
<i>Chenopodium album</i>	2018	VDR	PL13	2,48	0,08		
<i>Convolvulus</i> spp.	2018	VDR	PL13	2,86	0,26		
<i>Cynara</i> spp.	2018	VDR	PL13	2,72	0,44		
<i>Elymus repens</i>	2018	VDR	PL13	3,02	0,00		
<i>Equisetum arvense</i>	2018	VDR	PL13	2,80	0,37		
<i>Helianthus annuus</i>	2018	VDR	PL13	3,51	0,07		
<i>Mercurialis</i> spp.	2018	VDR	PL13	3,79	0,02		
<i>Panicum</i>	2018	VDR	PL13	3,45	0,11		
<i>Persicaria maculosa</i>	2018	VDR	PL13	4,23	0,06	32	2d
<i>Populus</i> (feuille tombée)	2018	VDR	PL13	3,48	0,09		
<i>Quercus</i> spp.	2018	VDR	PL13	3,85	0,01		
<i>Scabiosa</i> spp.	2018	VDR	PL13	3,31	0,02	42	2d
♀ E	2018	VDR	PL14	3,59	0,01		
♀ E	2018	VDR	PL14	4,19	0,02		
♀ E	2018	VDR	PL14	2,22	0,18		
♀ E	2018	VDR	PL14	3,89	0,04		
♂ F	2018	VDR	PL14	5,34	0,02		
♂ F	2018	VDR	PL14	7,75	0,00	142	2d
♂ F	2018	VDR	PL14	4,53	0,02	143	2d

(A suivre ...)

(Suite du tableau supplémentaire 1)

Hôte	Date	Région	Parcelle	Tailles des populations log UFC/ échantillon		Code de la souche isolée	Clade
				Moyenne	SEM		
♂ F	2018	VDR	PL14	4,43	0,00	107	2b
<i>Avena fatua</i>	2018	VDR	PL14	4,15	0,04	196	2d
<i>Brassica napus</i>	2018	VDR	PL14	2,88	0,24	106	2b
<i>Brassica napus</i>	2018	VDR	PL14	2,27	0,56	108	2b
<i>Brassica napus</i>	2018	VDR	PL14	2,21	0,06	110	2b
<i>Chenopodium album</i>	2018	VDR	PL14	4,25	0,08		
<i>Datura stramonium</i>	2018	VDR	PL14	3,58	0,23	122	2b
<i>Helianthus annuus</i>	2018	VDR	PL14	3,65	0,06	133	2d
<i>Portulaca oleracea</i>	2018	VDR	PL14	2,59	0,04		
<i>Robinia pseudoacacia</i>	2018	VDR	PL14	3,17	0,10		
<i>Triticum durum</i>	2018	VDR	PL14	3,94	0,03	170	2d
<i>Triticum durum</i>	2018	VDR	PL14	4,42	0,02		
♂ H	2018	Limagne	PL15	3,43	0,17	475	2d
♂ H (pollen)	2018	Limagne	PL15	9,48	0,01		
<i>Avena fatua</i>	2018	Limagne	PL15	2,25	0,06		
<i>Euphorbia</i> spp.	2018	Limagne	PL15	2,64	0,31	478	2d
<i>Mercurialis</i> spp.	2018	Limagne	PL15	2,26	0,23	484	2d
<i>Setaria</i> spp.	2018	Limagne	PL15	3,69	0,08		
<i>Solanum nigrum</i>	2018	Limagne	PL15	0,14	0,13	485	2d
♀ G	2018	Limagne	PL16	4,01	0,04		
♂ H	2018	Limagne	PL16	2,93	0,12		
♂ H (pollen)	2018	Limagne	PL16	2,93	0,14		
<i>Ammi majus</i>	2018	Limagne	PL16	1,71	0,85		
<i>Chenopodium album</i>	2018	Limagne	PL16	3,05	0,17		
Inconnu	2018	Limagne	PL16	3,08	0,18		
<i>Panicum</i>	2018	Limagne	PL16	3,93	0,02		
<i>Setaria</i> spp.	2018	Limagne	PL16	3,05	0,18		
<i>Urtica</i> spp.	2018	VDR	PL17	3,55	0,09	288 A + 288 C	2d + 2b
P	2018	Anjou	PL18	3,30	0,08		
P	2018	Anjou	PL18	3,57	0,36		
P	2018	Anjou	PL18	2,38	1,19	700A	2d
<i>Convolvulus</i> spp.	2018	VDR	PL19	3,53	0,07		
P	2018	VDR	PL19	3,44	0,10		
P	2018	VDR	PL19	2,27	1,01		
P	2018	VDR	PL19	3,75	0,13		
P	2018	VDR	PL19	1,82	0,34		
P	2018	VDR	PL19	2,50	0,13		
P	2018	VDR	PL19	3,43	0,19		
<i>Triticum durum</i>	2019	VDR	PL2	2,12	0,34		
♀ A	2019	Limagne	PL3	2,23	0,07		
♀ A	2019	Limagne	PL3	2,64	0,25		
♂ B	2019	Limagne	PL3	2,75	0,01		
♂ B	2019	Limagne	PL3	7,37	0,01		
<i>Mercurialis</i> spp.	2019	Limagne	PL3	2,15	0,34		
<i>Triticum aestivum</i>	2019	Limagne	PL3	3,27	0,02		
<i>Solanum nigrum</i>	2019	Limagne	PL8	2,51	0,10	266	2b
semences ♀ E X ♂ F	2018	VDR	PL 14	non-testé*	non-testé*	P05	2ba/A
semences ♀ E X ♂ F	2018	VDR	PL 14	non-testé*	non-testé*	P08	2ba/C
semences ♀ C X ♂ D	2019	VDR	PL 5	non-testé*	non-testé*	Br2019	2ba/A

\*Les souches ont été isolées directement à partir de macérat cultivé sur milieu LBCAL

Tableau supplémentaire 2. Détails des sous-échantillons des lots parentaux et hybrides analysés avec les tests de détection q-PCR *sy/C* ou qPCR multiplex.

Lot	Parcelle	Echantillon de semences	q-PCR <i>sy/C</i> (5 µL)		Identification q-PCR multiplex (1 µL)										
			log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 1)	log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 2)	log copie génome/ech. graines <sup>2</sup> (repet. 1)				log copie génome/ech. graines <sup>2</sup> (repet. 2)						
			<i>sy/C</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d	<i>sy/C</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d					
Variété ♀ A X ♂ B (2019)	♀ A	NA	100	5,86	3,87	NA 2	NA	5,38	NA	NA	NA	2,82	NA		
			100	NA	NA	NT 3	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
	♂ B	NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			500	4,27	3,15	NA	NA	NA	NA	2,66	NA	1,92	NA		
	♀ A X ♂ B Limagne	PL 1	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
100			NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
100			NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
500			4,00	NA	NA	NA	NA	4,33	NA	NA	NA	4,04			
♀ A X ♂ B VDR		PL 2	100	4,52	3,71	4,27	NA	NA	5,83	6,04	NA	NA	5,32		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	4,21	3,43	5,07	NA	NA	5,77	6,18	NA	NA	5,24		
	500		4,38	3,59	NA	NA	NA	5,60	5,92	NA	NA	5,10			
♀ A X ♂ B VDR	PL 3	100	4,79	3,55	NA	NA	NA	4,43	5,25	NA	NA	5,54			
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
		100	NA	3,66	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
		100	NA	3,85	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
		100	4,46	3,02	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			
		100	NA	4,17	NT	NA	2,87	5,18	NT	NA	3,07	5,18			
Variété ♀ C X ♂ D (2019)	♀ C	NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	3,15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			♂ D	NA	100	5,30	NA	NA	NA	2,90	NA	NA	NA	NA	NA
					100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	100	NA			NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	100	NA			NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	100	NA			NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	500	NA			NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	500	NA			NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	♀ C X ♂ D Limagne	PL 4			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
					100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
					100	4,44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			100	6,67	4,53	4,88	NA	6,04	NA	3,08	NA	5,99	NA		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
100			NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
♀ C X ♂ D VDR		PL 5	100	5,44	3,95	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
			100	5,99	3,37	4,28	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
			100	5,78	3,42	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	100		NA	6,00	4,66	4,66	NA	NA	4,72	4,69	NA	NA			
	100		NA	5,83	4,48	3,66	NA	NA	4,72	3,64	NA	NA			
	100		NA	5,63	4,46	3,88	2,18	NA	4,44	3,89	2,18	NA			
	100		NA	6,39	5,88	5,18	3,88	NA	5,66	5,26	3,88	NA			
	500		5,41	4,08	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			
	500		NA	5,10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA			

(A suivre ...)



(Suite du Tableau Supplémentaire 2)

Lot	Parcelle	Echantillon de semences	q-PCR <i>syC</i> (5 µL)		Identification q-PCR multiplex (1 µL)									
			log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 1)	log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 2)	log copie génome/ech. graines2 (repet. 1)				log copie génome/ech. graines2 (repet. 2)					
					<i>syC</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d	<i>syC</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d		
Variété ♀ E X ♂ F (2019)	♀ E	NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	♂ F	NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	500	4,27	3,10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,33	NA	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	♀ E X ♂ F Limagne	PL 6	100	4,00	2,15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		PL 6	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		PL 6	100	5,11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		PL 6	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		PL 6	100	NA	3,11	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		PL 6	100	NA	5,81	NT	NA	NA	6,58	NT	NA	NA	6,78	
		PL 6	100	NA	2,13	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		PL 6	500	3,72	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	♀ E X ♂ F Limagne	PL 7	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		PL 7	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
PL 7		100	NA	2,81	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
PL 7		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
PL 7		500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
♀ E X ♂ F Limagne	PL 8	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	PL 8	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	PL 8	100	NA	2,70	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	PL 8	100	4,72	NA	NA	NA	4,12	NA	NA	NA	NA	NA		
PL 8	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
Variété ♀ G X ♂ H (2019)	♀ G	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
		NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	♂ H	♀ G X ♂ H Limagne	PL 9	100	6,11	3,12	4,92	NA	5,57	NA	5,64	NA	5,57	NA
			PL 9	100	6,27	4,02	5,21	NA	5,73	NA	5,82	NA	5,66	NA
			PL 9	100	6,29	3,84	4,58	NA	5,76	NA	5,99	NA	5,65	NA
			PL 9	100	5,99	NA	4,86	NA	5,53	NA	5,63	NA	5,39	NA
			PL 9	100	6,21	2,81	4,77	NA	5,59	NA	5,82	NA	5,61	NA
			PL 9	100	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			PL 9	100	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			♀ G X ♂ H VDR	PL 10	100	6,19	3,73	5,35	NA	5,80	NA	6,08	NA	5,77
		PL 10		100	6,61	4,22	5,71	NA	5,94	NA	6,16	NA	5,93	NA
		PL 10		100	6,59	4,43	5,56	NA	5,82	NA	5,87	NA	5,85	NA
		PL 10		100	6,44	3,32	5,09	NA	5,79	NA	5,95	NA	5,70	NA
PL 10	100	6,47		3,04	5,57	NA	5,80	NA	5,94	NA	5,75	NA		
PL 10	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			
PL 10	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT			

(A suivre ...)





Lot	Parcelle	Echantillon de semences	q-PCR <i>syC</i> (5 µL)		Identification q-PCR multiplex (1 µL)									
			log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 1)	log copie génome/ech. graines <sup>1</sup> (repet. 2)	log copie génome/ech. graines <sup>2</sup> (repet. 1)				log copie génome/ech. graines <sup>2</sup> (repet. 2)					
					<i>syC</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d	<i>syC</i>	<i>avrRpt2</i>	<i>hopZ5</i>	2d		
Variété ♀ E X ♂ F (2018)	♀ E NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		500	NA	3,54	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	♂ F NA	100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	♀ E X ♂ F Limagne	PL 11	100	2,68	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	♀ E X ♂ F Limagne	PL 12	100	4,77	4,51	3,33	NA	3,05	NA	NA	NA	NA	1,02	NA
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	♀ E X ♂ F VDR	PL 13	500	4,77	4,50	NA	3,69	4,52	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			100	4,37	3,77	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			100	3,67	3,78	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
100			4,52	NA	NA	NA	2,98	NA	NT	NT	NT	NT	NT	
100			4,08	3,62	NA	NA	4,12	NA	NT	NT	NT	NT	NT	
100			4,03	4,20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
♀ E X ♂ F VDR	PL 14	500	NT	8,12	9,24	5,62	6,58	NA	NA	8,60	6,83	NA	NA	
		100	9,11	9,11	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		100	8,43	8,36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		100	8,59	8,40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		100	7,97	7,73	NA	6,60	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	
		100	8,32	8,14	NA	1,54	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	
Variété ♀ G X ♂ H (2018)	♀ G ♂ H NA	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	♀ G X ♂ H Limagne	PL 15	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	♀ G X ♂ H Limagne	PL 16	500	3,60	4,20	NA	NA	3,97	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
♀ G X ♂ H VDR	PL 17	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		500	NA	4,13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
Variété ♀ P x ♂ P 2018	P NA	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		500	4,65	3,58	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
		100	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	♀ P x ♂ P Anjou	PL 18	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			500	4,38	3,56	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	♀ P x ♂ P VDR	PL 19	500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			500	4,48	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	♀ P x ♂ P Limagne	PL 20	500	3,60	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
			500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
500	NA	NA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		

<sup>1</sup> Le nombre de copies du génome par échantillon de 100 ou 500 graines a été calculé sur la base de la quantification lue pour chaque réaction en q-PCR multiplié par le volume total d'ADN extrait et par le volume total de trempage des graines.

<sup>2</sup> NT indique que l'échantillon n'a pas été testé

<sup>3</sup> NA indique qu'aucune amplification n'a été obtenue pour la cible testée

Tableau supplémentaire 3. Résultats des analyses des lots de graines issus des plantes inoculées avec les souches P99-R et P66-R

Souche	Voie de contamination	inoculum ufc/ml	numéro de lot	Echantillonnage <sup>1</sup> (nb sous éch x nb graines)	nombre de sous-échantillon positifs <sup>2</sup>	taux de contamination du lot (%) <sup>3</sup>	Moyennes des tailles de population dans les sous-échantillons positifs (log ufc/éch) (±SEM) <sup>4</sup>		
							50 graines	10 graines	1 graine
P99 R	florale	10 <sup>5</sup>	1 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			2 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			3 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			4 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			5 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
		10 <sup>7</sup>	1 (2019)	(1 x 50) + (2 x 1)	1 + 0	indéterminé*	2,08	na	na
			2 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 1	3 [ $< 0,5$ ; 9] <sup>B</sup>	6,20	1	na
			3 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			4 (2019)	3 x 50	1	5 <sup>A</sup>	6,20	na	na
			1 (2020)	2 x 10	0	< DT	na	na	na
	vasculaire	10 <sup>5</sup>	1 (2018)	2 x 50	1	1,3 <sup>A</sup>	na	na	na
			2 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			3 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			4 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			5 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
	10 <sup>7</sup>	1 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 0	2 [ $< 0,5$ ; 6] <sup>B</sup>	4,09	na	na	
		2 (2019)	2 x 50	0	< DT	na	na	na	
		3 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	0	< DT	na	na	na	
		2 (2020)	(1 x 50) + (5 x 10)	0 + 1	1 [ $< 0,5$ ; 4] <sup>B</sup>	na	1,48	na	
	contact	10 <sup>5</sup>	1 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			1 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			2 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			3 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			4 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
		10 <sup>7</sup>	1 (2020)	2 x 10	0	< DT	na	na	na
2 (2020)			1 x 10	0	< DT	na	na	na	
3 (2020)			(1 x 10) + (10 x 1)	0	< DT	na	na	na	
4 (2020)			3 x 10	0	< DT	na	na	na	
5 (2020)			10 x 1	0	< DT	na	na	na	
P66 R	florale	10 <sup>5</sup>	2 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			3 (2018)	1 x 50	0	< DT	na	na	na
			4 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			5 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			6 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			1 (2019)	1 x 50	1	indéterminé*	1,90	na	na
		10 <sup>7</sup>	2 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 0	2 [ $< 0,5$ ; 6] <sup>B</sup>	2,99	na	na
			3 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 3	9 [2; 21] <sup>B</sup>	2,70	3,28 (± 0,34)	na
			4 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			5 (2019)	2 x 50	0	< DT	na	na	na
	1 (2020)	1 (2020)	1 x 1	0	< DT	na	na	na	
		2 (2020)	20 x 1	4	20 <sup>A</sup>	na	na	1,56 (± 0,24)	
	vasculaire	10 <sup>5</sup>	1 (2018)	3 x 50	2	2,17 <sup>A</sup>	na	na	na
			2 (2018)	3 x 50	1	0,8 <sup>A</sup>	na	na	na
			3 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			4 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
			5 (2018)	3 x 50	0	< DT	na	na	na
		10 <sup>7</sup>	1 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 0	2 [ $< 0,5$ ; 6] <sup>B</sup>	2,62	na	na
			2 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 1	3 [ $< 0,5$ ; 9] <sup>B</sup>	2,20	3	na
			3 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 1	3 [ $< 0,5$ ; 9] <sup>B</sup>	6,32	4,51	na
			4 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10) + (5x1)	1 + 3 + 4	21 [6; 66] <sup>B</sup>	6,47	6,93 (±0,28)	3,79 (±1,27)
			5 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10) + (5x1)	1 + 5 + 4	~100 [100; 39] <sup>B</sup>	7,90	6,46 (±0,46)	3,03 (±0,69)
		1 (2020)	1 (2020)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 3	9 [2; 21] <sup>B</sup>	1,46	1,27 (± 0,34)	na
			2 (2020)	(1 x 50) + (5 x 10)	0	< DT	na	na	na
			3 (2020)	(1 x 50) + (5 x 10)	0	< DT	na	na	na
1 (2019)			(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 0	2 [ $< 0,5$ ; 6] <sup>B</sup>	5,70	na	na	
2 (2019)			(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 1	3 [ $< 0,5$ ; 9] <sup>B</sup>	2,30	2,72	na	
contact	10 <sup>7</sup>	3 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 2	6 [1; 15] <sup>B</sup>	3,00	4,63 (±1,38)	na	
		4 (2019)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 0	2 [ $< 0,5$ ; 6] <sup>B</sup>	1,90	na	na	
		5 (2019)	3 x 50	0	< DT	na	na	na	
		1 (2020)	11 x 1	0	< DT	na	na	na	
	10 <sup>5</sup>	2 (2020)	40 x 1	6	15 <sup>A</sup>	na	na	0,84 (± 0,06)	
		3 (2020)	20 x 1	1	10 <sup>A</sup>	na	na	0,74	
		4 (2020)	10 x 1	0	< DT	na	na	na	
		5 (2020)	(1 x 50) + (5 x 10)	1 + 3	9 [2; 21] <sup>B</sup>	na	6,51	4,32 (± 1,35)	

<sup>1</sup> Nombre de sous-échantillons x nombre de graines par sous-échantillon. Selon les lots de graines (n) des sous-échantillons de 50, 10 ou 1 graine(s) ont été analysés indépendamment.

<sup>2</sup> Nombre de sous-échantillons positifs. Les échantillons 2018 ont été analysés en bioPCR, les échantillons de 2019 par dénombrement et les échantillons 2020 par dénombrement et par q-PCR sur macérat extrait. Les lots de semences issus des fruits inoculés avec de l'eau n'étaient pas positifs.

<sup>3</sup> Le taux de contamination d'un lot est calculé par (A) la formule de Maury pour les sous-échantillons de taille identique ou par (B) les tables de Swaroop pour les échantillons de taille dégressive. <DT sous le seuil de détection.

\* Taux de contamination indéterminé car le sous-échantillonnage effectué n'a pas permis de calculer le taux de contamination

<sup>4</sup> Tailles des populations quantifiées dans les sous-échantillons en log ufc/échantillon. Les cases vertes indiquent que la quantification est faite en q-PCR et les cases oranges indiquent que la quantification est faite par dénombrement des colonies. Le chiffre entre parenthèses indique l'erreur standard de la moyenne dès lors que plusieurs sous-échantillons de 10 graines ou 1 graine ont été testés positifs. Les échantillons de l'année 2018 n'ont pas pu être quantifiés car ils ont été analysés par Bio-PCR. (na) non-applicable.

Tableau supplémentaire 4. Tailles de population quantifiées sur plantule et sur disque de cotylédon

Plante	Taille de population log ufc/plantule	Taille de population log ufc/disque cotylédon
1	4,45	2,72
2	1,88	0,00
3	6,61	4,07
4	4,79	5,90
5	2,35	0,00
6	4,92	2,70
7	3,99	3,79
8	0,00	0,00
9	3,08	2,99
10	4,62	1,88
11	3,76	4,25
12	0,00	0,00
13	4,93	4,71
14	0,00	0,00
15	4,91	3,97
16	7,72	4,56
17	0,00	0,00
18	7,83	6,97
19	6,60	4,75
20	4,05	4,22
21	4,98	0,00
22	0,00	4,12
23	6,09	3,36
24	4,05	3,11
25	6,60	3,91
26	4,28	3,76
27	4,76	4,80
28	4,59	0,00
29	4,59	3,88
30	4,89	3,97

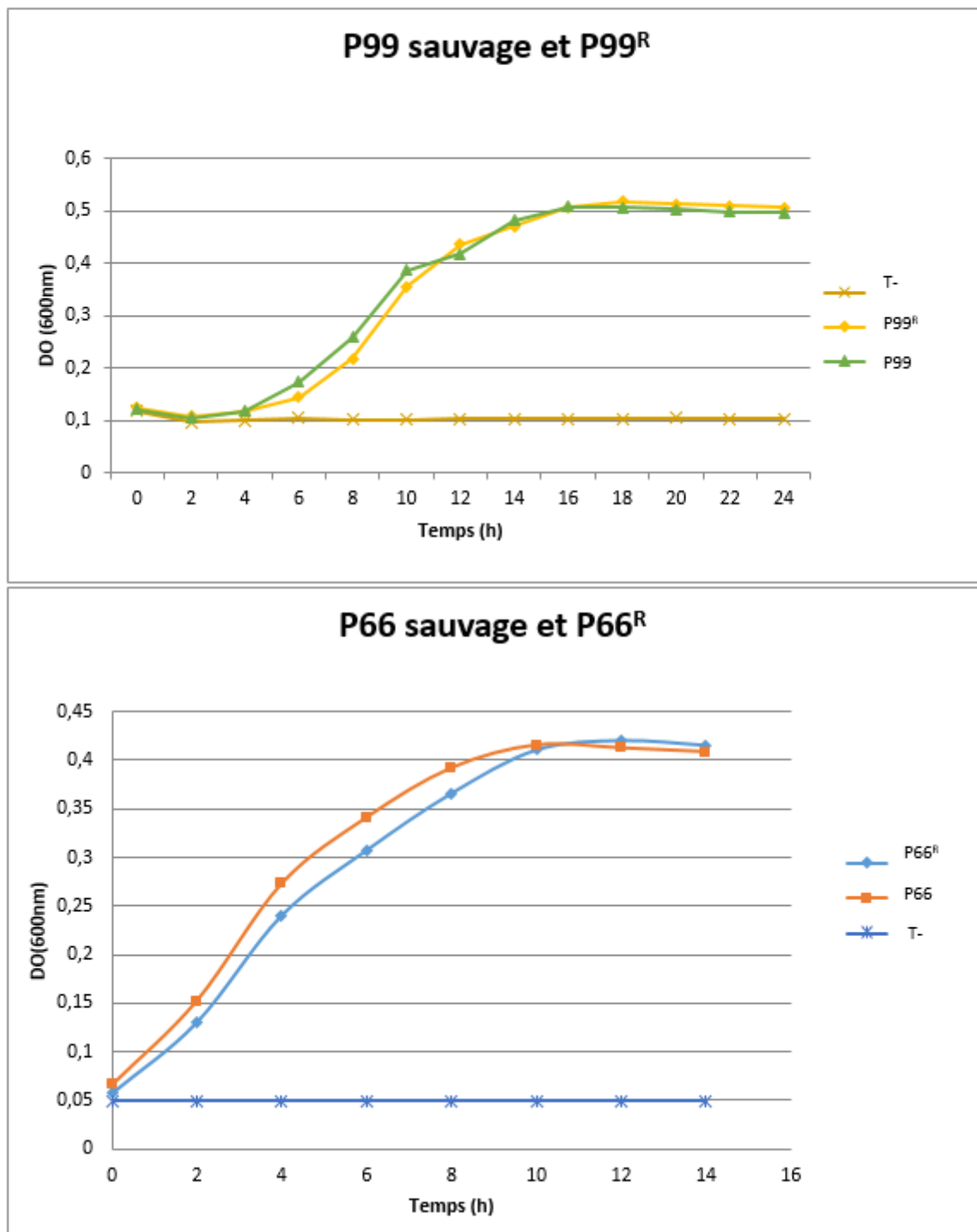


Figure 1. Courbes de croissance des souches parentales et des souches Rif-R en TSB10% à 28°C

## Document supplémentaire 1. Variants P66-R et P99-R

## Méthodes

Pour chaque souche, trois suspensions bactériennes indépendantes étaient titrées à  $10^9$  ufc/mL. Cinq-cents microlitres de chaque suspension ont été étalés sur milieu TSA10%+Rif200mg/L et incubés à 28°C pendant 48 h. Environ dix clones cultivés pour chaque souche sauvage ont été repiqués sur milieu TSA10% +Rif50mg/L. Les courbes de croissance des clones Rif<sup>R</sup> ont été comparées à celles des souches sauvages en mesurant des densités optiques toutes les heures pendant 24 h à 28°C sous agitation (120 rpm) avec un appareil Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finland). Trois puits par souche Rif<sup>R</sup> de bouillon TSB10% + Rif50mg/L ont étéensemencés par une suspension bactérienne fraîche à la concentration finale de  $10^7$  ufc/mL. Pour les souches sauvages (P99 et P66), le bouillon de culture correspond à du bouillon TSB10%. Un témoin négatif (eau distillée stérile) était inclus dans chaque plaque. Les clones rif<sup>R</sup> sont conservés au congélateur -80°C et cultivés en routine sur milieux LBC+AL + Rif50mg/L ou TSA10% + Rif50mg/L.

Le pouvoir pathogène des souches sélectionnées a été testé par inoculation de plantules de *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* cv. Cora âgées de sept jours. Les cotylédons ont été inoculés par frottis avec des suspensions bactériennes calibrées à  $10^7$  ufc/mL (Lacault et al. 2020). Les plantes ont été incubées pendant 14 jours à 25°C jour, 18°C nuit et 14 h de photopériode dans une chambre climatique et les symptômes ont été observés au cours de la culture.

## Résultats

Plusieurs colonies candidates ont poussé sur le milieu sélectif TSA10%+ Rif200mg/L. Pour chaque souche, la croissance de 9 clones candidats a été vérifiée, et celui dont la courbe était la plus semblable à celle du parent a été sélectionné (Figure 1). Les deux clones P66<sup>R</sup> et P99<sup>R</sup> sont pathogènes sur courgette et induisent les symptômes typiques de la nervation blanche sur plantules (nécroses, retards de croissance, blocage de croissance et éclaircissement des nervures).

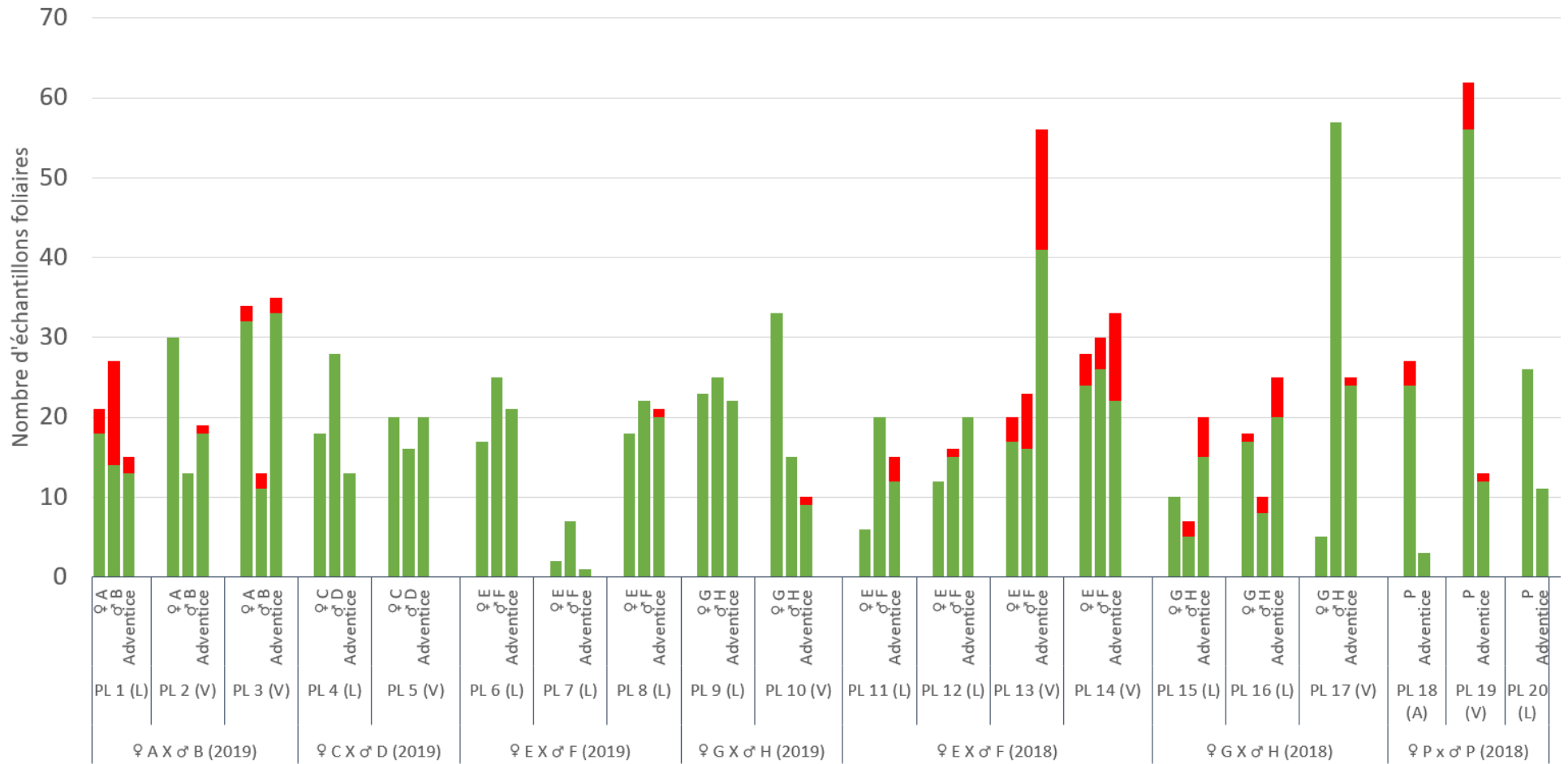


Figure Supplémentaire 1. Contamination des échantillons de courgettes femelles (♀), mâles (♂) et d’advectives récoltés dans les parcelles de courgettes en végétation, par des souches bactériennes portant le gene *sy/C*. La hauteur des barres vertes donne le nombre d’échantillons pour lesquels aucune contamination n’est détectée avec le test q-PCR *sy/C*. La hauteur des barres rouges donne le nombre d’échantillon détecté contaminé par le même test. Le seuil de détection est de 5 ufc/échantillon. Le code des variété est donné par une lettre pour chaque parent. Les parcelles sont numérotées de PL 1 à PL 20, et la région par (L) Limagne (V) Vallée du Rhône et (A) Anjou.



Figure supplémentaire 2. Symptôme observé sur courgette quelques jours après inoculation de la voie par contact par la souche





# Discussion générale



La nervation blanche de la courgette est une maladie observée dans les pépinières de plants de courgette depuis le début des années 2000. Cette maladie est transmise par la semence et l'agent phytopathogène responsable a été identifié comme une bactérie appartenant au complexe d'espèces *P. syringae* (Manceau et al. 2011). L'impact de cette maladie, estimé par le nombre de lots de semences produits au niveau mondial détectés contaminés à réception, était en augmentation au milieu des années 2010 par rapport à la période précédente. Historiquement, les symptômes de cette maladie avaient été observés en pépinière sur des lots de plants montrant des retards de croissance, symptômes qui s'avéraient accentués par des températures fraîches et une humidité élevée en début d'élevage des plants. Au cours des premières épidémies, une dizaine de souches a pu être isolée et caractérisée sur la base de tests biochimiques (LOPAT et profils nutritionnels), d'analyses moléculaires (ADN<sub>r</sub> 16S, gènes *gyrB* et *rpoD*) et de tests de pouvoir phytopathogène. Il a été mis en évidence que huit souches responsables de la nervation blanche partageaient un phénotype et un génotype homogènes (Manceau et al. 2011). Ces résultats indiquaient qu'un seul groupe de souches était impliqué dans la nervation blanche de la courgette. Ce groupe de souches était clairement distinct d'autres pathovars proches phytopathogènes des Cucurbitacées dont *P. syringae* pv. *aptata* et *P. syringae* pv. *lachrymans* qui ne provoquaient pas la même maladie sur la courgette (Manceau et al. 2011). A la suite de ce travail, de nombreuses souches ont été isolées à partir de lots de semences contaminés et de plantules de courgette malades. La détection est effectuée par Bio-qPCR sur les macérats de sous-échantillons de 500 graines pour un total de 2000 graines par lot. Ainsi, une collection de 58 souches aux origines variées a été établie. Contrairement aux souches isolées dans les premiers épisodes épidémiques, différents types morphologiques ont été observés sur milieux de culture de routine. Cette diversité morphologique observée supposait l'existence de plusieurs groupes de bactéries potentiellement responsables de la nervation blanche.

La collection de 58 souches a été analysée en MLSA sur quatre gènes de ménage et deux groupes majoritaires ont été identifiés, l'un dans le clade 2ba et l'autre dans le clade 2a du phylogroupe 2 du complexe d'espèces *P. syringae* (Lacault et al. 2020). Au sein de ces deux clades, des souches responsables d'autres maladies sur Cucurbitacées (courges, melons et pastèques) aux USA étaient regroupées avec les souches de notre collection (Lacault et al. 2020; Newberry et al. 2016a, 2019). Afin de savoir si les souches appartenant à chacun des deux clades (2a et 2ba) étaient responsables d'une même maladie ou si elles engendraient des symptômes différents sur courgette, nous avons conduit trois tests de pouvoir pathogène sur deux génotypes de courgette. L'un des tests consistait à inoculer les cotylédons des plantules par un frottis, méthodes classiquement utilisées pour de nombreux pathosystèmes (Bibi et al. 2018; Burdman et al. 2005). Les deux autres tests consistaient en des inoculations de semences par trempage dans des inoculums de différentes concentrations avant semis. Ce type de test, non invasif, est adapté pour étudier le pouvoir pathogène des bactéries transmises par les semences et a déjà été appliqué à d'autres pathosystèmes comme *A. citrulli* sur pastèque (Bahar et al. 2009b). Les souches des clades 2a et 2ba étaient toutes responsables de mêmes symptômes de la nervation blanche et non-différenciables sur la base des trois tests effectués sur les deux génotypes de courgette. Ces souches sont donc qualifiées de « souches VCZ », responsables de « vein clearing on zucchini ». Ce résultat a mis en évidence une situation plus complexe que la situation initiale, puisqu'il s'avère que la nervation blanche de la courgette, n'est pas causée par un seul groupe de souches mais par différentes lignées génétiques du complexe d'espèces *P. syringae*.



Cette situation a déjà été rencontrée pour d'autres maladies, comme la graisse commune du haricot causée par quatre lignées génétiques de *X. citri* pv. *fuscans* et *X. phaseoli* pv. *phaseoli*. (Alavi et al. 2008; Chen et al. 2018). Différentes lignées génétiques de *P. syringae* pv. *syringae* et *P. syringae* pv. *lisi* causent les mêmes types de symptômes sur pois en plein champ mais ne partagent pas la même gamme d'hôtes (Martín-Sanz et al. 2012). Le séquençage de génomes complets et l'évaluation des gammes d'hôtes des souches VCZ des deux clades a permis de caractériser plus finement ces souches selon leur gamme d'hôtes et leurs profils d'ET3. Le cluster A du clade 2ba contient des souches VCZ à gamme d'hôtes étroite (pathogènes de *Cucurbita* ssp. uniquement) qui possèdent un répertoire homogène de 18 ET3. Les souches VCZ des clusters B (clade 2ba), D et E (clade 2a) ont une gamme d'hôtes large (pathogènes de *Cucurbita* spp., *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* et parfois *Citrullus lanatus*) et possèdent différents répertoires d'ET3 contenant entre 13 et 16 ET3. Toutes les souches VCZ possèdent neuf ET3 communs (*avrE1*, *hopAE1*, *hopAZ1*, *hopAG1*, *hopAH1*, *hopAB1*, *hopI1*, *hopA1* et *hopAA1*) qui pourraient potentiellement être impliqués dans la convergence pathologique sur la courgette. Ces effecteurs sont conservés dans les souches du phylogroupe 2, sauf pour l'effecteur *hopA1* présent dans les souches du clade 2a et uniquement dans les souches isolées de Cucurbitacées du clade 2ba (Newberry et al. 2019). Il serait intéressant de connaître l'implication de cet effecteur partagé par les souches VCZ dans la spécificité d'hôte sur courgette.

Le cluster A contient toutes les souches VCZ à l'origine des premières épidémies de nervation blanche. La plupart des souches isolées à partir de lots de semences de la collection appartient également à ce cluster. Nos résultats montrent aussi que les souches du cluster A représentent un clone épidémique isolé à partir de lots de semences produits à une large échelle géographique entre 2000 et 2019. Les souches VCZ du cluster A ont la particularité d'avoir une gamme d'hôtes réduite parmi les cucurbitacées contrairement aux souches VCZ des autres clusters. Ce résultat indique que les souches VCZ ne représentent pas le même risque épidémiologique dans les aires de production de Cucurbitacées et que qu'il serait nécessaire de pouvoir les différencier des souches VCZ à gamme d'hôtes large. En effet, une épidémie de nervation blanche de la courgette causée par des souches VCZ à gamme d'hôtes large pourrait être potentiellement assez grave chez un pépiniériste produisant des plants de courges, de melons, de concombres et de pastèques à proximité les uns des autres. La désignation des pathovars aide à la communication entre les phytopathologistes et les acteurs du monde agricole et elle est essentielle pour la réglementation et le contrôle des agents phytopathogènes (Bull et al. 2008; Bull and Koike 2015). Décrire un nouveau pathovar, correspondant aux souches du cluster A et un ou des autres pour les souches des cluster B à E, pourrait aider à la communication entre les phytopathologistes, les semenciers et les acteurs du monde agricole cultivant les courgettes et autres Cucurbitacées. Le pathovar *P. syringae* pv. *peponis* avait d'ailleurs été suggéré, mais pas formellement proposé, pour désigner les souches responsables des premières épidémies, donc correspondant au cluster A (Manceau et al. 2011). La description du pathovar *peponis* n'a pas été proposée dans Lacault et al. (2020) car les éléments avancés n'étaient pas suffisants pour faire une proposition au comité de taxonomie des bactéries phytopathogènes de la société internationale de pathologie des plantes (ISPP). La raison la plus évidente est que la pathogénie des souches VCZ du cluster A n'avait pas été comparée à celle de la souche type de l'espèce *P. syringae* (CFBP 1392) et aux souches pathotypes proches. Ces comparaisons sont essentielles afin de montrer que les souches du cluster A se différencient au niveau infra-subspécifique des autres souches de la même espèce ou sous-espèce sur la base d'une pathogénie distinctive sur un ou plusieurs hôtes végétaux (International Society for Plant Pathology, consulté le 27/01/2021, Dye et al. 1980).



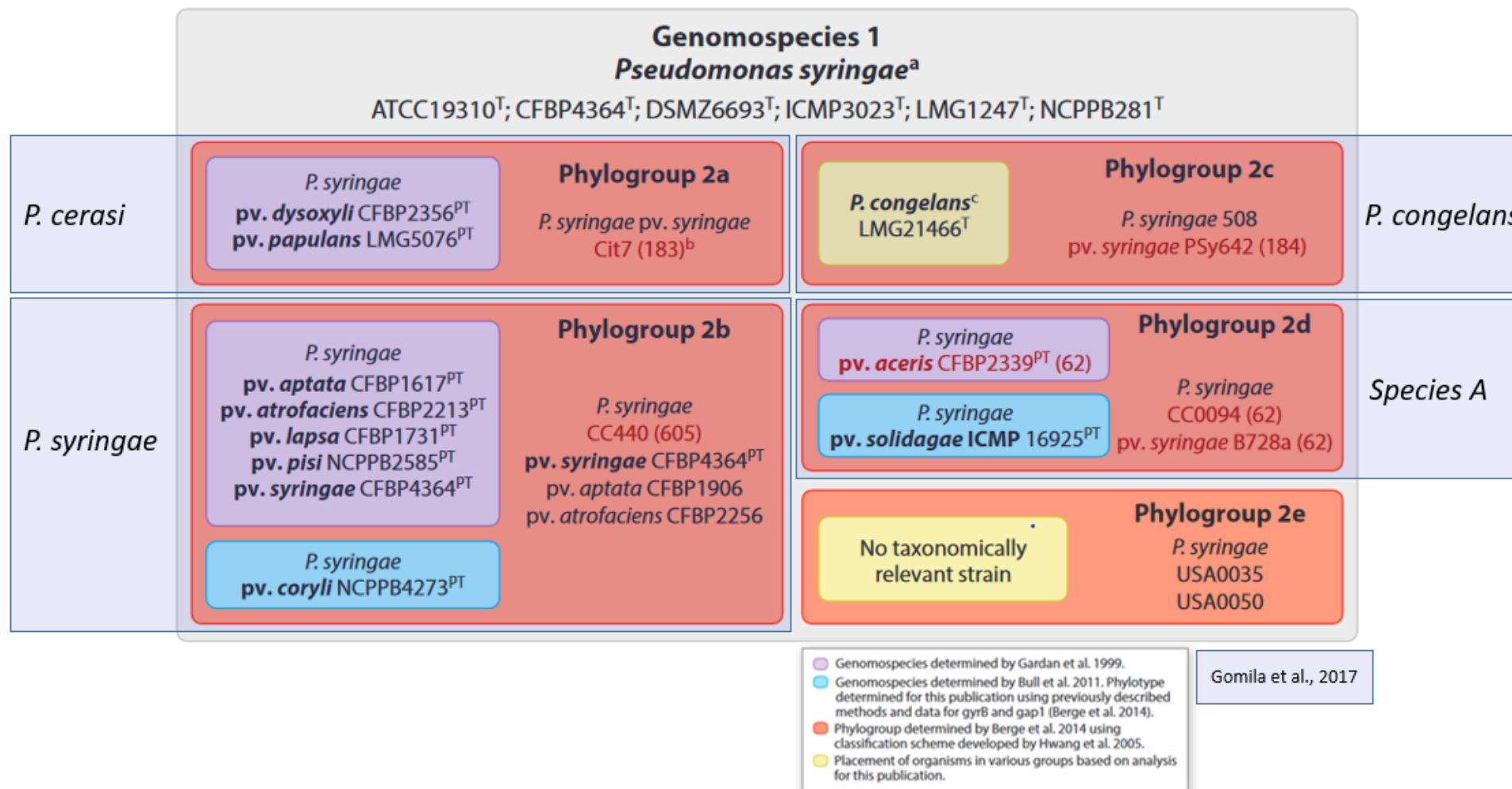


Figure 1. Les espèces et pathovars de la Genomospecies 1 du complexe d'espèce *P. syringae*, formant l'espèce *P. syringae* selon Bull et Koike, 2015. Cette genomospecies comprend 5 clades (Berge et al., 2014), dont certains pourraient être élevés au rang d'espèce selon la proposition faite par Gomila et al., 2017 (fond bleuté). Selon ces auteurs, l'espèce *P. syringae* correspond au seul phylogroupe 2b.

L'espèce *P. syringae* a subi de nombreux remaniements taxonomiques. Bull et Koike (2015) indiquent que cette espèce correspond à la Genomospecies 1 de Gardan et al. (1999) et comprend les phylogroupes 2a, 2b, 2c, 2d et 2e (Berge et al. 2014). Gomila et al. (2017) proposent d'élever au rang d'espèces certains de ces phylogroupes aboutissant à une définition de l'espèce *P. syringae* encore plus réduite, correspondant uniquement au phylogroupe 2b (Figure 1). Avec ce contour, l'espèce *P. syringae* comprendrait les pathovars *aptata*, *atrofaciens*, *lapsa*, *pisi*, *syringae* et *coryli*. Gomila et al. (2017) listent également dans cette espèce des souches préalablement mal identifiées et qui avaient été placées dans les pathovars *avellanae*, *japonica* et *panici* (Bull et al. 2010). Ainsi, il nous faudrait tester la pathogénie des souches pathotypes suivantes CFBP 1617 (*P. syringae* pv. *aptata*), CFBP 2213 (*P. syringae* pv. *atrofaciens*), CFBP 1731 (*P. syringae* pv. *lapsa*), NCPPB2585 (*P. syringae* pv. *pisi*), CFBP4364 (*P. syringae* pv. *syringae*) et CFBP 7149 (*P. syringae* pv. *coryli*) (Bull and Koike 2015) en parallèle de quelques souches du cluster A sur des génotypes de Cucurbitacées utilisés dans Lacault et al. (2020) et sur l'ensemble des hôtes d'isolement des souches pour clairement montrer la spécificité du pathovar *peponis*.

Les souches VCZ des clusters B, D et E ont une gamme d'hôtes large sur cucurbitacées. Nous avons également identifié récemment des souches VCZ appartenant au cluster C. Il faudrait vérifier si ces souches qui possèdent l'effecteur *hopZ5* comme les autres souches à gamme d'hôtes large, possèdent elles aussi, une gamme d'hôte étendue. Les travaux de Newberry et al. (2019) sur une souche du cluster C laissent penser que ce pourrait être le cas car une souche de ce cluster est pathogène sur courges et pastèque. Ces souches à large gamme de cucurbitacées hôtes sont distribuées dans deux espèces (*P. cerasi* et *P. syringae*). Pour éventuellement décrire de nouveaux pathovars pour ces clusters, il faudra donc tester la pathogénie de ces souches au regard de celui de la souche type de *P. cerasi* sur la gamme de génotypes de Cucurbitaceae et leurs hôtes d'isolement respectifs. Appartenant à différentes espèces, même si leur pathogénie est identique, il sera préférable de donner des noms différents à ces lignées, selon la règle N°8 des standards internationaux de nomenclature des pathovars de bactéries phytopathogènes consultable sur le site de l'ISPB (Young et al. 2001, [https://www.isppweb.org/about\\_tppb\\_naming.asp](https://www.isppweb.org/about_tppb_naming.asp), consulté le 09/03/2021). Ainsi, il n'est pas improbable que les agents de la nervation blanche de la courgette se trouvent assignés à différentes lignées phylogénétiques éloignées et séparées par des souches ayant d'autres spécificités pathologiques et plus largement écologiques. N'ayant pas leur dernier ancêtre en commun, on aurait donc affaire à un pathovar polyphylétique. D'un point de vue évolutif et pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'adaptation à l'hôte, il sera intéressant de rechercher des traces de la convergence pathologique au sein des séquences génomiques des souches de ces différentes lignées, comme cela a été fait pour les agents de la graisse commune du haricot (Chen et al. 2018; Hajri et al. 2009; Mhedbi-Hajri et al. 2013). Il est intéressant de noter que plusieurs pathovars polyphylétiques sont décrits dans le complexe d'espèces *P. syringae* comme *P. syringae* pv. *maculicola* distribué dans cinq lignées génétiques et *P. syringae* pv. *tomato* distribué en trois lignées génétiques (Gironde and Manceau 2012).

Le suivi épidémiologique réalisé dans les parcelles de courgette en végétation montre que des souches des clades 2b et 2d contaminent fréquemment les plantes adultes de courgette dans les champs. Ces bactéries sont phylogénétiquement diverses et pathogènes des courgettes. Toutefois, ces souches sont moins agressives que les souches VCZ sur les plantules de courgette et elles n'induisent pas tous les symptômes typiques de la nervation blanche de la courgette, dont le blocage complet de croissance entraînant des déformations de plants.



Sur les feuilles, elles n'occasionnent pas non plus les mêmes symptômes que les souches VCZ (annexe I). Aux USA, plusieurs souches des clades 2b et 2d ont été également isolées de pastèque et de melon cultivés en plein champ (Newberry et al. 2016a). Globalement, les souches du clade 2b sont peu agressives sur Cucurbitacées (pastèque, courges et melon) et les souches du clade 2d sont faiblement à moyennement agressives sur Cucurbitacées (Newberry et al. 2016a). Toutefois, ces souches phytopathogènes des Cucurbitacées mériteraient une attention particulière car elles sont phylogénétiquement proches du pathovar *aptata*, un pathovar polyphylétique décrit dans les clades 2b et 2d et responsable d'épidémies sur melon et betterave (Lamichhane et al. 2015; Newberry et al. 2016a; Morris et al. 2000). Il serait nécessaire de caractériser la pathogénie des représentants des clades 2b et 2d isolées de courgette pour savoir si certaines appartiennent au pathovar *aptata* et le cas échéant si elles pourraient représenter un risque pour les melons et betteraves.

D'un point de vue épidémiologique, les souches appartenant aux clades 2b et 2d sont rarement détectées dans les lots de semences de courgette. De plus, à ce jour, ces souches n'ont pas été isolées à partir d'épidémies de nervation blanche dans les pépinières de production de plants contrairement aux souches VCZ des clusters A à E. En l'état actuel des connaissances, les diverses souches des clades 2b et 2d devraient être considérées différemment des souches VCZ qui sont des clones épidémiques bien caractérisés et clairement responsables de la nervation blanche. Les souches des clades 2b et 2d étant par ailleurs très diverses, il faudrait rechercher si certains génotypes sont retrouvés plus fréquemment dans les lots de graines pour les caractériser et/ou tester leur impact en pépinière. Les souches P108 (clade 2b), P129 et P135 (clade 2d) isolées de lots de semences de courgette ont des répertoires d'ET3 plus petits que ceux des souches VCZ. Trois ET3 présents dans toutes les souches VCZ et absents des souches P108, P129 et P135 ont été identifiés (annexe II). Ces trois souches ne possèdent pas *hopA1* et les deux souches du clade 2d (P129 et P135) ne possèdent pas *hopAZ1* ni *hopAB1*. Il est possible que ces trois T3E soient impliqués dans l'agressivité accrue des souches VCZ sur la courgette, notamment dans leur capacité à induire le blocage de croissance. Pour *Pseudomonas cichorii* il a été montré que l'effecteur *hopA1* est directement impliqué dans la spécificité d'hôte des souches (Hung et al. 2014). Les mutants ( $\Delta hopA1$ ) ne sont pas capables d'infecter le concombre, la tomate, le chou, le soja et le piment et leur mobilité ainsi que la capacité à former des biofilms est réduite (Hung et al. 2014). Dans notre étude, la souche P108 (clade 2b) et la souche P135 (clade 2d) ont une gamme d'hôtes étendue et sont plus ou moins agressives sur courges, concombre, melons et pastèque. Il pourrait être intéressant de construire des mutants  $\Delta hopA1$ ,  $\Delta hopAZ1$  et  $\Delta hopAB1$  à partir des souches VCZ et/ou d'introduire ces trois ET3 dans les souches du clade 2d afin d'identifier leur rôle dans l'agressivité des souches sur la courgette.

Le nom donné à la maladie est nervation blanche de la courgette en raison de la particularité de ce symptôme. En effet, l'éclaircissement des nervures est un symptôme peu courant pour les maladies bactériennes et il est davantage rencontré pour les maladies virales ou fongiques (Gil-Salas et al. 2011; Fradin and Thomma 2006; Mansour and Al-Musa 1993; Radwan et al. 2007; Reusche et al. 2012). Toutefois, *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de canne à sucre, induit des stries blanches parallèles aux nervures (Champoiseau 2006) ce qui est assez similaire à la nervation blanche. Ce symptôme est dû à la production d'une toxine de type NRPS, l'albicidine, qui bloque la différenciation des chloroplastes par inhibition de l'ADN gyrase (Pieretti et al. 2015).



Les souches VCZ sont toutes capables de produire trois toxines (la syringoline, la syringomycine et la mangotoxine) (Annexe III), dont le rôle a été largement détaillé. La syringoline interfère avec la voie de signalisation de l'acide salicylique bloquant les réactions de défense de la plante au niveau des stomates et de l'apoplasme (Misas-Villamil et al. 2013). La syringomycine agit comme un biosurfactant, augmentant l'humidité de surface et facilitant la mobilité épiphyte de *P. syringae*. Elle entraîne la formation de pores dans les membranes induisant une fuite d'électrolyte du cytoplasme cellulaire et la lyse cellulaire, ce qui engendre un milieu favorable à la multiplication de *P. syringae*. Finalement, cette toxine est impliquée dans la formation des spots nécrotiques (Hutchison et al. 1995). La mangotoxine a une activité antimicrobienne en inhibant la biosynthèse de l'arginine/ornithine (Arrebola et al. 2003). Ces activités n'expliquent pas le symptôme de nervation blanche. Chez la courgette, la nervation blanche causée par les souches VCZ est difficile à observer car elle est fugace. Pour cette raison, le nom donné à cette maladie n'est peut-être pas le plus adapté. Le symptôme de blocage de la croissance est plus représentatif de la maladie causée par les souches VCZ sur courgette. De plus, c'est ce symptôme qui est directement préjudiciable puisque les plantes bloquées en croissance sont perdues ou ont un développement très retardé. Ce blocage de la croissance s'accompagne souvent d'un développement anormal des plantules avec déformation des cotylédons, épaissement de la tige et parfois atrophie de la première feuille. D'autres bactéries induisent des blocages de croissance des plantes comme *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* responsable du blocage de croissance de la canne à sucre (Davis et al. 1984; Cia et al. 2018). Il a été montré que les gènes de la plante impliqués dans la division cellulaire (dont *CycA* et *CycB*) étaient sous-exprimés dans les tissus colonisés par la bactérie (Cia et al. 2018).

Les analyses de génomique comparative couplées aux analyses de gamme d'hôtes sur les Cucurbitacées ont permis de développer de nouveaux outils pour la détection et l'identification de souches et/ou d'échantillons de Cucurbitacées. Ces outils moléculaires ont pu être mis au point notamment grâce à l'utilisation d'outils de bio-informatique performants développés dans l'équipe d'accueil, qui permettent d'identifier les séquences spécifiques d'un groupe de souches (Briand et al. 2016, 2019). La q-PCR multiplex proposée est adaptée pour la détection et l'identification de souches VCZ à gamme d'hôte étroite ou large dans des lots de semences de courgette. Les différents outils PCR sont quant à eux adaptés pour une identification fine de groupes phylogénétiques hébergeant des souches VCZ. Ils permettent notamment d'identifier le cluster d'appartenance des souches à gamme d'hôte large. L'utilisation de ces différents outils de détection et d'identification pourrait permettre à l'avenir de mieux suivre les épidémies de nervation blanche et des souches pathogènes de Cucurbitacées. Jusqu'ici, aucun outil de détection n'était disponible spécifiquement pour détecter et identifier ce type de souches. Seuls des sets de tests PCR pour une identification des phylogroupes du complexe d'espèces *P. syringae* étaient disponibles (Borschinger et al. 2016). Le seuil limite de détection de la qPCR multiplex est compris entre  $10^4$  et  $10^3$  bactéries.mL<sup>-1</sup> à partir d'échantillons de graines, ce qui est déjà plutôt bas. Ces seuils limites de détection sont similaires à ceux des tests qPCR de détection de *X. fastidiosa*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *P. syringae* pv. *tomato* et *Xanthomonas* spp. *in planta* (Dupas et al. 2019a; Peňázová et al. 2020). Toutefois, ce seuil de détection pourrait potentiellement être amélioré, ce qui pourrait être utile pour la détection de semences faiblement contaminées. Certaines méthodes permettent un gain de sensibilité sans concentrer les inhibiteurs comme la digitale droplet PCR (ddPCR).





Récemment, une ddPCR très sensible a été mise au point à partir d'une qPCR déjà existante et a permis un gain de détection pour la bactérie *X. fastidiosa* dans des macérât de plantes de *Quercus ilex* et *Polygala myrtifolia* (Dupas et al. 2019b). Pour *A. citrulli*, la ddPCR est 10 fois plus sensible que la qPCR précédemment développée (Lu et al. 2020).

Lors de l'enquête épidémiologique, les souches du cluster A n'ont pas été détectées dans les semences parentales ni dans l'environnement parcellaire de production des courgettes porte-graines. Toutefois, les souches du Cluster A contaminaient certains lots de semences produits. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence de détection des sources d'inoculum des souches du cluster A. La charge bactérienne ou le taux de contamination des lots pouvaient être inférieurs à nos seuils de détection. L'échantillon analysé contenait généralement entre 1500 et 2000 graines, ce qui est similaire aux tests sanitaires effectués en routine concernant un total de 2000 graines en quatre sous-échantillons de 500 graines. Toutefois, pour d'autres maladies comme la graisse à halo sur haricot causée par *P. amygdali* pv. *phaseolicola*, il est recommandé d'analyser au minimum 5000 graines (protocole 7-023, ISTA, 2021). L'analyse de 5000 graines est également recommandée pour la détection de *P. syringae* pv. *pisi* sur semences de pois (protocole ISHI, 2020). De plus, l'effectif analysé pour les courgettes peut sembler faible au regard de la taille d'un lot de semences parentales et des effectifs semés. En effet, pour un hectare de courgette portes-graines en plein champ, environ 16 000 semences mâles et 40 000 semences femelles sont semées. Dans cette étude, les lots de semences parentaux ont été répartis dans deux à quatre parcelles dont la surface était comprise entre 2ha et 6ha. Ainsi, si nous considérons que trois parcelles de 4 ha ont été semées, cela représente 192 000 semences du lot mâle et 480 000 semences du lot femelle et donc environ 1,04 % du lot mâle a été analysé et 0,41 % du lot femelle (en analysant 2000 graines). Compte tenu de cette estimation, augmenter la taille des échantillons analysés aurait été souhaitable. Enfin, pour les analyses en bioPCR, méthode utilisée en routine, il n'est pas exclu que des bactéries puissent être dans un état VNC suite à des traitements des semences. Cela a déjà été montré pour *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* dans des semences de tomate traitées avec des solutions de cuivre ou d'acide chlorhydrique (Jiang et al. 2016). Ainsi, il pourrait être utile de travailler sur de nouveaux protocoles pour optimiser la détection des souches VCZ dans des lots de semences de courgette. Il sera également possible à l'avenir d'analyser des fragments de cotylédons pour estimer de manière non destructive l'état des plants, ce qui pourra permettre de compléter les analyses de semences, tout en observant le développement des plants en parcelles de production ou en pépinière.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer pourquoi les bactéries du cluster A n'ont pas été détectées dans les parcelles en végétation alors qu'elles l'ont été dans les lots de semences produits. (i) La période d'échantillonnage n'était pas idéale pour détecter les bactéries du cluster A et c'est pourquoi aucune plante présentant les symptômes typiques de la nervation blanche n'a été observée. Il était peut-être déjà trop tard pour identifier les plantules malades d'autant plus que l'expression de la nervation blanche est un symptôme fugace. Il aurait été intéressant d'échantillonner à d'autres stades, dont un stade très précoce, quelques jours après semis (entre 7 et 15 jours). En 2020, nous avons programmé un échantillonnage dans les tunnels de production des lots parentaux (pré-bases) chez des pépiniéristes avant transplantation de la culture sous abri. Les semis étant effectués très précocement pour assurer la saison, nous aurions peut-être pu, à cette époque de l'année lorsque les températures extérieures nocturnes et matinales sont fraîches, observer des plantules malades.



Malheureusement, la crise sanitaire (CoViD-19) n'a pas permis d'effectuer ces prélèvements. (ii) L'échantillonnage effectué dans les parcelles n'était peut-être pas de taille suffisante pour détecter les plantes contaminées. Dans chaque parcelle, une cinquantaine d'échantillons de courgette mâle et femelle ont été prélevés. Ces effectifs paraissent assez faibles compte tenu des 16 000 pieds mâles et 40 000 pieds femelles semés à l'hectare. (iii) les bactéries du cluster A pourraient être présentes de façon asymptomatique (commensales) sur les plantes adultes. Ainsi, leur taille de population serait réduite et elles n'induieraient pas de maladie et il serait alors très difficile de repérer les plantes contaminées. Ce type de colonisation asymptomatique au champ a déjà été montré sur le haricot par la bactérie *X. citri* pv. *fuscans* (Darrasse et al. 2007). Cette colonisation asymptomatique résulte du semis de graines faiblement contaminées (entre  $1 \times 10^2$  et  $1 \times 10^4$  ufc.graine<sup>-1</sup>) et de conditions climatiques défavorables avec une humidité relative basse durant la totalité de la période de production (Darrasse et al. 2007)

La nervation blanche de la courgette est observée en conditions fraîches de culture, notamment lors d'un semis précoce dans la saison. La courgette est une espèce qui se plaît sous les climats plutôt chauds avec des températures comprises entre 18 et 27°C (Salehi et al. 2019). Lors du semis, une température supérieure à 16°C est requise pour la germination (Salehi et al. 2019). Lors d'un semis précoce, des températures plus basses et des écarts importants entre le jour et la nuit, pourraient potentiellement être une source de stress pour la courgette. Il serait intéressant de quantifier les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) de la plantule de courgette lors d'un semis en conditions fraîches. Les ROS sont produits en conditions de stress et une surproduction de ces composés oxydatifs endommage les compartiments cellulaires de la plante (Jajic et al. 2015). Chez le concombre, la production de ROS (tels que l'anion superoxide et le peroxide d'hydrogène) est induite dans les 24h après un stress de température (14°C) appliqué sur le système racinaire (Zhang et al. 2012). En conditions de stress lié à la température, il serait possible que la plantule, déjà fragile, soit moins capable de se défendre contre les agents phytopathogènes. Chez le blé, les jeunes plantes sont beaucoup plus sensibles à la rouille jaune que les plantes plus âgées. Ainsi, pour une même dose inoculée, l'incidence de la maladie est de 50 % sur des plantes âgées de trois semaines et de 13 % pour des plantes âgées de cinq semaines (Farber et Mundt 2016). Chez la tomate, une inoculation des jeunes plantes avec *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (au stade 17 - 18 feuilles) induit des flétrissements et la mort de la plante alors qu'une inoculation plus tardive l'incidence de la maladie est moins importante et n'induit pas la mort des plantes (Sharabani et al. 2013).

En parallèle, les conditions fraîches pourraient être favorables à l'agressivité des bactéries VCZ. En effet, les toxines et les ET3 sont des facteurs de virulence importants chez les bactéries et leur expression est dépendante de la température. Alors qu'une température de 28°C est généralement favorable à la multiplication des bactéries du complexe d'espèces *P. syringae*, une température plus fraîche est favorable pour la production de toxines et d'ET3 (Xin et al. 2018). La température idéale pour la production de toxine comme la phaseolotoxine et la coronatine est de 18°C (Arrebola et al. 2011; Nüske and Fritsche 1989; Weingart et al. 2004). Les ET3 HrmA et AvrPto sont également davantage produits par *P. syringae* pv. *syringae* à une température comprise entre 18°C et 22°C (van Dijk et al. 1999). Les souches VCZ produisent trois toxines (la mangotoxine, la syringoline A et la syringomycine). La syringoline A est produite par deux modules de peptide synthase non-ribosomique et un module de polyketide synthase (NRPS/PKS) codés par un cluster de cinq gènes (Amrein et al. 2004).



La biosynthèse de syringoline A et de mangotoxine sont régulées par le système GacA/GacS qui régule de nombreux composants du pouvoir pathogène (Carrión et al. 2014; Heeb and Haas 2001; Ramel et al. 2012). Ce système global de transduction du signal est très largement conservé chez les bactéries à gram-négatif. C'est un système à deux composantes, GacS étant un senseur de type histidine kinase transmembranaire répondant à des stimuli environnementaux et activant le régulateur de réponse GacA par phosphorelais (Heeb and Haas 2001). Une seule étude a démontré la perception du signal température par GacS, avec une production plus basse à température élevée (35°C vs. 30°C) de cyanure d'hydrogène et d'antibiotique par la souche CHA0 de *P. protegens* (Humair et al. 2009). Ainsi, il n'est pas exclu qu'une production accrue de toxines puisse être liée à de basses températures printanières, si toutefois il était montré que ce symptôme de nervation blanche était bien consécutif à l'activité de l'une ou de ces toxines.

Les souches VCZ du cluster A et du cluster E se transmettent toutes aux graines par deux voies de transmission : la voie florale et la voie vasculaire. Ces voies permettent la colonisation externe et interne des graines par les micro-organismes, alors que la voie par contact conduit à une colonisation externe (Barret et al. 2016). Ainsi, *P. amygdali* pv. *phaseolicola* se transmet par la voie florale et en conditions de contamination naturelle les bactéries sont observées en surface externe et interne du testa et à la surface de l'embryon (Taylor et al. 1979b). Chez *X. campestris* pv. *campestris* sur moutarde et colza, une colonisation vasculaire conduit à une contamination de l'enveloppe de la graine, de l'albumen et également de l'embryon pour des graines symptomatiques (Singh et Mathur 2004). Dans des lots naturellement contaminés, des souches des bactéries du cluster A sont détectées dans le testa et parfois l'amande (données non présentées). La localisation des bactéries dans les semences contaminées est une donnée importante car elle influence l'efficacité des méthodes de désinfection des lots contaminés. La voie florale est empruntée par les souches VCZ et la courgette est une espèce allogame à pollinisation entomophile dépendante des abeilles (Nepi and Pacini 1993). Le pollen peut être une source d'inoculum et de dissémination de bactéries phytopathogènes, comme cela a été montré pour le kiwi et *P. syringae* pv. *actinidiae* (Stefani and Giovanardi 2011; Donati et al. 2018). Le pollen est également impliqué dans la dissémination d'autres bactéries phytopathogènes comme *X. arboricola* pv. *juglandis* (Giovanardi et al. 2016) et *Erwinia amylovora* (Cellini et al. 2019). Les insectes pollinisateurs peuvent avoir un rôle particulièrement important dans la dispersion des bactéries associées au pollen puisqu'ils visitent de nombreuses fleurs (Prado et al. 2020; Ushio et al. 2015). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* peut survivre jusqu'à neuf jours sur les abeilles et jusqu'à 14 jours dans les ruches (Pattemore et al. 2014). Toutefois, les bactéries ne se maintiennent pas durablement sur les abeilles, puisqu'après une inoculation à  $1,4 \times 10^5$  ufc par abeille seulement quelques ufc sont détectés par abeille au bout de six jours (Pattemore et al. 2014). Pendant la culture des courgettes porte-graines, la pollinisation est assurée par des abeilles domestiques issues de ruches implantées temporairement dans les parcelles. Ces ruches peuvent être ensuite déplacées dans d'autres parcelles de courgette pour assurer la pollinisation. Des analyses poussées de pollen de courgette et d'abeilles sont nécessaires pour préciser le rôle des abeilles dans la dissémination des souches VCZ.



Toutes les variétés de courgettes sont sensibles à la nervation blanche. Lors du suivi épidémiologique de parcelles, aucun effet variétal n'a été mis en évidence, mais le design expérimental de ce suivi n'avait pas été conçu dans cet objectif. Identifier les généalogies de variétés de courgette présentant une incidence plus élevée de lots de semences infectées serait une première étape en ce sens. L'accès à ces données pourrait permettre de déployer des stratégies de lutte renforcées pour certaines généalogies plus sensibles et/ou d'orienter les choix de génotypes en sélection variétale. En parallèle, des études d'associations pangénomiques (GWAS) pourraient aussi être conduites avec de nombreux génotypes de courgette pour étudier leur réponse phénotypique à différentes souches VCZ. Ce type d'étude pourrait peut-être permettre d'identifier des régions génomiques associées à une potentielle résistance à la maladie. Dans cette thèse, nous avons déjà remarqué des réponses phénotypiques différentes selon les génotypes de courge (*C. pepo*) de sous-espèces différentes selon les souches VCZ inoculées. En effet, nous avons observé que la courge straightneck (*C. pepo* subsp. *texana*) était moins sensible aux souches du cluster A que trois génotypes de courgette et de citrouilles testés (*C. pepo* subsp. *pepo*). Par contre tous les génotypes de deux sous-espèces sont très sensibles aux souches VCZ des clusters D et E (Lacault et al. 2020). Il pourrait être intéressant d'identifier plus finement ces réponses phénotypiques avec beaucoup plus de génotypes de courgette. Une étude GWAS a récemment été menée pour *A. citrulli* sur pastèque et a permis d'identifier deux loci de caractères quantitatifs (QTL) associés à la résistance à la tache bactérienne de la pastèque (Wu et al. 2019). Ces QTL sont localisés sur deux chromosomes différents ce qui représente une opportunité intéressante pour pyramider les résistances, toutefois, des recherches complémentaires sont nécessaires pour identifier des gènes candidats dans ces QTL de résistance (Wu et al. 2019). La séquence du génome complet de la courgette et de plusieurs morphotypes d'intérêt agronomique pourrait constituer une base solide pour développer de telles approches sur la courgette. Récemment, des efforts de séquençage ont permis d'obtenir des assemblages de qualité pour la courgette (Montero-Pau et al. 2018; Xanthopoulou et al. 2019) et pour d'autres types morphologiques de *C. pepo* subsp. *pepo* dont le cocozelle, la courge à la moëlle (vegetable marrow), la citrouille, la courge à cou tors (crookneck) et les pâtissons (scallop) (Xanthopoulou et al. 2019).





## Bibliographie

- Abd El-Aziz, A. B., and Abd El-Kalek, H. H. 2011. Antimicrobial proteins and oil seeds from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Nat. Sci.* 9:105–119.
- Abushaala, F. A., Ashour, A. O., Ramadan, A. R. B., and Alkeskas, A. A. 2016. Investigation of seed-borne fungi associated with cucurbit seeds in two different regions of Libya. *Al-Satil.* 10:37–53.
- Adam, E., Bernhart, M., Müller, H., Winkler, J., and Berg, G. 2018. The *Cucurbita pepo* seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. *Plant Soil.* 422:35–49.
- Adesemoye, A. O., Wei, H.-H., and Harveson, R. M. 2016. Identification of *Erwinia rhapontici* as the Causal Agent of Crown and Shoot Rot and Pink Seed of Pea in Nebraska. *Plant Health Prog.* 17:155–157.
- Adeyemo, O., Adegoke, S., Oladapo, D., Amaghereonu, C., Thomas, A., Ebirikwem, E., et al. 2019. Transferability of SSR Markers used for Genetic Relationship to Five Species/Genera in Cucurbitaceae. *Egypt. J. Bot.* 117(1): 37–48
- Adhikari, P., Adhikari, T. B., Louws, F. J., and Panthee, D. R. 2020. Advances and Challenges in Bacterial Spot Resistance Breeding in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 21:1734.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., and Shahzad, S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiol. Res.* 221:36–49.
- Akbaba, M., and Ozaktan, H. 2018. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 28:14.
- Akhavan, A., Bahar, M., Askarian, H., Lak, M. R., Nazemi, A., and Zamani, Z. 2013. Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices. *SpringerPlus.* 2:41.
- Akimoto-Tomiyama, C., Furutani, A., and Ochiai, H. 2014. Real Time Live Imaging of Phytopathogenic Bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* MAFF106712 in 'Plant Sweet Home.' *PLOS ONE.* 9:e94386.
- Alagona, P. S. 2016. Species Complex: Classification and Conservation in American Environmental History. *Isis Int. Rev. Devoted Hist. Sci. Its Cult. Influ.* 107:738–761.
- Alavi, S. M., Sanjari, S., Durand, F., Brin, C., Manceau, C., and Poussier, S. 2008. Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3295–3301.
- Aleklett, K., Hart, M., and Shade, A. 2014. The microbial ecology of flowers: an emerging frontier in phyllosphere research. *Botany.* 92:253–266.
- Alfano, J. R., Charkowski, A. O., Deng, W.-L., Badel, J. L., Petnicki-Ocwieja, T., Dijk, K. van, et al. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:4856–4861.

- Alhawiti, A. O., Toulah, F. H., and Wakid, M. H. 2019. Anthelmintic Potential of Cucurbita pepo Seeds on Hymenolepis nana. *Acta Parasitol.* 64:276–281.
- Ali, M. W., Raja, M. U., Irshad, G., Zafar, K., Hasan, M. U., and Shaheen, F. A. 2015. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv pisi from pea (*Pisum sativum* L.). *3(3)*: 93-98.
- Allard, S. M., Ottesen, A. R., and Micallef, S. A. 2020. Rain induces temporary shifts in epiphytic bacterial communities of cucumber and tomato fruit. *Sci. Rep.* 10:1765.
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., et al. 2010. PAMDB, A Multilocus Sequence Typing and Analysis Database and Website for Plant-Associated Microbes. *Phytopathology.* 100:208–215.
- Altin, I., Casoli, L., and Stefani, E. 2020. First report of bacterial spot caused by *Xanthomonas cucurbitae* on pumpkin in Italy. *92(11)*:1591
- Alvarez-Pérez, S., Herrera, C. M., and de Vega, C. 2012. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80:591–602.
- Amrein, H., Makart, S., Granado, J., Shakya, R., Schneider-Pokorny, J., and Dudler, R. 2004. Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301 D-R. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 17:90–97.
- An, J.-H., Noh, Y.-H., Kim, Y.-E., Lee, H.-I., and Cha, J.-S. 2015. Development of PCR and TaqMan PCR Assays to Detect *Pseudomonas coronafaciens*, a Causal Agent of Halo Blight of Oats. *Plant Pathol. J.* 31:25–32.
- Andolfo, G., Di Donato, A., Darrudi, R., Errico, A., Aiese Cigliano, R., and Ercolano, M. R. 2017. Draft of Zucchini (*Cucurbita pepo* L.) Proteome: A Resource for Genetic and Genomic Studies. *Front. Genet.* 8: 181.
- Ansari, M., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Valenzuela, M., Siri, M. I., and Osdaghi, E. 2019. Multiple Introductions of Tomato Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Iran as Revealed by a Global-Scale Phylogeographic Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 27;85(24):e02098-19
- Aprile, F., Heredia-Ponce, Z., Cazorla, F. M., Vicente, A. de, and Gutiérrez-Barranquero, J. A. 2020. A Large Tn7-like Transposon Confers Hyper-Resistance to Copper in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. 10.1128/AEM.02528-20
- Araújo, A. C. de, Fonseca, F. C. D. A., Cotta, M. G., Alves, G. S. C., and Miller, R. N. G. 2019. Plant NLR receptor proteins and their potential in the development of durable genetic resistance to biotic stresses. *Biotechnol. Res. Innov.* 3:80–94.
- Araujo, L., Cardoza, Y. F., Duarte, V., Moraes, M. G. de, Araujo, L., Cardoza, Y. F., et al. 2020. *Pseudomonas syringae* causing bacterial canker on apple trees in Brazil. *Bragantia.* 79:467–473.
- Arnold, D. L., and Preston, G. M. 2018. *Pseudomonas syringae*: enterprising epiphyte and stealthy parasite. *Microbiology.* 165(3):251-253
- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Durán, V. E., Rivera, E., Olea, F., Codina, J. C., et al. 2003. Mangotoxin: a novel antimetabolite toxin produced by *Pseudomonas syringae* inhibiting ornithine/arginine biosynthesis. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 63:117–127.
- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Pérez-García, A., and Vicente, A. de. 2011. Genes involved in the production of antimetabolite toxins by *Pseudomonas syringae* pathovars. *Genes.* 2:640–660.
- Arrebola, E., Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., and de Vicente, A. 2007. A Nonribosomal Peptide Synthetase Gene (*mgoA*) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Is

- Involved in Mangotoxin Biosynthesis and Is Required for Full Virulence. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20:500–509.
- Arriel, D. a. A., Fonseca, N. R., Guimarães, L. M. S., Hermenegildo, P. S., Mafia, R. G., Júnior, N. B., et al. 2014. Wilt and die-back of *Eucalyptus* spp. caused by *Erwinia psidii* in Brazil. *For. Pathol.* 44:255–265.
- Arunkumar, N., Rakesh, S., Rajaram, K., Kumar, N. R., and Durairajan, S. S. K. 2019. Anthosphere Microbiome and Their Associated Interactions at the Aromatic Interface. pp 309–324
- von Arx, M., Moore, A., Davidowitz, G., and Arnold, A. E. 2019. Diversity and distribution of microbial communities in floral nectar of two night-blooming plants of the Sonoran Desert. *PLoS ONE.* 14(12): e0225309.
- Ashorpour, M., Niknejad Kazempour, M., and Ramezanie, M. 2008. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* the causal agent of bacterial canker on olives (*Olea europaea*) in Iran. *ScienceAsia.* 34:323.
- Ayliffe, M., and Sørensen, C. K. 2019. Plant nonhost resistance: paradigms and new environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50:104–113.
- Aziz, N. H., Moussa, L. a. A., and Far, F. M. E. 2004. Reduction of Fungi and Mycotoxins Formation in Seeds by Gamma-Radiation. *J. Food Saf.* 24:109–127.
- Babadoost, M., and Ravanlou, A. 2012. Outbreak of Bacterial Spot (*Xanthomonas cucurbitae*) in Pumpkin Fields in Illinois. *Plant Dis.* 96:1222–1222.
- Babadoost, M., and Zhang, X. 2020. Eradication of *Xanthomonas cucurbitae* in pumpkin seed by hot-water treatment. *Acta Hortic.* :9–16.
- Babadoost, M., and Zitter, T. A. 2009. Fruit rots of pumpkin: a serious threat to the pumpkin industry. *Plant Dis.* 93:772–782.
- Bae, C., Han, S. W., Song, Y.-R., Kim, B.-Y., Lee, H.-J., Lee, J.-M., et al. 2015. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor. Appl. Genet.* 128:1219–1229.
- Baggs, E. L., Monroe, J. G., Thanki, A. S., O’Grady, R., Schudoma, C., Haerty, W., et al. 2020. Convergent Loss of an EDS1/PAD4 Signaling Pathway in Several Plant Lineages Reveals Coevolved Components of Plant Immunity and Drought Response. *Plant Cell.* 32:2158–2177.
- Bahar, O., Goffer, T., and Burdman, S. 2009a. Type IV Pili are required for virulence, twitching motility, and biofilm formation of *acidovorax avenae* subsp. *Citrulli*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 22:909–920.
- Bahar, O., Kritzman, G., and Burdman, S. 2009b. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. *Eur. J. Plant Pathol.* 123:71–83.
- Bais, H. P., Fall, R., and Vivanco, J. M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134:307–319.
- Balaž, J., Iličić, R., Maširević, S., Jošić, D., and Kojić, S. 2014. First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spots of Oil Pumpkin (*Cucurbita pepo*) in Serbia. *Plant Dis.* 98:684.
- Balestra, G. M., Taratufolo, M. C., Vinatzer, B. A., and Mazzaglia, A. 2012. A Multiplex PCR Assay for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and Differentiation of Populations with Different Geographic Origin. *Plant Dis.* 97:472–478.

- Balint-Kurti, P. 2019. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol. Plant Pathol.* 20:1163–1178.
- Balme-les-Grottes, L. 1993. Evaluation of the Biolog GN MicroPlate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant Dis.* :553.
- Baltrus, D. A., and Clark, M. 2019. A complete genome sequence for *Pseudomonas syringae* pv. pisi PP1 highlights the importance of multiple modes of horizontal gene transfer during phytopathogen evolution. *Mol. Plant Pathol.* 20:1013–1018.
- Baltrus, D. A., Nishimura, M. T., Romanchuk, A., Chang, J. H., Mukhtar, M. S., Cherkis, K., et al. 2011. Dynamic Evolution of Pathogenicity Revealed by Sequencing and Comparative Genomics of 19 *Pseudomonas syringae* Isolates ed. David S. Guttman. *PLoS Pathog.* 7:e1002132.
- Baltrus, D., Honour, C., and Guttman, S. 2017. Evolution, genomics and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Pathol.* :152–168.
- Barret, M., Guimbaud, J.-F., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. 2016. Plant microbiota affects seed transmission of phytopathogenic microorganisms. *Mol. Plant Pathol.* 17:791–795.
- Bartoli, C., ROUX, F., and Lamichhane, J. R. 2016. Molecular mechanisms underlying the emergence of bacterial pathogens: an ecological perspective. *Mol. Plant Pathol.* 17:303–310.
- Bashan, Y. 2011. Field dispersal of *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, and *Alternaria macrospora* by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles, and water sources. *Can. J. Bot.* 10.1139/b86-041
- Batt, C. A. 2016. Virulence. In Reference Module in Food Science, Elsevier. 10.1016/B978-0-08-100596-5.03453-3
- Beattie, G. A., and Lindow, S. E. 1999. Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology.* 89:353–359.
- Beattie, G. A., and Lindow, S. E. 1995. The Secret Life of Foliar Bacterial Pathogens on Leaves. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:145–172.
- Behrendt, U., Ulrich, A., and Schumann, P. 2003. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1461–1469.
- Bender, C. L. 1999. Chlorosis-inducing Phytotoxins Produced by *Pseudomonas syringae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:1–12.
- Bentsink, L., and Koornneef, M. 2008. Seed Dormancy and Germination. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 6: e0119.
- Berge, O., Monteil, C. L., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Sands, D. C., et al. 2014. A User's Guide to a Data Base of the Diversity of *Pseudomonas syringae* and Its Application to Classifying Strains in This Phylogenetic Complex. *PLoS ONE.* 9(9): e105547.
- Bertolini, E., Penyalver, R., García, A., Olmos, A., Quesada, J. M., Cambra, M., et al. 2003. Highly sensitive detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in asymptomatic olive plants by nested-PCR in a single closed tube. *J. Microbiol. Methods.* 52:261–266.
- Besler, K. R., and Little, E. L. 2015. First Report of Cucurbit Yellow Vine Disease Caused by *Serratia marcescens* in Georgia. *Plant Dis.* 99:1175–1175.
- Bewley, J. D., and Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination.* 2nd ed. Springer US.

- Bharti, S. K., Kumar, A., Sharma, N. K., Prakash, O., Jaiswal, S. K., Krishnan, S., et al. 2013. Tocopherol from seeds of Cucurbita pepo against diabetes: Validation by in vivo experiments supported by computational docking. *J. Formos. Med. Assoc.* 112:676–690.
- Bhat, N. A., Bhat, K. A., Zargar, M. Y., Teli, M. A., Nazir, M., and Zargar, S. M. 2010. Current status of angular leaf spot (*Pseudomonas syringae*pv. *lachrymans*) of cucumber: A REVIEW. 8:1–11.
- Bibi, A., Junaid, M., and Ahmad, M. 2018. Pathogenicity and inoculum concentration effects of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on severity of bacterial canker of tomato. *Nov. Res. Microbiol. J.* 2:167–174.
- Björklöf, K., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Klinger, N., Haahtela, K., and Romantschuk, M. 2000. Colonization strategies and conjugal gene transfer of inoculated *Pseudomonas syringae* on the leaf surface. *J. Appl. Microbiol.* 89:423–432.
- Block, C. C., and Shepherd, L. M. 2008. Long-term Survival and Seed Transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Melon and Watermelon Seed. *Plant Health Prog.* 9:36.
- Bonneaud, C., Weinert, L. A., and Kuijper, B. 2019. Understanding the emergence of bacterial pathogens in novel hosts. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374(1782):20180328.
- Boquet, D. J. 2012. Winter cover crop. Louisiana conservation tillage handbook. Chapter 2. pp9–12.
- Borschinger, B., Bartoli, C., Chandeysson, C., Guilbaud, C., Parisi, L., Bourgeay, J. F., et al. 2016. A set of PCRs for rapid identification and characterization of *Pseudomonas syringae* phylogroups. *J. Appl. Microbiol.* 120:714–723.
- Boureau, T., Routtu, J., Roine, E., Taira, S., and Romantschuk, M. 2002. Localization of hrpA-induced *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in infected tomato leaves. *Mol. Plant Pathol.* 3:451–460.
- Bozkurt, İ. A., and Soylu, S. 2011. Determination of responses of different bean cultivars against races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, causal agent of halo blight of bean. *Euphytica.* 179:417–425.
- Bradbury, J. F. 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute.
- Braun-Kiewnick, A., Jacobsen, B. J., and Sands, D. C. 2000. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Basal Kernel Blight of Barley, by Antagonistic *Pantoea agglomerans*. *Phytopathology*®. 90:368–375.
- Briand, M., Bouzid, M., Hunault, G., Legeay, M., Saux, M. F.-L., and Barret, M. 2019. A rapid and simple method for assessing and representing genome sequence relatedness. *bioRxiv.* :569640.
- Briand, M., Gaborieau, R., Jacques, M.-A., Barret, M., Boureau, T., Gaillard, S., et al. 2016. SkIf: a tool for rapid identification of genes or regulators of interest. 10.7490/f1000research.1112490.1
- Bruton, B. D., Mitchell, F., Fletcher, J., Pair, S. D., Wayadande, A., Melcher, U., et al. 2003. *Serratia marcescens*, a Phloem-Colonizing, Squash Bug -Transmitted Bacterium: Causal Agent of Cucurbit Yellow Vine Disease. *Plant Dis.* 87:937–944.
- Bubán, T., and Orosz-Kovács, Zs. 2003. The nectary as the primary site of infection by *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.: a mini review. *Plant Syst. Evol.* 238:183–194.
- Buck, J. W., and Walcott, R. 2003. Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. *Plant Health Prog.* 10.1094/PHP-2003-0121-01-RV

- Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C., and Kehr, J. 2004. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta*. 219:610–618.
- Bull, C., Coutinho, T., Denny, T., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Li, X., et al. 2014. List of New Names of Plant Pathogenic Bacteria (2011-2012). *J. PLANT Pathol.* 96:223–226.
- Bull, C. T., Boer, S. H. D., Denny, T. P., Firrao, G., Saux, M. F.-L., Saddler, G. S., et al. 2008. DEMYSTIFYING THE NOMENCLATURE OF BACTERIAL PLANT PATHOGENS. *J. Plant Pathol.* 90:403–417.
- Bull, C. T., Boer, S. H. de, Denny, T. P., Firrao, G., Saux, M. F.-L., Saddler, G. S., et al. 2010. COMPREHENSIVE LIST OF NAMES OF PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 1980-2007. *Eur. J. Plant Pathol.* 92:551.
- Bull, C. T., and Koike, S. T. 2015. Practical Benefits of Knowing the Enemy: Modern Molecular Tools for Diagnosing the Etiology of Bacterial Diseases and Understanding the Taxonomy and Diversity of Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53:157–180.
- Burch, A. Y., Shimada, B. K., Mullin, S. W. A., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., and Lindow, S. E. 2012. *Pseudomonas syringae* Coordinates Production of a Motility-Enabling Surfactant with Flagellar Assembly. *J. Bacteriol.* 194:1287–1298.
- Burdman, S., Kots, N., Kritzman, G., and Kopelowitz, J. 2005. Molecular, Physiological, and Host-Range Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Isolates from Watermelon and Melon in Israel. *Plant Dis.* 89:1339–1347.
- Burdman, S., and Walcott, R. 2012. *Acidovorax citrulli*: generating basic and applied knowledge to tackle a global threat to the cucurbit industry: *Acidovorax citrulli*. *Mol. Plant Pathol.* 13:805–815.
- Burkholder, W. H. 1948. Bacteria as plant pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2:389–412.
- Busquets, A., Gomila, M., Beiki, F., Mulet, M., Rahimian, H., García-Valdés, E., et al. 2017. *Pseudomonas caspiana* sp. nov., a citrus pathogen in the *Pseudomonas syringae* phylogenetic group. *Syst. Appl. Microbiol.* 40:266–273.
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., and Coffey, A. 2017. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.* 8:34.
- Büttner, D., and He, S. 2009. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. *Plant Physiol.* 150:1656–64.
- Campbell, N. 1995. *Biologie*. none édition. De Boeck - Wesmael.
- del Campo, R., Russi, P., Mara, P., Mara, H., Peyrou, M., de León, I. P., et al. 2009. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 298:143–148.
- Campos, M., Markham, K. R., Mitchell, K. A., and Cunha, A. P. da. 1997. An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid/phenolic profiles. *Phytochem. Anal.* 8:181–185.
- Canonne, J., and Rivas, S. 2012. Bacterial effectors target the plant cell nucleus to subvert host transcription. *Plant Signal. Behav.* 7:217–221.
- Capuozzo, C., Formisano, G., Iovieno, P., Andolfo, G., Tomassoli, L., Barbella, M. M., et al. 2017. Inheritance analysis and identification of SNP markers associated with ZYMV resistance in *Cucurbita pepo*. *Mol. Breed.* 37:99.
- caracuel, D., Castro, A., Enríquez, C., Morales, J., Ruiz, I., Ruiz, M., et al. 2012. Flower development and pollen morphology in Cucurbitaceae. pp. 23–28.



- Cardoso, A. I. I., Piacenti, L. Z., Lino, P. R., Padovan, I. M., Kronka, A. Z., Cardoso, A. I. I., et al. 2020. Control of *Alternaria brassicicola* with thermotherapy and propolis and effect on the physiological quality of kale seeds. *Hortic. Bras.* 38:363–369.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Plaza, M., Garzo, E., and Fereres, A. 2016. Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Ann. Appl. Biol.* 169:284–297.
- Carrión, V. J., van der Voort, M., Arrebola, E., Gutiérrez-Barranquero, J. A., de Vicente, A., Raaijmakers, J. M., et al. 2014. Mangotoxin production of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is regulated by MgoA. *BMC Microbiol.* 14:46.
- Castellanos-Morales, G., Ruiz-Mondragón, K. Y., Hernández-Rosales, H. S., Sánchez-de la Vega, G., Gámez, N., Aguirre-Planter, E., et al. 2019. Tracing back the origin of pumpkins (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo* L.) in Mexico. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286:20191440.
- Cella, E., Angeletti, S., Fogolari, M., Bazzardi, R., Gara, L. D., and Ciccozzi, M. 2018. Two different *Xylella fastidiosa* strains circulating in Italy: phylogenetic and evolutionary analyses. *J. Plant Interact.* 13:428–432.
- Cellini, A., Giacomuzzi, V., Donati, I., Farneti, B., Rodríguez-Estrada, M. T., Savioli, S., et al. 2019. Pathogen-induced changes in floral scent may increase honeybee-mediated dispersal of *Erwinia amylovora*. *ISME J.* 13:847–859.
- Cerna-Vargas, J. P., Santamaría-Hernando, S., Matilla, M. A., Rodríguez-Herva, J. J., Daddaoua, A., Rodríguez-Palenzuela, P., et al. 2019. Chemoperception of Specific Amino Acids Controls Phytopathogenicity in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. 10.1128/mBio.01868-19
- Cerutti, A., Jauneau, A., Auriac, M.-C., Lauber, E., Martinez, Y., Chiarenza, S., et al. 2017. Immunity at Cauliflower *Hydathodes* Controls Systemic Infection by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*1. *Plant Physiol.* 174:700–716.
- Cesbron, S., Briand, M., Essakhi, S., Gironde, S., Boureau, T., Manceau, C., et al. 2015. Comparative Genomics of Pathogenic and Nonpathogenic Strains of *Xanthomonas arboricola* Unveil Molecular and Evolutionary Events Linked to Pathoadaptation. *Front. Plant Sci.* 6: 1126.
- Cesbron, S., Dupas, E., Beaupère, Q., Briand, M., Montes-Borrego, M., Velasco-Amo, M. del P., et al. 2020. Development of A Nested-MultiLocus Sequence Typing Approach for A Highly Sensitive and Specific Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies Directly from Plant Samples. *Agronomy.* 10:1099.
- Chai, A., Ben, H., Guo, W., Shi, Y., Xie, X., Li, L., et al. 2020. Quantification of Viable Cells of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tomato Seed Using Propidium Monoazide and a Real-Time PCR Assay. *Plant Dis.* :PDIS-11-19-2397-RE.
- Champoiseau, P. 2006. *Xanthomonas albilineans*, l'agent causal de l'échaudure des feuilles de la canne a sucre: caracterisation et variabilite des bases genetiques du pouvoir pathogene, en guadeloupe et dans le monde.
- Chatterjee, S., Almeida, R. P. P., and Lindow, S. 2008. Living in two Worlds: The Plant and Insect Lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:243–271.
- Chen, N. W. G., Serres-Giardi, L., Ruh, M., Briand, M., Bonneau, S., Darrasse, A., et al. 2018. Horizontal gene transfer plays a major role in the pathological convergence of *Xanthomonas* lineages on common bean. *BMC Genomics.* 13;19(1):606
- Chen, Z.-D., Kang, H.-J., Chai, A.-L., Shi, Y.-X., Xie, X.-W., Li, L., et al. 2020. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in planta. *Eur. J. Plant Pathol.* 156:739–750.

- Cheng, C., Gao, X., Feng, B., Sheen, J., Shan, L., and He, P. 2013. Plant immune response to pathogens differs with changing temperatures. *Nat. Commun.* 4:2530.
- Chesneau, G., Torres-Cortes, G., Briand, M., Darrasse, A., Preveaux, A., Marais, C., et al. 2020. Temporal dynamics of bacterial communities during seed development and maturation. [10.1093/femsec/fiaa190](https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa190)
- Chiriac, I. P., Lipşa, F. D., and Ulea, E. 2015. Comparative Study Regarding in Vitro Infections with *Erwinia Amylovora* and *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae* on Pomaceae Species. *Cercet. Agron. Mold.* 48:97–106.
- Chonoko, U. G., and Rufai, A. B. 2011. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Cucurbita pepo* (Pumpkin) against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhi*. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 4:145–147.
- Christensen, B. B., Haagensen, J. A. J., Heydorn, A., and Molin, S. 2002. Metabolic Commensalism and Competition in a Two-Species Microbial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2495–2502.
- Chu, D., and Wei, L. 2019. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. *BMC Cancer.* 19:359.
- Cia, M. C., de Carvalho, G., Azevedo, R. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Souza, G. M., Nishiyama-Junior, M. Y., et al. 2018. Novel Insights Into the Early Stages of Ratoon Stunting Disease of Sugarcane Inferred from Transcript and Protein Analysis. *Phytopathology®.* 108:1455–1466.
- Cintas, N. A., Koike, S. T., and Bull, C. T. 2002. A New Pathovar, *Pseudomonas syringae* pv. *alisalensis* pv. nov., Proposed for the Causal Agent of Bacterial Blight of Broccoli and Broccoli Raab. *Plant Dis.* 86:992–998.
- Cirvilleri, G., Bella, P., La Rosa, R., and Catara, V. 2008. Internalization and Survival of *Pseudomonas corrugata* from Flowers to Fruits and Seeds of Tomato Plants. In *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens – Identification, Epidemiology and Genomics, eds. M'Barek Fatmi, Alan Collmer, Nicola Sante Iacobellis, John W. Mansfield, Jesus Murillo, Norman W. Schaad, et al. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 73–79.
- Clarke, C. R., Cai, R., Studholme, D. J., Guttman, D. S., and Vinatzer, B. A. 2010. *Pseudomonas syringae* Strains Naturally Lacking the Classical *P. syringae* hrp/hrc Locus Are Common Leaf Colonizers Equipped with an Atypical Type III Secretion System. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 23:198–210.
- Cochet, N., and Widehem, P. 2000. Ice crystallization by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:153–161.
- Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56:457–487.
- Cohen, R., Hanan, A., and Paris, H. S. 2003. Single-gene resistance to powdery mildew in zucchini squash (*Cucurbita pepo*). *Euphytica.* 130:433–441.
- Colombi, E., Straub, C., Künzel, S., Templeton, M. D., McCann, H. C., and Rainey, P. B. 2017. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids. *Environ. Microbiol.* 19:819–832.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., and Sessitsch, A. 2019. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *J. Adv. Res.* 19:29–37.
- Costa Carvalho, D. D., de Mello, S., Inglis, P., and Lobo Junior, M. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Trop. Plant Pathol.* 39:384.

- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., and James, G. 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176:2137–2142.
- Coutinho, T. A., Brady, C. L., van der Vaart, M., Venter, S. N., Telechea, N., Rolfo, M., et al. 2011. A new shoot and stem disease of *Eucalyptus* species caused by *Erwinia psidii*. *Australas. Plant Pathol.* 40:55–60.
- Coutinho, T. A., Westhuizen, L. van der, Roux, J., McFarlane, S. A., and Venter, S. N. 2015. Significant host jump of *Xanthomonas vasicola* from sugarcane to a *Eucalyptus grandis* clone in South Africa. *Plant Pathol.* 64:576–581.
- Cruz, L., Cruz, J., Eloy, M., Oliveira, H., Vaz, H., and Tenreiro, R. 2010. First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Race 1 in Portugal. *Plant Dis.* 94:1504–1504.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A. 2009. *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. Microbiol.* 12:53–60.
- Cunty, A., Cesbron, S., Briand, M., Carrère, S., Poliakoff, F., Jacques, M.-A., et al. 2016. Draft genome sequences of five *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* strains isolated in France. *Braz. J. Microbiol.* 47:529–530.
- Cunty, A., Cesbron, S., Poliakoff, F., Jacques, M.-A., and Manceau, C. 2015a. Origin of the Outbreak in France of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Biovar 3, the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit, Revealed by a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:6773–6789.
- Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., et al. 2015b. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. *nov.* *Plant Pathol.* 64:582–596.
- Dale, J., James, A., Paul, J. Y., Khanna, H., Smith, M., Peraza-Echeverria, S., et al. 2017. Transgenic Cavendish bananas with resistance to *Fusarium wilt* tropical race 4. *Nat. Commun.* 8:1496
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., and Staskawicz, B. J. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science.* 16; 341(6147).
- Dangl, J. L., and Jones, J. D. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 411:826–833.
- Darrasse, A., Barret, M., Cesbron, S., Compant, S., and Jacques, M.-A. 2018. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. *Plant Soil.* 422:115–128.
- Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C. E., and Jacques, M.-A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:203–215.
- Darrasse, A., Darsonval, A., Boureau, T., Brisset, M.-N., Durand, K., and Jacques, M.-A. 2010. Transmission of Plant-Pathogenic Bacteria by Nonhost Seeds without Induction of an Associated Defense Reaction at Emergence. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6787–6796.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Durand, K., Bureau, C., Cesbron, S., and Jacques, M.-A. 2009. Adhesion and Fitness in the Bean Phyllosphere and Transmission to Seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 22:747–757.
- Darsonval, A., Darrasse, A., Meyer, D., Demarty, M., Durand, K., Bureau, C., et al. 2008. The Type III Secretion System of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* Is Involved in the Phyllosphere Colonization Process and in Transmission to Seeds of Susceptible Beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2669–2678.

- Davis, M. J., Gillaspie Jr, A. G., Vidaver, A. K., and Harris, R. W. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 34:107–117.
- De Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol.* 56:879–886.
- Denancé, N., Briand, M., Gaborieau, R., Gaillard, S., and Jacques, M.-A. 2019. Identification of genetic relationships and subspecies signatures in *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics.* 20:239.
- Diallo, M. D., Monteil, C. L., Vinatzer, B. A., Clarke, C. R., Glaux, C., Guilbaud, C., et al. 2012. *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in nonagricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. *ISME J.* 6:1325–1335.
- van Dijk, K., Fouts, D. E., Rehm, A. H., Hill, A. R., Collmer, A., and Alfano, J. R. 1999. The Avr (effector) proteins HrmA (HopPsyA) and AvrPto are secreted in culture from *Pseudomonas syringae* pathovars via the Hrp (type III) protein secretion system in a temperature- and pH-sensitive manner. *J. Bacteriol.* 181:4790–4797.
- Dillon, M. M., Almeida, R. N. D., Laflamme, B., Martel, A., Weir, B. S., Desveaux, D., et al. 2019a. Molecular Evolution of *Pseudomonas syringae* Type III Secreted Effector Proteins. *Front. Plant Sci.* 5;10:418.
- Dillon, M. M., Thakur, S., Almeida, R. N. D., Wang, P. W., Weir, B. S., and Guttman, D. S. 2019b. Recombination of ecologically and evolutionarily significant loci maintains genetic cohesion in the *Pseudomonas syringae* species complex. *Genome Biol.* 20:3.
- Ding, H., Fu, T.-J., and Smith, M. A. 2013. Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment? *J. Food Sci.* 78:R495–R501.
- Donati, I., Cellini, A., Buriani, G., Mauri, S., Kay, C., Tacconi, G., et al. 2018. Pathways of flower infection and pollen-mediated dispersion of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. *Hortic. Res.* 1;5:56.
- Donati, I., Cellini, A., Sangiorgio, D., Vanneste, J. L., Scortichini, M., Balestra, G. M., et al. 2020. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, Infection Dynamics and Disease Epidemiology. *Microb. Ecol.* :1–22.
- Dong, C.-J., Wang, L.-L., Li, Q., and Shang, Q.-M. 2019. Bacterial communities in the rhizosphere, phyllosphere and endosphere of tomato plants. *PLOS ONE.* 14:e0223847.
- Dong, K., Pan, H., Yang, D., Rao, L., Zhao, L., Wang, Y., et al. 2020. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 19:149–183.
- Dossa, G. S., Quibod, I., Atienza-Grande, G., Oliva, R., Maiss, E., Vera Cruz, C., et al. 2020. Rice pyramided line IRBB67 (Xa4/Xa7) homeostasis under combined stress of high temperature and bacterial blight. *Sci. Rep.* 10:683.
- Douzet, R. 2007. Petit lexique de botanique à l'usage du débutant.
- Dow, J. M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X., and Tang, J.-L. 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:10995–11000.
- Dudnik, A., Bigler, L., and Dudler, R. 2014. Production of Proteasome Inhibitor Syringolin A by the Endophyte *Rhizobium* sp. Strain AP16. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:3741–3748.

- Dulla, G. F. J., Krasileva, K. V., and Lindow, S. E. 2010. Interference of quorum sensing in *Pseudomonas syringae* by bacterial epiphytes that limit iron availability. *Environ. Microbiol.* 12:1762–1774.
- Duong, D. A., Jensen, R. V., and Stevens, A. M. 2018. Discovery of *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii* genes important for survival in corn xylem through a Tn-Seq analysis. *Mol. Plant Pathol.* 19:1929–1941.
- Dupas, E., Briand, M., Jacques, M.-A., and Cesbron, S. 2019a. Novel Tetraplex Quantitative PCR Assays for Simultaneous Detection and Identification of *Xylella fastidiosa* Subspecies in Plant Tissues. *Front. Plant Sci.* 10: 1732.
- Dupas, E., Legendre, B., Olivier, V., Poliakoff, F., Manceau, C., and Cuntty, A. 2019b. Comparison of real-time PCR and droplet digital PCR for the detection of *Xylella fastidiosa* in plants. *J. Microbiol. Methods.* 162:86–95.
- Dutta, B., Avci, U., Hahn, M. G., and Walcott, R. R. 2012a. Location of *Acidovorax citrulli* in infested watermelon seeds is influenced by the pathway of bacterial invasion. *Phytopathology.* 102:461–468.
- Dutta, B., Gitaitis, R., Agarwal, G., Coutinho, T., and Langston, D. 2018. *Pseudomonas coronafaciens* sp. nov., a new phyto-bacterial species diverse from *Pseudomonas syringae*. *PLoS One.* 13:e0208271.
- Dutta, B., Gitaitis, R. D., Lewis, K. J., and Langston, D. B. 2012b. A New Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon in Georgia, USA. *Plant Dis.* 97:556–556.
- Dutta, B., Gitaitis, R., Smith, S., and Langston, D. 2014a. Interactions of Seedborne Bacterial Pathogens with Host and Non-Host Plants in Relation to Seed Infestation and Seedling Transmission ed. Dawn Arnold. *PLoS ONE.* 9:e99215.
- Dutta, B., Ha, Y., Avci, U., Sparks, A. C., Johnson, K. L., and Walcott, R. R. 2015. Pathways of bacterial invasion and watermelon seed infection by *Acidovorax citrulli* - Dutta - 2015 - *Plant Pathology* - Wiley Online Library. *Plant Pathol.* 64:537–544.
- Dutta, B., Ingram, T., Gitaitis, R. D., Langston, D. B., Brenneman, T., Webster, T. M., et al. 2014b. First Report of Bacterial Blight of Sugar Beet Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in Georgia, USA. *Plant Dis.* 98:1423–1423.
- Dutta, B., Scherm, H., Gitaitis, R. D., and Walcott, R. R. 2012c. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96:705–711.
- Dutta, B., Schneider, R. W., Robertson, C. L., and Walcott, R. R. 2016. Embryo Localization Enhances the Survival of *Acidovorax citrulli* in Watermelon Seeds. *Phytopathology.* 106:330–338.
- Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A., Lelliott, R. A., and Schroth, M. N. 1980. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Review Plant Pathol.* 50.
- Eckshtain-Levi, N., Munitz, T., Živanović, M., Traore, S. M., Spröer, C., Zhao, B., et al. 2014. Comparative Analysis of Type III Secreted Effector Genes Reflects Divergence of *Acidovorax citrulli* Strains into Three Distinct Lineages. *Phytopathology®.* 104:1152–1162.
- Eichenlaub, R., and Gartemann, K.-H. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:445–464.

- El-Hendawy, H. H., Osman, M. E., and Sorour, N. M. 2005. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* 160:343–352.
- Elias, S., and Banin, E. 2012. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* 36:990–1004.
- Elmer, W. H. 1996. *Fusarium* fruit rot of pumpkin in Connecticut. *Plant Dis.* 80:131–135.
- El-Sayed, A., and Kamel, M. 2020. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27:22336–22352.
- Engering, A., Hogerwerf, L., and Slingenbergh, J. 2013. Pathogen-host-environment interplay and disease emergence. *Emerg. Microbes Infect.* 2:e5.
- EPPO. 2019. PM 7/24 (4) *Xylella fastidiosa*. *EPPO Bull.* 49:175–227.
- Esser, D. S., Leveau, J. H. J., Meyer, K. M., and Wiegand, K. 2015. Spatial scales of interactions among bacteria and between bacteria and the leaf surface. *FEMS Microbiol. Ecol.* 10.1093/femsec/fiu034
- Everts, K. L., and Himmelstein, J. C. 2015. *Fusarium* wilt of watermelon: Towards sustainable management of a re-emerging plant disease. *Crop Prot.* 73:93–99.
- Farber, D. H., and Mundt, C. C. 2016. Effect of Plant Age and Leaf Position on Susceptibility to Wheat Stripe Rust. *Phytopathology*®. 107:412–417.
- Fatima, U., and Senthil-Kumar, M. 2015. Plant and pathogen nutrient acquisition strategies. *Front. Plant Sci.* 6:750.
- Fatmi, M., Walcott, R. R., and Schaad, N. W. 2017. Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material. American Phytopathological Society (APS Press).
- Fayette, J., Jones, J. B., Pernezny, K., Roberts, P. D., and Raid, R. 2018. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* on lettuce in crop debris, irrigation water, and weeds in south Florida. *Eur. J. Plant Pathol.* 151:341–353.
- Feng, J., Li, J., Randhawa, P., Bonde, M., and Schaad, N. W. 2009. Evaluation of seed treatments for the eradication of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from melon and watermelon seeds. *Can. J. Plant Pathol.* 31:180–185.
- Fernandes, P. É., São José, J. F. B., Zerdas, E. R. M. A., Andrade, N. J., Fernandes, C. M., and Silva, L. D. 2014. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and evaluation of cleaning procedures using surfactin. *Food Control.* 41:21–26.
- Fernández-Sanz, A. M., Rodicio, M. R., and González, A. J. 2016. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* isolated from weeds in bean crop fields. *Lett. Appl. Microbiol.* 62:344–348.
- Fessehaie, A., and Walcott, R. R. 2005. Biological Control to Protect Watermelon Blossoms and Seed from Infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology.* 95:413–419.
- Fett, W. F., Fu, T.-J., and Tortorello, M. L. 2005. Seed Sprouts: the State of Microbiological Safety. In *Microbiology of Fresh Produce*, John Wiley & Sons, Ltd, p. 167–219.
- Ficker, A. 2019. *Sclerotinia sclerotiorum* impacts on host crops. *Creat. Compon.* Available at: <https://lib.dr.iastate.edu/creativecomponents/307>.
- Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., and Steber, C. 2008. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:387–415.



- FNAMS, 2013. Produire des semences de courgette dans un itinéraire agrobiologique. Fiche Techn'ITAB semences. Consulté en ligne le 11/03/2021 : [http://itab.asso.fr/downloads/Fiches-techniques\\_semences/fiche%20courgette%20mini.pdf](http://itab.asso.fr/downloads/Fiches-techniques_semences/fiche%20courgette%20mini.pdf)
- Forbes, G. A., Mizubuti, E. S. G., and Shtienberg, D. 2009. Plant Disease Epidemiology and Disease Management – Has Science Had an Impact on Practice? In *Integrated Pest Management: Innovation-Development Process: Volume 1*, eds. Rajinder Peshin and Ashok K. Dhawan. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 351–368.
- Forghani, F. 2019. Application of Electrolyzed Water in Agriculture. In *Electrolyzed Water in Food: Fundamentals and Applications*, eds. Tian Ding, Deog-Hwan Oh, and Donghong Liu. Singapore: Springer, p. 223–230.
- Fourest, E., Rehms, L. D., Sands, D. C., Bjarko, M., and Lund, R. E. 1990. Eradication of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* from barley seed with dry heat treatments. *Plant Dis.* 74:816–818.
- Fradin, E. F., and Thomma, B. P. H. J. 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol. Plant Pathol.* 7:71–86.
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., and Shay, J. E. 2017. Transmission of Bacterial Endophytes. *Microorganisms.* 5(4): 70.
- Frankle, W. G., Hopkins, D., and Stall, R. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. 10.1094/PD-77-1090.
- Fraser, C., Alm, E. J., Polz, M. F., Spratt, B. G., and Hanage, W. P. 2009. The Bacterial Species Challenge: Making Sense of Genetic and Ecological Diversity. *Science.* 323:741–746.
- Freeman, B. C., Chen, C., Yu, X., Nielsen, L., Peterson, K., and Beattie, G. A. 2013. Physiological and Transcriptional Responses to Osmotic Stress of Two *Pseudomonas syringae* Strains That Differ in Epiphytic Fitness and Osmotolerance. *J. Bacteriol.* 195:4742–4752.
- Frérot, M., Lefebvre, A., Aho, S., Callier, P., Astruc, K., and Aho Glélé, L. S. 2018. What is epidemiology? Changing definitions of epidemiology 1978-2017. *PLoS ONE.* 13(12): e0208442.
- Fuchs, M., and Gonsalves, D. 1995. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses. *Bio/technology.* 13:1466–1473.
- Fürnkranz, M., Lukesch, B., Müller, H., Huss, H., Grube, M., and Berg, G. 2012. Microbial diversity inside pumpkins: microhabitat-specific communities display a high antagonistic potential against phytopathogens. *Microb. Ecol.* 63:418–428.
- Furuya, E. Y., and Lowy, F. D. 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:36–45.
- Gallelli, A., Talocci, S., Pilotti, M., and Loreti, S. 2014. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker. *Plant Pathol.* 63:264–276.
- Gamliel, A. (Hebrew U. of J., and Katan, J. 1992. Chemotaxis of fluorescent pseudomonads towards seed exudates and germinating seeds in solarized soil. *Phytopathol. USA.* 10.1094/Phyto-82-328.
- Gardan, L., Bollet, C., Ghorrah, M. A., Grimont, F., and Grimont, P. a. D. 1992. DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:606–612.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., and Grimont, P. A. D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas*



- tremae sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.(ex Sutic and Dowson 1959). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 49:469–478.
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* 106:179–191.
- Gassmann, W., Dahlbeck, D., Chesnokova, O., Minsavage, G. V., Jones, J. B., and Staskawicz, B. J. 2000. Molecular Evolution of Virulence in Natural Field Strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 182:7053–7059.
- Georgiades, K., and Raoult, D. 2011. Defining Pathogenic Bacterial Species in the Genomic Era. *Front. Microbiol.* 17;1:151
- Gervasi, F., and Scortichini, M. 2009. Detection of *Pseudomonas avellanae* from hazelnut twigs by taqman real-time pcr. *J. Plant Pathol.* 91:561–566.
- Getz, S., D.w, F., and C.t, S. 1983. Scanning electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [Bacterial speck of *Lycopersicon esculentum*]. *Phytopathology.* 73(1):39-43
- Giampetruzzi, A., Saponari, M., Loconsole, G., Boscia, D., Savino, V. N., Almeida, R. P. P., et al. 2017. Genome-Wide Analysis Provides Evidence on the Genetic Relatedness of the Emergent *Xylella fastidiosa* Genotype in Italy to Isolates from Central America. *Phytopathology®.* 107:816–827.
- Gilbert, G. S., Magarey, R., Suiter, K., and Webb, C. O. 2012. Evolutionary tools for phytosanitary risk analysis: phylogenetic signal as a predictor of host range of plant pests and pathogens. *Evol. Appl.* 5:869–878.
- Gil-Salas, F. M., Peters, J., Boonham, N., Cuadrado, I. M., and Janssen, D. 2011. Yellowing Disease in Zucchini Squash Produced by Mixed Infections of Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucumber vein yellowing virus. *Phytopathology®.* 101:1365–1372.
- Giovanardi, D., Biondi, E., Ignjatov, M., Gašić, K., Ferrari, M., Perez, S., et al. 2015. Seed transmission of *Xanthomonas vesicatoria* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato and *Xanthomonas euvesicatoria* in pepper and implementation of seed disinfection methods. In 7th Congress on Plant Protection: Integrated Plant protection–A Knowledge-based Step towards Sustainable Agriculture, Forestry and Landscape Architecture, p. 24–28.
- Giovanardi, D., Bonneau, S., Gironde, S., Saux, M. F.-L., Manceau, C., and Stefani, E. 2016. Morphological and genotypic features of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* populations from walnut groves in Romagna region, Italy. 10.1007/s10658-015-0809-2
- Gironde, S., and Manceau, C. 2012. Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:3266–3279.
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., and Voloudakis, A. E. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis.* 75:834–838.
- Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007a. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:371–397.
- Gitaitis, R., and Walcott, R. 2007b. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45:371–397.
- Glaeser, S. P., and Kämpfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* 38:237–245.

- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Compant, S., Sessitsch, A., Katzir, N., Portnoy, V., et al. 2015. Characterization of endophytic bacteria from cucurbit fruits with potential benefits to agriculture in melons ( *Cucumis melo* L.) ed. Kornelia Smalla. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91:fiv074.
- Glassner, H., Zchori-Fein, E., Yaron, S., Sessitsch, A., Sauer, U., and Compant, S. 2018. Bacterial niches inside seeds of *Cucumis melo* L. *Plant Soil.* 422:101–113.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., et al. 1998. Auxin Production Is a Common Feature of Most Pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 11:156–162.
- Gnanamanickam, S., Starratt, A., and Ward, E. 2011. Coronatine production in vitro and in vivo and its relation to symptom development in bacterial blight of soybean. *Can. J. Bot.* 60:645–650.
- Gomila, M., Busquets, A., Mulet, M., García-Valdés, E., and Lalucat, J. 2017. Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis. *Front. Microbiol.* 8: 2422.
- Gong, L., Pachner, M., Kalai, K., and Lelley, T. 2008. SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita moschata* and its synteny with *Cucurbita pepo*. *Genome.* 51:878–887.
- González, A. J., and Ciordia, M. 2020. *Brenneria goodwinii* and *Gibbsiella quercinecans* isolated from weeping cankers on *Quercus robur* L. in Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 156:965–969.
- González, A. J., I, C., P, D. V., and Am, F.-S. 2013. *Pseudomonas asturiensis* sp. nov., isolated from soybean and weeds. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(5):320-4.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J. M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:81–91.
- GOTO, M. 1983. *Pseudomonas ficuserectae* sp. nov., the Causal Agent of Bacterial Leaf Spot of *Ficus erecta* Thunb. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 33:546–550.
- Gottsberger, R. A., and Huss, H. 2016. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing a soft rot on Styrian oil pumpkin in Austria. *New Dis. Rep.* 33:12. 10.5197/j.2044-0588.2016.033.012.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., and Dangl, J. L. 2006. Subterfuge and Manipulation: Type III Effector Proteins of Phytopathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:425–449.
- Green, S., Studholme, D. J., Laue, B. E., Dorati, F., Lovell, H., Arnold, D., et al. 2010. Comparative Genome Analysis Provides Insights into the Evolution and Adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLOS ONE.* 5:e10224.
- Greer, G., and Saunders, C. 2012. The costs of Psa-V to the New Zealand kiwifruit industry and the wider community. *Res. Rep. - Agribus. Amp Econ. Res. Unit Linc. Univ.* 35:3
- Grimault, V., Olivier, V., Rolland, M., Darrasse, A., and Jacques, M.-A. 2014. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean). *Int. Rules Seed Test.*:21.
- Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., et al. 2008. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature.* 452:755–758.
- Grondeau, C., Samson, R., and Sands, D. D. C. 1994. A Review of Thermoherapy to Free Plant Materials from Pathogens, Especially Seeds from Bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:57–75.

- Guilbaud, C., Morris, C. E., Barakat, M., Ortet, P., and Berge, O. 2016. Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* facilitated by a PCR targeting the whole *P. syringae* group ed. Wietse de Boer. FEMS Microbiol. Ecol. 92:fiv146.
- Guo, J., Xu, W., Hu, Y., Huang, J., Zhao, Y., Zhang, L., et al. 2020. Phylotranscriptomics in Cucurbitaceae Reveal Multiple Whole-Genome Duplications and Key Morphological and Molecular Innovations. Mol. Plant. 13:1117–1133.
- Hacquard, S., Spaepen, S., Garrido-Oter, R., and Schulze-Lefert, P. 2017. Interplay Between Innate Immunity and the Plant Microbiota. Annu. Rev. Phytopathol. 55:565–589.
- Haefele, D. M., and Lindow, S. E. 1987. Flagellar Motility Confers Epiphytic Fitness Advantages upon *Pseudomonas syringae*. Appl. Environ. Microbiol. 53:2528–2533.
- Hajri, A., Brin, C., Hunault, G., Lardeux, F., Lemaire, C., Manceau, C., et al. 2009. A «Repertoire for Repertoire» Hypothesis: Repertoires of Type Three Effectors are Candidate Determinants of Host Specificity in *Xanthomonas*. PLoS ONE. 4(8): e6632.
- Hall, S. J., Dry, I. B., Gopurenko, D., and Whitelaw-Weckert, M. A. 2019. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from cool climate Australian grapevine vineyards: new phylogroup PG02f associated with bacterial inflorescence rot. Plant Pathol. 68:312–322.
- Hammond-Kosack, K. E., and Jones, J. D. G. 1997. Plant disease resistance genes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48:575–607.
- Han, S., Jiang, N., Lv, Q., Kan, Y., Hao, J., Li, J., et al. 2018. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR. PLoS ONE. 3;13(5):e0196525.
- Hankin, L., and Sands, D. C. 1977. Microwave treatment of tobacco seed to eliminate bacteria on the seed surface. Phytopathology. 67:794.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., et al. 2015. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR. 79:293–320.
- Harighi, B. 2007. Angular Leaf Spot of Cucumber Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Kurdistan. Plant Dis. 91:769–769.
- Harris, J. M., Balint-Kurti, P., Bede, J. C., Day, B., Gold, S., Goss, E. M., et al. 2020. What are the Top 10 Unanswered Questions in Molecular Plant-Microbe Interactions? Mol. Plant-Microbe Interactions®. 33:1354–1365.
- Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. 2004. *Phytophthora capsici* on Vegetable Crops: Research Progress and Management Challenges. Plant Dis. 88:1292–1303.
- Haydon, D. 2002. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. Emerg. Infect. Dis. 8:1468–1473.
- He, R., Liu, P., Jia, B., Xue, S., Wang, X., Hu, J., et al. 2018. Genetic Diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Strains from Different Geographic Regions in China. Phytopathology®. 109:347–357.
- Heeb, S., and Haas, D. 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. Mol. Plant. Microbe Interact. 14:1351–1363.
- Helmann, T. C., Deutschbauer, A. M., and Lindow, S. E. 2019. Genome-wide identification of *Pseudomonas syringae* genes required for fitness during colonization of the leaf surface and apoplast. Proc. Natl. Acad. Sci. 116:18900–18910.
- Hemara, L. 2020. Identification of candidate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* effectors that trigger resistance in *Actinidia arguta*. 6(11): e27297.

- Heneidak, S., and Khalik, K. A. 2015. Seed coat diversity in some tribes of Cucurbitaceae: implications for taxonomy and species identification. *Acta Bot. Bras.* 29:129–142.
- Heredia-Ponce, Z., Gutiérrez-Barranquero, J. A., Purtschert-Montenegro, G., Eberl, L., Cazorla, F. M., and de Vicente, A. 2020. Biological role of EPS from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 extracellular matrix, focusing on a Psl-like polysaccharide. *Npj Biofilms Microbiomes.* 6:1–13.
- Hernandez, M. N., and Lindow, S. E. 2019. *Pseudomonas syringae* Increases Water Availability in Leaf Microenvironments via Production of Hygroscopic Syringafactin. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.01014-19
- Heywood, V. H. 1969. Scanning electron microscopy in the study of plant materials. *Micron* 1969. 1:1–14.
- Hilhorst, H. W. M. 2018. Definitions and Hypotheses of Seed Dormancy. In *Annual Plant Reviews online*, American Cancer Society, p. 50–71.
- Hirano, S. S., and Upper, C. D. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624–653.
- Hockett, K. L., Burch, A. Y., and Lindow, S. E. 2013. Thermo-Regulation of Genes Mediating Motility and Plant Interactions in *Pseudomonas syringae*. *PLOS ONE.* 8:e59850.
- Holeva, M. C., Karafla, C. D., Glynos, P. E., and Alivizatos, A. S. 2010. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece. *Plant Pathol.* 10.1111/j.1365-3059.2009.02246.x
- Hooper, L. V., and Gordon, J. I. 2001. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science.* 292:1115–1118.
- Hopkins, D. L., and Thompson, C. M. 2002. Seed Transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Cucurbits. *HortScience.* 37:924–926.
- Huang, F., Tang, J., He, L., Ding, X., Huang, S., Zhang, Y., et al. 2018. Heterologous expression and antitumor activity analysis of syringolin from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Microb. Cell Factories.* 17:31.
- Hulin, M. T., Jackson, R. W., Harrison, R. J., and Mansfield, J. W. 2020. Cherry picking by pseudomonads: After a century of research on canker, genomics provides insights into the evolution of pathogenicity towards stone fruits. *Plant Pathol.* :ppa.13189.
- Humair, B., González, N., Mossialos, D., Reimann, C., and Haas, D. 2009. Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *ISME J.* 3:955–965.
- Hung, N. B., Ramkumar, G., and Lee, Y. H. 2014. An effector gene *hopA1* influences on virulence, host specificity, and lifestyles of *Pseudomonas cichorii* JBC1. *Res. Microbiol.* 165:620–629.
- Huot, B., Castroverde, C. D. M., Velásquez, A. C., Hubbard, E., Pulman, J. A., Yao, J., et al. 2017. Dual impact of elevated temperature on plant defence and bacterial virulence in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 8:1808.
- Hutchison, M. L., Tester, M. A., and Gross, D. C. 1995. Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 8:610–620.
- Iacobellis, N. S., Collmer, A., Hutcheson, S. W., Mansfield, J. W., Morris, C. E., Murillo, J., et al. 2013. *Pseudomonas syringae* and related pathogens: Biology and Genetic. Springer Science & Business Media.

- Ikley, J. T. 2019. The Role of Alternative Hosts and Herbicides in the Management of *Clavibacter nebraskensis*, Causal Agent of Goss's wilt of Corn.
- Inglis, D., and Tymon, L. S. 2019. *Pseudomonas* diseases on cucurbits in Western Washington. Available at: <https://research.libraries.wsu.edu:8443/xmlui/handle/2376/16850> [Accessed December 23, 2019].
- International Code of Nomenclature of Prokaryotes. 2019. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 69:S1–S111.
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), IWGSC RefSeq principal investigators, Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., et al. 2018. Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*. 361.
- Irey, M., Gottwald, T., Graham, J., Riley, T., and Carlton, G. 2006. Post-hurricane Analysis of Citrus Canker Spread and Progress towards the Development of a Predictive Model to Estimate Disease Spread Due to Catastrophic Weather Events. *Plant Health Prog.* 10.1094/PHP-2006-0822-01-RS
- Islam, Md. R., Hossain, M. R., Kim, H.-T., Nath, U. K., Abuyusuf, Md., Jung, H.-J., et al. 2020. Molecular characterization of *Acidovorax citrulli* strain NIHHS15-280 causing bacterial fruit blotch disease in Korea and screening of resistance sources in melon. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 61:115–126.
- Ivanov, A. V., Safenkova, I. V., Drenova, N. V., Zherdev, A. V., and Dzantiev, B. B. 2020. Development of lateral flow assay combined with recombinase polymerase amplification for highly sensitive detection of *Dickeya solani*. *Mol. Cell. Probes.* 53:101622.
- Iwai, H., Usui, M., Hoshino, H., Kamada, H., Matsunaga, T., Kakegawa, K., et al. 2003. Analysis of Sugars in Squash Xylem Sap. *Plant Cell Physiol.* 44:582–587.
- Jacks, T. J., Hensarling, T. P., and Yatsu, L. Y. 1972. Cucurbit seeds: I. Characterizations and uses of oils and proteins. A review. *Econ. Bot.* 26:135–141.
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., et al. 2012. Phylogenetic Analysis and Polyphasic Characterization of *Clavibacter michiganensis* Strains Isolated from Tomato Seeds Reveal that Nonpathogenic Strains Are Distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8388–8402.
- Jacques, M.-A., Josi, K., Darrasse, A., and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* Is Aggregated in Stable Biofilm Population Sizes in the Phyllosphere of Field-Grown Beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2008–2015.
- Jajic, I., Sarna, T., and Strzalka, K. 2015. Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants.* 4:393–411.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., et al. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chin. Med. Assoc.* 81:7–11.
- Jamiolkowska, A., Wagner, A., and Sawicki, K. 2011. Fungi colonizing roots of zucchini (*Cucurbita pepo* L. var. *giromontina*) plants and pathogenicity of *Fusarium* spp. to zucchini seedlings. *Acta Agrobot.* 10.5586/aa.2011.009
- Janda, J. M., and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45:2761–2764.
- Janse, J. D., Rossi, P., Angelucci, L., Scortichini, M., Derks, J. H. J., Akkermans, A. D. L., et al. 1996. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov., the Bacterium Causing Canker of Hazelnut (*Corylus avellana* L.)). *Syst. Appl. Microbiol.* 19:589–595.

- Jarial, K., Jarial, R. S., and Gupta, S. K. 2015a. Bacterial spot (*Xanthomonas cucurbitae*) of cucurbits: a review. *NBU J Plant Sci.* 9:33–39.
- Jarial, K., Jarial, R., Sharma, D., Kumar, S., Dogra, B., Krishi, V., et al. 2015b. Strategy for the Management of Bacterial Spot of Bot tle Gourd Caused by *Xanthomonas cucurbitae* under Low Hill Condit ions of Himachal Pradesh. *Int. J. Oif Bioresour. Stress Manag.* 6:744–748.
- Jaton, K., and Greub, G. 2007. PCR en microbiologie : de l’amplification de l’ADN à l’interprétation du résultat. *Rev. Médicale Suisse.*
- Jeffrey, C. 1980. A review of the Cucurbitaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 81:233–247.
- Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Candresse, T., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., et al. 2018. Pest categorisation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *EFSA J.* 16:e05299.
- Jensen, B., Knudsen, I. M. B., Madsen, M., and Jensen, D. F. 2004. Biopriming of Infected Carrot Seed with an Antagonist, *Clonostachys rosea*, Selected for Control of Seedborne *Alternaria* spp. *Phytopathology®.* 94:551–560.
- Jiang, N., Lv, Q. Y., Xu, X., Cao, Y. S., Walcott, R. R., Li, J. Q., et al. 2016. Induction of the viable but nonculturable state in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and in planta resuscitation of the cells on tomato seedlings. *Plant Pathol.* 65:826–836.
- Jiang, N., Yan, J., Liang, Y., Shi, Y., He, Z., Wu, Y., et al. 2020. Resistance Genes and their Interactions with Bacterial Blight/Leaf Streak Pathogens (*Xanthomonas oryzae*) in Rice (*Oryza sativa* L.)—an Updated Review. *Rice.* 13:3.
- Johnson, N. 2014. Chapter 1 - A Short Introduction to Disease Emergence. In *The Role of Animals in Emerging Viral Diseases*, ed. Nicholas Johnson. Boston: Academic Press, p. 1–19.
- Johnston-Monje, D., and Raizada, M. N. 2011. Conservation and Diversity of Seed Associated Endophytes in *Zea* across Boundaries of Evolution, Ethnography and Ecology. *PLOS ONE.* 6:e20396.
- Jones, J. D. G., and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323–329.
- Juárez, M., Tovar, R., Fiallo-Olivé, E., Aranda, M. A., Gosálvez, B., Castillo, P., et al. 2013. First Detection of Tomato leaf curl New Delhi virus Infecting Zucchini in Spain. *Plant Dis.* 98:857–857.
- Jun, S.-H., Kim, T. G., and Ban, C. 2006. DNA mismatch repair system. *FEBS J.* 273:1609–1619.
- Kaluzna, M., Willems, A., Pothier, J. F., Ruinelli, M., Sobiczewski, P., and Pulawska, J. 2016. *Pseudomonas cerasi* sp nov (non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry. *Syst. Appl. Microbiol.* 39:370–377.
- Kan, Y., Jiang, N., Xu, X., Lyu, Q., Gopalakrishnan, V., Walcott, R., et al. 2019. Induction and Resuscitation of the Viable but Non-culturable (VBNC) State in *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops. *Front. Microbiol.* 10:1081.
- Kandasamy, S., Loganathan, K., Muthuraj, R., Duraisamy, S., Seetharaman, S., Thiruvengadam, R., et al. 2009. Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling. *Proteome Sci.* 7:47.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., and Ramasubbu, N. 2004. Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:2633–2636.
- Kates, H. R., Soltis, P. S., and Soltis, D. E. 2017. Evolutionary and domestication history of *Cucurbita* (pumpkin and squash) species inferred from 44 nuclear loci. *Mol. Phylogenet. Evol.* 111:98–109.



- Katis, N. I., Tsitsipis, J. A., Lykouressis, D. P., Papapanayotou, A., Margaritopoulos, J. T., Kokinis, G. M., et al. 2006. Transmission of Zucchini yellow mosaic virus by Colonizing and Non-colonizing Aphids in Greece and New Aphid Species Vectors of the Virus. *J. Phytopathol.* 154:293–302.
- Kaur, S. I., Kashyap, P. L., Kang, S. S., and Sharma, A. 2020. Detection and Diagnosis of Seed-Borne Viruses and Virus-Like Pathogens. In *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*, eds. Ravindra Kumar and Anuja Gupta. Singapore: Springer, p. 169–199.
- Kawaguchi, A., Abe, D., Saito, T., Nogata, Y., Nomiya, K., Kohyama, N., et al. 2021. Pink seed of barley caused by *Erwinia persicina*. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 106–109
- Kearns, D. B., and Losick, R. 2003. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49:581–590.
- Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., and Sundin, G. W. 2007. *Pseudomonas syringae* Diseases of Fruit Trees: Progress Toward Understanding and Control. *Plant Dis.* 91:4–17.
- Kerkoud, M., Manceau, C., and Paulin, J. P. 2002. Rapid Diagnosis of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, the Causal Agent of Blister Spot of Apple, by Polymerase Chain Reaction Using Specifically Designed hrpL Gene Primers. *Phytopathology.* 92:1077–1083.
- Kestring, D., Klein, J., de Menezes, L. C. C. R., and Rossi, M. N. 2009. Imbibition phases and germination response of *Mimosa bimucronata* (Fabaceae: Mimosoideae) to water submersion. *Aquat. Bot.* 91:105–109.
- Khan, M. R., Khan, S. M., and Mohiddin, F. A. 2004. Biological control of Fusarium wilt of chickpea through seed treatment with the commercial formulation of *Trichoderma harzianum* and/or *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathol. Mediterr.* 43:20–25.
- Khan, M., Seto, D., Subramaniam, R., and Desveaux, D. 2018. Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 93:651–663.
- Khoury, C. K., Carver, D., Kates, H. R., Achicanoy, H. A., Zonneveld, M. van, Thomas, E., et al. 2020. Distributions, conservation status, and abiotic stress tolerance potential of wild cucurbits (*Cucurbita* L.). *PLANTS PEOPLE PLANET.* 2:269–283.
- Kil, E.-J., Vo, T. T. B., Fadhila, C., Ho, P. T., Lal, A., Troiano, E., et al. 2020. Seed Transmission of Tomato Leaf Curl New Delhi Virus from Zucchini Squash in Italy. *Plants.* 9:563.
- Kim, K. W. 2019. Plant trichomes as microbial habitats and infection sites. *Eur. J. Plant Pathol.* 154:157–169.
- Kim, M., Oh, H.-S., Park, S.-C., and Chun, J. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:346–351.
- Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y.-N., Choi, C., and Lee, B.-H. 2012. Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin (*Cucurbitaceae*) species and parts. *Nutr. Res. Pract.* 6:21–27.
- King, E., Ward, M., and Raney, D. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.
- Klee, S. M., Sinn, J. P., Finley, M., Allman, E. L., Smith, P. B., Aimufua, O., et al. 2019. *Erwinia amylovora* Auxotrophic Mutant Exometabolomics and Virulence on Apples. *Appl. Environ. Microbiol.* 10.1128/AEM.00935-19
- Kocabiyik, H., Kayisoglu, B., and Tezer, D. 2009. Effect of Moisture Content on Thermal Properties of Pumpkin Seed. *Int. J. Food Prop.* 12:277–285.



- Kolb, D., and Müller, M. 2004. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* and histochemistry of glandular secretory products. *Ann. Bot.* 94:515–526.
- Konstantinidis, K. T., Ramette, A., and Tiedje, J. M. 2006. The bacterial species definition in the genomic era. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361:1929–1940.
- Kreft, M., Zorec, R., Janeš, D., and Kreft, S. 2009. Histolocalisation of the oil and pigments in the pumpkin seed. *Ann. Appl. Biol.* 154:413–418.
- Kubota, M., Hagiwara, N., and Shirakawa, T. 2012. Disinfection of Seeds of Cucurbit Crops Infested with *Acidovorax citrulli* with Dry Heat Treatment. *J. Phytopathol.* 160:364–368.
- Kubota, M., Hara, K., Hagiwara, N., and Shirakawa, T. 2013. Combined treatment with chemicals and dry heat to disinfect cucurbit seeds after infestation with *Acidovorax citrulli*. *Jpn. J. Phytopathol.* 79:92–98.
- Kumar, A., Zhimo, Y., Biasi, A., Salim, S., Feygenberg, O., Wisniewski, M., et al. 2021. Endophytic Microbiome in the Carposphere and Its Importance in Fruit Physiology and Pathology. In *Postharvest Pathology: Next Generation Solutions to Reducing Losses and Enhancing Safety, Plant Pathology in the 21st Century*, eds. Davide Spadaro, Samir Droby, and Maria Lodovica Gullino. Cham: Springer International Publishing, p. 73–88.
- Kumar, R., Gupta, A., Srivastava, S., Devi, G., Singh, V. K., Goswami, S. K., et al. 2020. Diagnosis and Detection of Seed-Borne Fungal Phytopathogens. In *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*, eds. Ravindra Kumar and Anuja Gupta. Singapore: Springer, p. 107–142.
- Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A., Smoot, M. E., Shumway, M., Antonescu, C., et al. 2003. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 5:R12
- Kwon, J. Y., Hong, J. S., Kim, M. J., Choi, S. H., Min, B. E., Song, E. G., et al. 2014. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses. *J. Virol. Methods.* 206:133–139.
- Laala, S., Bouznad, Z., and Manceau, C. 2015. Development of a new technique to detect living cells of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in crucifers seeds: the seed-qPCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 141:637–646.
- Lacault, C., Briand, M., Jacques, M.-A., and Darrasse, A. 2020. Zucchini vein clearing disease is caused by several lineages within *Pseudomonas syringae* species complex. *Phytopathology.* 110(4):744-757
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., and García-Valdés, E. 2020. Genomics in Bacterial Taxonomy: Impact on the Genus *Pseudomonas*. *Genes.* 11:139.
- Lamey, H. A. 1991. *Disease Management In Home-Grown Cucumbers, Melons and Squash.*
- Lamichhane, J. R., Messéan, A., and Morris, C. E. 2015. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:331–350.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., and Balestra, G. M. 2010. Bacterial leaf spot caused by *Xanthomonas cucurbitae* newly reported on pumpkin in Nepal. *New Dis. Rep.* 22:20–20.
- Lamichhane, J. R., Varvaro, L., Parisi, L., and Morris, C. E. 2014. Disease and Frost Damage of Woody Plants Caused by *Pseudomonas syringae*: Seeing the Forest for the Trees. *Adv. Agron.* 126:235-295
- Langston, D. B., Walcott, R. D., Gitaitis, R. D., and Sanders, F. H. 1999. First Report of a Fruit Rot of Pumpkin Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. *Plant Dis.* 83:199–199.

- Lassalle, F., Campillo, T., Vial, L., Baude, J., Costechareyre, D., Chapulliot, D., et al. 2011. Genomic Species Are Ecological Species as Revealed by Comparative Genomics in *Agrobacterium tumefaciens*. *Genome Biol. Evol.* 3:762–781.
- Leach, J. E., Triplett, L. R., Argueso, C. T., and Trivedi, P. 2017. Communication in the Phytobiome. *Cell.* 169:587–596.
- Lee, C., Lee, H.-H., Manna, M., Kim, N., Park, J., Kim, J., et al. 2018. Genomics-based Sensitive and Specific Novel Primers for Simultaneous Detection of *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* in Rice Seeds. *Plant Pathol. J.* 34:490–498.
- Lee, D.-H., Mathur, S. B., and Neergaard, P. 1984. Detection and Location of Seed-Borne Inoculum of *Didymella bryoniae* and its Transmission in Seedlings of Cucumber and Pumpkin. *J. Phytopathol.* 109:301–308.
- Lee, I., Ouk Kim, Y., Park, S.-C., and Chun, J. 2016. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66:1100–1103.
- Leff, J. W., and Fierer, N. 2013. Bacterial Communities Associated with the Surfaces of Fresh Fruits and Vegetables. *PLOS ONE.* 8:e59310.
- Lelley, T., Loy, J., and Murkovic, M. 2009. Hull-Less Oil Seed Pumpkin. In , p. 469–492.
- Lelliott, R. A., Billing, E., and Hayward, A. C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Microbiol.* 29:470–489.
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal. *Plant Dis.* 95:1328–1338.
- Li, H., Schenk, A., Srivastava, A., Zhurina, D., and Ullrich, M. S. 2006. Thermo-responsive expression and differential secretion of the extracellular enzyme levansucrase in the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:178–185.
- Lindgren, P., Peet, R., and Panopoulos, N. 1986. Gene-Cluster of *Pseudomonas-Syringae* Pv *Phaseolicola* Controls Pathogenicity of Bean-Plants and Hypersensitivity on Nonhost Plants. *J. Bacteriol.* 168:512–522.
- Lindow, S. E. 1982. Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants'. *Plant Physiol.* 70:1084–1089.
- Lindow, S. E., and Brandl, M. T. 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1875–1883.
- Lindow, S. E., and Suslow, T. V. 2003. Temporal Dynamics of the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* Strain A506 in Flowers in Inoculated Pear Trees. *Phytopathology®.* 93:727–737.
- Ling, K.-S., Wechter, W. P., Somai, B. M., Walcott, R. R., and Keinath, A. P. 2010. An improved real-time PCR system for broad-spectrum detection of *Didymella bryoniae*, the causal agent of gummy stem blight of cucurbits. *Seed Sci. Technol.* 38:692–703.
- Liu, Z. X., Dong, A. R., Jia, H. Q., Zhou, Y., Liu, X. F., and Zhang, X. Y. 2019. First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Leaf Blight on *Hosta ventricosa* in China. *Plant Dis.* 103:2123.
- Llop, P., Bonaterra, A., Peñalver, J., and López, M. M. 2000. Development of a Highly Sensitive Nested-PCR Procedure Using a Single Closed Tube for Detection of *Erwinia amylovorain* Asymptomatic Plant Material. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2071–2078.
- Lo Cantore, P., Shanmugaiah, V., and Iacobellis, N. S. 2009. Antibacterial Activity of Essential Oil Components and Their Potential Use in Seed Disinfection. *J. Agric. Food Chem.* 57:9454–9461.

- Loconsole, G., Potere, O., Boscia, D., Altamura, G., Djelouah, K., Elbeaino, T., et al. 2014. Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *J. Plant Pathol.* 96:7–14.
- Loewe, L., and Hill, W. G. 2010. The population genetics of mutations: good, bad and indifferent. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365:1153–1167.
- Lovic, B. R., and Hopkins, D. L. 2003. Production Steps to Reduce Seed Contamination by Pathogens of Cucurbits. *HortTechnology.* 13:50–54.
- Lu, Y., Zhang, H., Zhao, Z., Wen, C., Wu, P., Song, S., et al. 2020. Application of droplet digital PCR in detection of seed-transmitted pathogen *Acidovorax citrulli*. *J. Integr. Agric.* 19:561–569.
- Lust, T. A., and Paris, H. S. 2016. Italian horticultural and culinary records of summer squash (*Cucurbita pepo*, Cucurbitaceae) and emergence of the zucchini in 19th-century Milan. *Ann. Bot.* 118:53–69.
- Macho, A. P., and Zipfel, C. 2015. Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr. Opin. Microbiol.* 23:14–22.
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., et al. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:3140–3145.
- Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M.-M., and Caldwell, D. R. 1974. Ice Nucleation Induced by *Pseudomonas syringae* 1. *Appl. Microbiol.* 28:456–459.
- Manceau, C., Gironde, S., Briand, B., and Lybeert, H. 2011. Moyens et methodes de detection et d'identification d'une nouvelle bacterie responsable d'affections phytosanitaires sur des plantes (courgettes) et nouvelles plantes resistantes. WO2011003984.
- Mancini, V., Murolo, S., and Romanazzi, G. 2016. Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathol.* 65:691–703.
- Manirajan, B. A., Ratering, S., Rusch, V., Schwiertz, A., Geissler-Plaum, R., Cardinale, M., et al. 2016. Bacterial microbiota associated with flower pollen is influenced by pollination type, and shows a high degree of diversity and species-specificity. *Environ. Microbiol.* 18:5161–5174.
- Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., and Morisaki, H. 2006. Culturable Surface and Endophytic Bacterial Flora of the Maturing Seeds of Rice Plants (*Oryza sativa*) Cultivated in a Paddy Field. *Microbes Environ.* 21:86–100.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:614–629.
- Mansour, A., and Al-Musa, A. 1993. Cucumber Vein Yellowing Virus; Host Range and Virus Vector Relationships. *J. Phytopathol.* 137:73–78.
- Mao, W., Lewis, J. A., Hebbar, P. K., and Lumsden, R. D. 1997. Seed Treatment with a Fungal or a Bacterial Antagonist for Reducing Corn Damping-off Caused by Species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 81:450–454.
- Martin, H. L., and Horlock, C. M. 2002. First Report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a Pathogen of Gramma in Australia. *Plant Dis.* 86:1406–1406.
- Martins, S. J., Medeiros, F. H. V., Lakshmanan, V., and Bais, H. P. 2018. Impact of Seed Exudates on Growth and Biofilm Formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in Common Bean. *Front. Microbiol.* 8: 2631.
- Martín-Sanz, A., Vega, M. P. de la, Murillo, J., and Caminero, C. 2012. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *psis* strains. *Plant Pathol.* 61:1063–1072.

- Matuszewska, M., Murray, G. G. R., Harrison, E. M., Holmes, M. A., and Weinert, L. A. 2020. The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 28:465–477.
- Maude, R. B. 1996. Seedborne diseases and their control.
- Mauri, S., Cellini, A., Buriani, G., Donati, I., Costa, G., and Spinelli, F. 2016. Optimization of cultural practices to reduce the development of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, causal agent of the bacterial canker of kiwifruit. *J. Berry Res.* 6:355–371.
- Maury, Y., Duby, C., Bossennec, J.-M., and Boudazin, G. 1986. Group analysis using ELISA: determination of the level of transmission of soybean mosaic virus in soybean seed. *Agronomie.* 5:405–415.
- Maynard, L. 2007. Cucurbit crop growth and development. In University of Purdue Conference Proceedings, Indiana, United States of America.
- Mayr, E. 1943. Systematics and the origin of Species : from the Viewpoint of a Zoologist. *Nature.* 151:347–348.
- Mazzaglia, A., Studholme, D. J., Taratufolo, M. C., Cai, R., Almeida, N. F., Goodman, T., et al. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage. *PLoS One.* 7:e36518.
- McCann, H. C. 2020. Skirmish or war: the emergence of agricultural plant pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 56:147–152.
- McDonald, B. A., and Linde, C. 2002. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica.* 124:163–180.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., and Jones, A. L. 2002. Antibiotic Use in Plant Agriculture. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:443–465.
- Mehl, H. L., and Epstein, L. 2007. Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Race 1 and Race 2 with PCR and Production of Disease-Free Pumpkin Seeds. *Plant Dis.* 91:1288–1292.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S. Y. 2006. Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell.* 126:969–980.
- Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P. R., and He, S. Y. 2017. Stomatal Defense a Decade Later1[OPEN]. *Plant Physiol.* 174:561–571.
- Meng, X., Chai, A., Chen, L., Shi, Y., Xie, X., Ma, Z., et al. 2016. Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. *Can. J. Plant Pathol.* 38:296–306.
- Meng, X. Q., Umesh, K. C., Davis, R. M., and Gilbertson, R. L. 2004. Development of PCR-Based Assays for Detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the Carrot Bacterial Leaf Blight Pathogen, from Different Substrates. *Plant Dis.* 88:1226–1234.
- Mensi, I., Jabnoun-Khiareddine, H., Zarrougui, N. E., Zahra, H. B., Cesbron, S., Jacques, M. A., et al. 2018. First report of tomato bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tunisia. 91(4):462.
- Mercier, J., and Lindow, S. E. 2000. Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:369–374.
- Mhedbi-Hajri, N., Hajri, A., Boureau, T., Darrasse, A., Durand, K., Brin, C., et al. 2013. Evolutionary History of the Plant Pathogenic Bacterium *Xanthomonas axonopodis*. *PLOS ONE.* 8:e58474.

- Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., Crabill, E., Kaschani, F., Niessen, S., Shindo, T., et al. 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* uses proteasome inhibitor syringolin A to colonize from wound infection sites. *PLoS Pathog.* 9:e1003281.
- Misas-Villamil, J. C., Kolodziejek, I., and Hoorn, R. A. L. van der. 2011. *Pseudomonas syringae* colonizes distant tissues in *Nicotiana benthamiana* through xylem vessels. *Plant J.* 67:774–782.
- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., Flavell, R., Compant, S., Antonielli, L., Petric, A., et al. 2017. A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. *Front. Microbiol.* 23;8:11
- Mock, N. M., Baker, C. J., and Aver'yanov, A. A. 2015. Induction of a viable but not culturable (VBNC) state in some *Pseudomonas syringae* pathovars upon exposure to oxidation of an apoplastic phenolic, acetosyringone. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 89:16–24.
- Mohammadi, M., Burbank, L., and Roper, M. C. 2012. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* produces an endoglucanase that is required for full virulence in sweet corn. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 25:463–470.
- Monier, J.-M., and Lindow, S. E. 2004. Frequency, Size, and Localization of Bacterial Aggregates on Bean Leaf Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:346–355.
- Monteil, C. L., Bardin, M., and Morris, C. E. 2014a. Features of air masses associated with the deposition of *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by rain and snowfall. *ISME J.* 8:2290.
- Monteil, C. L., Cai, R., Liu, H., Mechan Llontop, M. E., Leman, S., Studholme, D. J., et al. 2013. Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens. *New Phytol.* 199:800–811.
- Monteil, C. L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C. E. 2012. Emigration of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from leaf litter contributes to its population dynamics in alpine snowpack: *P. syringae* in snowpack. *Environ. Microbiol.* 14:2099–2112.
- Monteil, C. L., Lafolie, F., Laurent, J., Clement, J.-C., Simler, R., Travi, Y., et al. 2014c. Soil water flow is a source of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in subalpine headwaters: *P. syringae* percolation through soil. *Environ. Microbiol.* 16:2038–2052.
- Monteil, C. L., Yahara, K., Studholme, D. J., Mageiros, L., Méric, G., Swingle, B., et al. 2016. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microb. Genomics.* 21;2(10):e000089.
- Montero-Pau, J., Blanca, J., Bombarely, A., Ziarsolo, P., Esteras, C., Martí-Gómez, C., et al. 2018. De novo assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus. *Plant Biotechnol. J.* 16:1161–1171.
- Moore, E. R. B., Mau, M., Arnscheidt, A., Böttger, E. C., Hutson, R. A., Collins, M. D., et al. 1996. The Determination and Comparison of the 16S rRNA Gene Sequences of Species of the Genus *Pseudomonas* (sensu stricto and Estimation of the Natural Intrageneric Relationships. *Syst. Appl. Microbiol.* 19:478–492.
- Moraes, A. J. G., Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Silva, A. M. F., Lima, N. B., Peixoto, A. R., et al. 2016. First Report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* Causing Soft Rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. *Plant Dis.* 101:379.
- Morens, D. M., Folkers, G. K., and Fauci, A. S. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* 430:242–249.
- Morris, C. E., Glaux, C., Latour, X., Gardan, L., Samson, R., and Pitrat, M. 2000. The Relationship of Host Range, Physiology, and Genotype to Virulence on Cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from Cantaloupe Blight Epidemics in France. *Phytopathology.* 90:636–646.

- Morris, C. E., Kinkel, L. L., Xiao, K., Prior, P., and Sands, D. C. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect. Genet. Evol.* 7:84–92.
- Morris, C. E., Lamichhane, J. R., Nikolic, I., Stanković, S., and Moury, B. 2019. The overlapping continuum of host range among strains in the *Pseudomonas syringae* complex. 1:4, 16 p.
- Morris, C. E., Monier, J.-M., and Jacques, M.-A. 1997. Methods for Observing Microbial Biofilms Directly on Leaf Surfaces and Recovering Them for Isolation of Culturable Microorganisms. *V63(4)*.
- Morris, C. E., Monteil, C. L., and Berge, O. 2013. The Life History of *Pseudomonas syringae*: Linking Agriculture to Earth System Processes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:85–104.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vanneste, J. L., Montarry, J., Oakley, B., Guilbaud, C., et al. 2010. Inferring the Evolutionary History of the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* from Its Biogeography in Headwaters of Rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio.* 1:e00107-10.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Vinatzer, B. A., Glaux, C., Guilbaud, C., Buffière, A., et al. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J.* 2:321–334.
- Morris, C., Georgakopoulos, D., and Sands, D. 2004. Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J. Phys. IV Proc.* 121:87–103.
- Morris, M. M., Frixione, N. J., Burkert, A. C., Dinsdale, A., and Vannette, R. L. 2020. Microbial abundance, composition, and function in nectar are shaped by flower visitor identity.:15.
- Morrison, R. H. 1999. Sampling in Seed Health Testing. *Phytopathology®.* 89:1084–1087.
- Moumni, M., Allagui, M. B., Mancini, V., Murolo, S., Tarchoun, N., and Romanazzi, G. 2019. Morphological and Molecular Identification of Seedborne Fungi in Squash (*Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata*). *Plant Dis.* 104:1335–1350.
- Muedi, H. T. H., Fourie, D., and McLaren, N. W. 2015. Distribution and severity of bacterial brown spot on dry beans in South Africa: an update. *South Afr. J. Sci.* 111:1–6.
- Mulet, M., Lalucat, J., and Garcia-Valdes, E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol.* 12:1513–1530.
- Munkvold, K. R., Russell, A. B., Kvitko, B. H., and Collmer, A. 2009. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 type III effector HopAA1-1 functions redundantly with chlorosis-promoting factor PSPTO4723 to produce bacterial speck lesions in host tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 22:1341–1355.
- Murovec, J., Drašlar, K., and Bohanec, B. 2012. Detailed analysis of *Cucurbita pepo* seed coat types and structures with scanning electron microscopy. *Botany.* 90:1161–1169.
- Murray, T. D., Schroeder, B. K., Schneider, W. L., Luster, D. G., Sechler, A., Rogers, E. E., et al. 2017. *Rathayibacter toxicus*, Other *Rathayibacter* Species Inducing Bacterial Head Blight of Grasses, and the Potential for Livestock Poisonings. *Phytopathology®.* 107:804–815.
- Nakashima, T., Wada, H., Morita, S., Erra-Balsells, R., Hiraoka, K., and Nonami, H. 2016. Single-Cell Metabolite Profiling of Stalk and Glandular Cells of Intact Trichomes with Internal Electrode Capillary Pressure Probe Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 88:3049–3057.
- Neetoo, H., Pizzolato, T., and Chen, H. 2009. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from Alfalfa Seeds through a Combination of High Hydrostatic Pressure and Mild Heat. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1901–1907.



- Nega, E., Ulrich, R., Werner, S., and Jahn, M. 2003. Hot water treatment of vegetable seed - An alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming. *J Plant Prot.* 110 (3), pp. 220-234.
- Nelson, E. B. 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:271-309.
- Nepi, M., and Pacini, E. 1993. Pollination, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Cucurbita pepo*. *Ann. Bot.* 72:527-536.
- Nerson, H. 2007. Seed production and germinability of cucurbit crops. *Seed Sci. Biotechnol.* 1:1-10.
- Newberry, E. A., Babu, B., Roberts, P. D., Dufault, N. S., Goss, E. M., Jones, J. B., et al. 2017a. Molecular Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon and Squash in Florida. *Plant Dis.* 102:511-518.
- Newberry, E. A., Ebrahim, M., Timilsina, S., Zlatković, N., Obradović, A., Bull, C. T., et al. 2019. Inference of Convergent Gene Acquisition Among *Pseudomonas syringae* Strains Isolated From Watermelon, Cantaloupe, and Squash. *Front. Microbiol.* 10:270.
- Newberry, E. A., Jardini, T. M., Rubio, I., Roberts, P. D., Babu, B., Koike, S. T., et al. 2016a. Angular Leaf Spot of Cucurbits is Associated With Genetically Diverse *Pseudomonas syringae* Strains. *Plant Dis.* 100:1397-1404.
- Newberry, E. A., Paret, M. L., Jones, J. B., and Bost, S. C. 2016b. First Report of Leaf Spot of Pumpkin Caused by *Pseudomonas cichorii* in Tennessee. *Plant Dis.* 100:2159.
- Newberry, E. A., Ritchie, L., Babu, B., Sanchez, T., Beckham, K. A., Jones, J. B., et al. 2017b. Epidemiology and management of bacterial leaf spot on watermelon caused by *Pseudomonas syringae*. *Plant Dis.* 101:1222-1229.
- Nikolić, I., Berić, T., Dimkić, I., Popović, T., Lozo, J., Fira, D., et al. 2019. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains. *J. Appl. Microbiol.* 126:165-176.
- Nikolić, I., Stanković, S., Dimkić, I., Berić, T., Stojšin, V., Janse, J., et al. 2018. Genetic diversity and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* isolated from sugar beet. *Plant Pathol.* 67:1194-1207.
- Nocker, A., Cheung, C.-Y., and Camper, A. K. 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods.* 67:310-320.
- Nogales, J., Vargas, P., Farias, G. A., Olmedilla, A., Sanjuán, J., and Gallegos, M.-T. 2015. FleQ Coordinates Flagellum-Dependent and -Independent Motilities in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:7533-7545.
- Nüske, J., and Fritsche, W. 1989. Phaseolotoxin production by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: the influence of temperature. *J. Basic Microbiol.* 29:441-447.
- O'Brien, R. D., and Lindow, S. E. 1988. Effect of Plant Species and Environmental Conditions on Ice Nucleation Activity of *Pseudomonas syringae* on Leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2281-2286.
- Ocimati, W., Were, E., Groot, J. C. J., Tittonell, P., Nakato, G. V., and Blomme, G. 2018. Risks Posed by Intercrops and Weeds as Alternative Hosts to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* in Banana Fields. *Front. Plant Sci.* 9: 1471.
- Ogimi, C. (Ryukyu U. 1977. Studies on bacterial gall of Chinaberry (*Melia Azedarach* Lin.), caused by *Pseudomonas meliae* n. sp. *Sci. Bull. Coll. Agric. - Univ. Ryukyu Jpn.*



- Oliver, J. D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* Seoul Korea. 43 Spec No:93–100.
- OMS. 2020. Résistance aux antibiotiques. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> [Accessed January 25, 2021].
- Ordax, M., Marco-Noales, E., López, M. M., and Biosca, E. G. 2006. Survival Strategy of *Erwinia amylovora* against Copper: Induction of the Viable-but-Nonculturable State. *Appl. Environ. Microbiol.* :3482–3488.
- Orfanidou, C. G., Malandraki, I., Beris, D., Kektsidou, O., Vassilakos, N., Varveri, C., et al. 2019. First report of tomato leaf curl New Delhi virus in zucchini crops in Greece. 101, page 799.
- Oulghazi, S., Sarfraz, S., Zaczek-Moczydłowska, M. A., Khayi, S., Ed-Dra, A., Lekbach, Y., et al. 2021. *Pectobacterium brasiliense*: Genomics, Host Range and Disease Management. *Microorganisms.* 9:106.
- Padmanabhan, C., Zhang, X., and Jin, H. 2009. Host small RNAs are big contributors to plant innate immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12:465–472.
- Pal, N., Block, C. C., and Gardner, C. A. C. 2019. A Real-Time PCR Differentiating *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* From *P. stewartii* subsp. *indologenes* in Corn Seed. *Plant Dis.* 103:1474–1486.
- Palkovics, L., Petróczy, M., Kertész, B., Németh, J., Bársony, Cs., Mike, Zs., et al. 2008. First Report of Bacterial Fruit Blotch of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Hungary. *Plant Dis.* 92:834–834.
- Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopoulou, R., and Doudoroff, M. 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 23:333–339.
- Panchal, S., Chitrakar, R., Thompson, B. K., Obulareddy, N., Roy, D., Hambright, W. S., et al. 2016. Regulation of Stomatal Defense by Air Relative Humidity. *Plant Physiol.* 172:2021–2032.
- Paris, H. S. 2001. History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. *Hortic. Rev.-WESTPORT THEN N. Y.-.* 25:71–170.
- Paris, H. S. 1996. Summer Squash: History, Diversity, and Distribution. *HortTechnology.* 6:6–13.
- Paris, H. S., Doron-Faigenboim, A., Reddy, U. K., Donahoo, R., and Levi, A. 2015. Genetic relationships in *Cucurbita pepo* (pumpkin, squash, gourd) as viewed with high frequency oligonucleotide-targeting active gene (HFO-TAG) markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 62:1095–1111.
- Paris, H. S., Yonash, N., Portnoy, V., Mozes-Daube, N., Tzuri, G., and Katzir, N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (*Cucurbitaceae*) using DNA markers. *Theor Appl Genet.* 106:971–978.
- Parisi, L., Morgaint, B., Blanco-Garcia, J., Guilbaud, C., Chandeysson, C., Bourgeay, J. F., et al. 2019. Bacteria from four phylogroups of the *Pseudomonas syringae* complex can cause bacterial canker of apricot. *Plant Pathol.* 68:1249–1258.
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Chaumeil, P.-A., Rinke, C., Mussig, A. J., and Hugenholtz, P. 2020. A complete domain-to-species taxonomy for Bacteria and Archaea. *Nat. Biotechnol.* 38:1079–1086.
- Pattemore, D. E., Goodwin, R. M., McBrydie, H. M., Hoyte, S. M., and Vanneste, J. L. 2014. Evidence of the role of honey bees (*Apis mellifera*) as vectors of the bacterial plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Australas. Plant Pathol.* 43:571–575.

- Peňázová, E., Dvořák, M., Ragasová, L., Kiss, T., Pečenka, J., and Čechová, J. 2020. Multiplex real-time PCR for the detection of *Clavibacter Michiganensis*. 15(1):e0227559.
- Pengnoo, A., Wiwattanapattapee, R., Chumthong, A., and Kanjanamaneesathian, M. 2006. Bacterial Antagonist as Seed Treatment to Control Leaf Blight Disease of Bambara Groundnut (*Vigna subterranea*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22:9–14.
- Pérez-Hernández, A., Porcel-Rodríguez, E., and Gómez-Vázquez, J. 2017. Survival of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* and Fungicide Application, Soil Solarization, and Biosolarization for Control of Crown and Foot Rot of Zucchini Squash. *Plant Dis.* 101:1507–1514.
- Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., and Smart, C. D. 2020. Bacterial canker of tomato: revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Dis.* 0.1094/PDIS-08-20-1732-FE.
- Pieretti, I., Pesic, A., Petras, D., Royer, M., Süssmuth, R. D., and Cociancich, S. 2015. What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? *Front. Plant Sci.* 6: 289.
- Pietsch, R. B., Vinatzer, B. A., and Schmale, D. G. I. 2017. Diversity and Abundance of Ice Nucleating Strains of *Pseudomonas syringae* in a Freshwater Lake in Virginia, USA. *Front. Microbiol.* 8: 318.
- Pinheiro, L. A. M., Pereira, C., Barreal, M. E., Gallego, P. P., Balcão, V. M., and Almeida, A. 2020. Use of phage  $\phi 6$  to inactivate *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants: in vitro and ex vivo experiments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104:1319–1330.
- Pinheiro, L. A. M., Pereira, C., Frazão, C., Balcão, V. M., and Almeida, A. 2019. Efficiency of Phage  $\phi 6$  for Biocontrol of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: An in Vitro Preliminary Study. *Microorganisms.* 7:286.
- Polz, M. F., Alm, E. J., and Hanage, W. P. 2013. Horizontal Gene Transfer and the Evolution of Bacterial and Archaeal Population Structure. *Trends Genet. TIG.* 29:170–175.
- Prado, A., Marolleau, B., Vaissière, B. E., Barret, M., and Torres-Cortes, G. 2020. Insect pollination: an ecological process involved in the assembly of the seed microbiota. *Sci. Rep.* 10:3575.
- Preston, G. M. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol. Plant Pathol.* 1:263–275.
- Pruvost, O., Magne, M., Boyer, K., Leduc, A., Tourterel, C., Drevet, C., et al. 2014. A MLVA Genotyping Scheme for Global Surveillance of the Citrus Pathogen *Xanthomonas citri* pv. *citri* Suggests a Worldwide Geographical Expansion of a Single Genetic Lineage ed. Boris Alexander Vinatzer. *PLoS ONE.* 9:e98129.
- Pruvost, O., Robène-Soustrade, I., Ah-You, N., Jouen, E., Boyer, C., Waller, F., et al. 2008. First Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Pumpkin on Réunion Island. *Plant Dis.* 92:1591–1591.
- Pruvost, O., Robène-Soustrade, I., Ah-You, N., Jouen, E., Boyer, C., Wuster, G., et al. 2009. First Report of *Xanthomonas cucurbitae* Causing Bacterial Leaf Spot of Watermelon in the Seychelles. *Plant Dis.* 93:671–671.
- Psallidas, P. G., PG, P., and CG, P. 1975. A new bacteriosis of almond caused by *Pseudomonas amygdali* sp. nov.
- Purahong, W., Orrù, L., Donati, I., Perpetuini, G., Cellini, A., Lamontanara, A., et al. 2018. Plant Microbiome and Its Link to Plant Health: Host Species, Organs and *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Infection Shaping Bacterial Phyllosphere Communities of Kiwifruit Plants. *Front. Plant Sci.* 9: 1563.

- Quibod, I. L., Atieza-Grande, G., Oreiro, E. G., Palmos, D., Nguyen, M. H., Coronejo, S. T., et al. 2020. The Green Revolution shaped the population structure of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *ISME J.* 14:492–505.
- Radwan, D. E. M., Fayez, K. A., Younis Mahmoud, S., Hamad, A., and Lu, G. 2007. Physiological and metabolic changes of *Cucurbita pepo* leaves in response to zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) infection and salicylic acid treatments. *Plant Physiol. Biochem.* 45:480–489.
- Rajkowski, K. T., and Thayer, D. W. 2001. Alfalfa Seed Germination and Yield Ratio and Alfalfa Sprout Microbial Keeping Quality Following Irradiation of Seeds and Sprouts†. *J. Food Prot.* 64:1988–1995.
- Ramel, C., Baechler, N., Hildbrand, M., Meyer, M., Schädeli, D., and Dudler, R. 2012. Regulation of biosynthesis of syringolin A, a *Pseudomonas syringae* virulence factor targeting the host proteasome. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 25:1198–1208.
- Ramey, B. E., Koutsoudis, M., Bodman, S. B. von, and Fuqua, C. 2004. Biofilm formation in plant–microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:602–609.
- Rasul, G., Mirza, M. S., Latif, F., and Malik, K. A. 1998. Identification of plant growth hormones produced by bacterial isolates from rice, wheat and kallar grass. In *Nitrogen Fixation with Non-Legumes: Proceedings of the 7th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, held 16–21 October 1996 in Faisalabad, Pakistan, Developments in Plant and Soil Sciences*, eds. Kauser A. Malik, M. Sajjad Mirza, and J. K. Ladha. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 25–37.
- Ravindran, A., Jalan, N., Yuan, J. S., Wang, N., and Gross, D. C. 2015. Comparative genomics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains B301D and HS191 and insights into intrapathovar traits associated with plant pathogenesis. *MicrobiologyOpen.* 4:553–573.
- Reina, L. D., Fleming, H. P., and Breidt, F., JR. 2002. Bacterial Contamination of Cucumber Fruit through Adhesion†,‡. *J. Food Prot.* 65:1881–1887.
- Renner, S. S., and Schaefer, H. 2016. Phylogeny and Evolution of the Cucurbitaceae. pp13–23.
- Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., et al. 2012. *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24:3823–3837.
- Revich, B., Tokarevich, N., and Parkinson, A. J. 2012. Climate change and zoonotic infections in the Russian Arctic. *Int. J. Circumpolar Health.* 23;71:18792.
- Rico, A., and Preston, G. M. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 21:269–282.
- Riedy, M. C., Muirhead, K. A., Jensen, C. P., and Stewart, C. C. 1991. Use of a photolabeling technique to identify nonviable cells in fixed homologous or heterologous cell populations. *Cytometry.* 12:133–139.
- Riffaud, C. M.-H., Glaux, C., Guilbaud, C., Prior, P., Morris, C. E., and Dominguez, H. 2003. Epidemiological Clues for Developing Methods of Control of Bacterial Blight of Cantaloupe Caused by Bacterial Blight of Cantaloupe Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *aptata*. pp3–15.
- Riffaud, C.-H., and Morris, C. E. 2002. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony-staining. *Eur. J. Plant Pathol.* 108:539–545.
- Robbs, C. F. 1956. Uma nova doença bacteriana do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Rev. Soc. Bras. Agron.* 12:73–76.

- Robène-Soustrade, I., Laurent, P., Gagnevin, L., Jouen, E., and Pruvost, O. 2006. Specific Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in Anthurium (*Anthurium andreaeanum*) Tissues by Nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1072–1078.
- Roberts, S. J. 1997. Effect of weather conditions on local spread and infection by pea bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*). *Eur. J. Plant Pathol.* 103:711–719.
- Rojas, E. S., Batzer, J. C., Beattie, G. A., Fleischer, S. J., Shapiro, L. R., Williams, M. A., et al. 2015. Bacterial Wilt of Cucurbits: Resurrecting a Classic Pathosystem. *Plant Dis.* 99:564–574.
- Romanchuk, A., Jones, C. D., Karkare, K., Moore, A., Smith, B. A., Jones, C., et al. 2014. Bigger is not always better: Transmission and fitness burden of ~1MB *Pseudomonas syringae* megaplasmid pMPPla107. *Plasmid.* 73:16–25.
- Roossinck, M. J. 2019. Viruses in the phytobiome. *Curr. Opin. Virol.* 37:72–76.
- Roper, M. C. 2011. *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol. Plant Pathol.* 12:628–637.
- Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M., and Kirkpatrick, B. C. 2007. *Xylella fastidiosa* Requires Polygalacturonase for Colonization and Pathogenicity in *Vitis vinifera* Grapevines. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 20:411–419.
- Rossez, Y., Holmes, A., Wolfson, E. B., Gally, D. L., Mahajan, A., Pedersen, H. L., et al. 2014. Flagella interact with ionic plant lipids to mediate adherence of pathogenic *Escherichia coli* to fresh produce plants. *Environ. Microbiol.* 16:2181–2195.
- Rufián, J. S., Sánchez-Romero, M.-A., López-Márquez, D., Macho, A. P., Mansfield, J. W., Arnold, D. L., et al. 2016. *Pseudomonas syringae* Differentiates into Phenotypically Distinct Subpopulations During Colonization of a Plant Host. *Environ. Microbiol.* 18:3593–3605.
- Rugang Li, Russell, P., Shulu Zhang, Davenport, B., Eads, A., Schuetz, K., et al. 2017. Fast and sensitive detection for *Xylella fastidiosa* through recombinase polymerase amplification. Available at: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.20341.37600> [Accessed March 2, 2021].
- Rüger, H.-J., and Krambeck, H.-J. 1994. Evaluation of the BIOLOG substrate metabolism system for classification of marine bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:281–288.
- Ruinelli, M., Schneeberger, P. H. H., Ferrante, P., Bühlmann, A., Scortichini, M., Vanneste, J. L., et al. 2017. Comparative genomics-informed design of two LAMP assays for detection of the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and discrimination of isolates belonging to the pandemic biovar 3. *Plant Pathol.* 66:140–149.
- Sabaratnam, S., and Beattie, G. A. 2003. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1220–1228.
- Sakthivel, N., Mortensen, C. N., and Mathur, S. B. 2001. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:435–441.
- Salah Ud-Din, A. I. M., and Roujeinikova, A. 2017. Methyl-accepting chemotaxis proteins: a core sensing element in prokaryotes and archaea. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 74:3293–3303.
- Salehi, B., Sharifi-Rad, J., Capanoglu, E., Adrar, N., Catalkaya, G., Shaheen, S., et al. 2019. Cucurbita Plants: From Farm to Industry. *Appl. Sci.* 9:3387.
- Sampedro, I., Parales, R. E., Krell, T., and Hill, J. E. 2015. *Pseudomonas* chemotaxis. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:17–46.

- Sanchez, A., Gonzalez Chavez, Ma. del C., Solís-Dominguez, F., Carrillo, R., and Rosas-Saito, G. 2018. Leaf Epiphytic Bacteria of Plants Colonizing Mine Residues: Possible Exploitation for Remediation of Air Pollutants. *Front. Microbiol.* 9: 3028.
- Sanchez, A. M. 2004. Pistil Factors Controlling Pollination. *PLANT CELL ONLINE.* 16:S98–S106.
- Sands, D. C., Schroth, M. N., and Hildebrand, D. C. 1970. Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. *J. Bacteriol.* 101:9–23.
- Santos, G. R. dos, Ferreira, M. da S. V., Pessoa-Filho, M. A. C. de P., Ferreira, M. E., and Café-Filho, A. C. 2009. Host Specificity and Genetic Diversity of *Didymella bryoniae* from Cucurbitaceae in Brazil. *J. Phytopathol.* 157:265–273.
- Saponari, M., Boscia, D., Altamura, G., Loconsole, G., Zicca, S., D’Attoma, G., et al. 2017. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy. *Sci. Rep.* 7:17723.
- Sato, M., WATANABE, K., and SATO, Y. 2001. *Pseudomonas syringae* pv. *solidagae* pv. nov., the Causal Agent of Bacterial Leaf Spot of Tall Goldenrod *Solidago altissima* L. *J. Gen. Plant Pathol.* 67:303–308.
- Schaad, N. W., Berthier-Schaad, Y., and Knorr, D. 2007. High throughput membrane BIO-PCR technique for ultra-sensitive detection of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Pathol.* 10.1111/j.1365-3059.2006.01488.x
- Schaad, N. W., and Dianese, J. C. 1981. Cruciferous weeds as sources of inoculum of *Xanthomonas campestris* in black rot of crucifers. *Phytopathology.* 71:1215–1220.
- Schaefer, H., Heibl, C., and Renner, S. S. 2009. Gourds afloat: a dated phylogeny reveals an Asian origin of the gourd family (Cucurbitaceae) and numerous oversea dispersal events. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276:843–851.
- Schaefer, H., and Renner, S. S. 2010. Cucurbitaceae. In *Flowering Plants. Eudicots*, ed. Klaus Kubitzki. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 112–174.
- Schaefer, H., and Renner, S. S. 2011. Phylogenetic relationships in the order Cucurbitales and a new classification of the gourd family (Cucurbitaceae). *TAXON.* 60:122–138.
- Schellenberg, B., Ramel, C., and Dudler, R. 2010. *Pseudomonas syringae* Virulence Factor Syringolin A Counteracts Stomatal Immunity by Proteasome Inhibition. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 23:1287–1293.
- Schlaeppli, K., and Bulgarelli, D. 2014. The Plant Microbiome at Work. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 28:212–217.
- Scholz-Schroeder, B. K., Hutchison, M. L., Grgurina, I., and Gross, D. C. 2001. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* 14:336–348.
- Schoonbeek, H., Wang, H.-H., Stefanato, F. L., Craze, M., Bowden, S., Wallington, E., et al. 2015. Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytol.* 206:606–613.
- Schuster, M., and Coyne, D. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Pap. Plant Pathol.*
- Schwartz, A., ed. 2016. *Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease.* Cham: Springer International Publishing. ISBN 978-3-319-31248-4.
- Scortichini. 1992. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in imported commercial black zucchini squash seeds. 10.1094/PDIS-07-17-1002-RE

- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., and Firrao, G. 2012. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Mol. Plant Pathol.* 13:631–640.
- Scortichini, M., Rossi, M. P., Loreti, S., Bosco, A., Fiori, M., Jackson, R. W., et al. 2005. *Pseudomonas syringae* pv. *coryli*, the Causal Agent of Bacterial Twig Dieback of *Corylus avellana*. *Phytopathology.* 95:1316–1324.
- Sedighian, N., Shams-Bakhsh, M., Osdaghi, E., and Khodaygan, P. 2014. Etiology and host range of bacterial leaf blight and necrosis of squash and muskmelon in Iran. *J. Plant Pathol.* 10.4454/jpp.v96i3.3201
- Sedighian, N., Taghavi, S. M., Osdaghi, E., and Shams-Bakhsh, M. 2018. *Serratia marcescens* associated with squash leaf chlorosis and necrotic spots in Iran. *J. Plant Pathol.* 100:85–89.
- Senthil-Kumar, M., and Mysore, K. S. 2013. Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51:407–427.
- Shade, A., Jacques, M.-A., and Barret, M. 2017. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 37:15–22.
- Shade, A., McManus, P. S., and Handelsman, J. 2013. Unexpected Diversity during Community Succession in the Apple Flower Microbiome. *mBio.* 10.1128/mBio.00602-12
- Shaik, R. S., Burrows, G. E., Urwin, N. A. R., Gopurenko, D., Lepschi, B. J., and Weston, L. A. 2017. The biology and management of prickly paddy melon (*Cucumis myriocarpus* L.), an important summer annual weed in Australia. *Crop Prot.* 92:29–40.
- Shapiro, L. R., Paulson, J. N., Arnold, B. J., Scully, E. D., Zhaxybayeva, O., Pierce, N. E., et al. 2018. An Introduced Crop Plant Is Driving Diversification of the Virulent Bacterial Pathogen *Erwinia tracheiphila*. *mBio.* 10.1128/mBio.01307-18
- Shapiro, L. R., Scully, E. D., Roberts, D., Straub, T. J., Geib, S. M., Park, J., et al. 2015. Draft Genome Sequence of *Erwinia tracheiphila*, an Economically Important Bacterial Pathogen of Cucurbits. *Genome Announc.* 3(3):e00482-15.
- Shapiro, L. R., Scully, E. D., Straub, T. J., Park, J., Stephenson, A. G., Beattie, G. A., et al. 2016. Horizontal Gene Acquisitions, Mobile Element Proliferation, and Genome Decay in the Host-Restricted Plant Pathogen *Erwinia Tracheiphila*. *Genome Biol. Evol.* 8:649–664.
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., et al. 2013. Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathol.* 62:1114–1122.
- Shenge, K. C., Mabagala, R. B., Mortensen, C. N., Stephan, D., and Wydra, K. 2007. First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Tanzania. *Plant Dis.* 91:462–462.
- Shepherd, L. M., and Block, C. C. 2017. CHAPTER 13: Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in Soybean Seeds. In *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition, Bacteriology, The American Phytopathological Society*, p. 85–88.
- Shila, S. J., Islam, M. R., Ahmed, N. N., Dastogeer, K. M. G., and Meah, M. B. 2013. Detection of *Pseudomonas Syringae* pv. *Lachrymans* Associated with the Seeds of Cucurbits. *Univers. J. Agric. Res.* 1:1–8.
- Short, E. E., Caminade, C., and Thomas, B. N. 2017. Climate Change Contribution to the Emergence or Re-Emergence of Parasitic Diseases. *Infect. Dis. Res. Treat.* 10:1178633617732296.



- Silva, G. M., Souza, R. M., Yan, L., Júnior, R. S., Medeiros, F. H. V., and Walcott, R. R. 2016. Strains of the Group I Lineage of *Acidovorax citrulli*, the Causal Agent of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbitaceous Crops, are Predominant in Brazil. *Phytopathology*. 106:1486–1494.
- Silva, J. C., Júnior, T. A. F. S., Soman, J. M., Tomasini, T. D., Sartori, M. M. P., and Maringoni, A. C. 2017. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in the phyllosphere and rhizosphere of weeds. *Plant Pathol.* 66:1517–1526.
- Silva Júnior, T. A. F., Silva, J. C., Gonçalves, R. M., Soman, J. M., Passos, J. R. S., and Maringoni, A. C. 2020. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* associated with soil and cauliflower crop debris under Brazilian conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 156:399–411.
- Simmons, H. E., Holmes, E. C., Gildow, F. E., Bothe-Goralczyk, M. A., and Stephenson, A. G. 2011. Experimental Verification of Seed Transmission of Zucchini yellow mosaic virus. *Plant Dis.* 95:751–754.
- Singh, D., and Mathur, S. B. 2004. *Histopathology of Seed-Borne Infections*. CRC Press.
- Singh, S., Singh, H., and Bharat, N. 2020. Hot Water Seed Treatment: A Review.
- Skerman, V. B. D., McGOWAN, V., and Sneath', P. H. A. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *INTJ SYSTBACTERIOL.* 30:196.
- Skubacz, A., and Daszkowska-Golec, A. 2017. Seed Dormancy: The Complex Process Regulated by Abscisic Acid, Gibberellins, and Other Phytohormones that Makes Seed Germination Work. *Phytohorm. - Signal. Mech. Crosstalk Plant Dev. Stress Responses*. 10.5772/intechopen.68735
- Slack, S. M., Zeng, Q., Outwater, C. A., and Sundin, G. W. 2017. Microbiological Examination of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharide Ooze. *Phytopathology®*. 107:403–411.
- Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., and Alm, E. J. 2011. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*. 480:241–244.
- Smith, J. M. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34:126–129.
- Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M. W., Soukup, A., and Thompson, R. D. 2014. The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* 5:351
- Sohail, R. A. A., and Masud, T. 2014. 8. Characterization and antibacterial study of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*) by rabia adeel\_ asma sohail and tariq masud. *life Sci. Leafl.* 49:53–to.
- Sokurenko, E. V., Hasty, D. L., and Dykhuizen, D. E. 1999. Pathoadaptive mutations: gene loss and variation in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 7:191–195.
- Song, W. Y., Kim, H. M., Hwang, C. Y., and Schaad, N. W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR. *J. Phytopathol.* 10.1111/j.1439-0434.2004.00914.x
- Stapp, C. 1928. *Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien)*. *Handb. Pflanzenkrankh.* 2:1–295.
- Stavrínides, J., McCloskey, J. K., and Ochman, H. 2009. Pea Aphid as both Host and Vector for the Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2230–2235.
- Stefani, E., and Giovanardi, D. 2011. Dissemination of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through pollen and its epiphytic life on leaves and fruits. *Phytopathol. Mediterr.* 50:489–496.
- Strayer-Scherer, A., Jones, J. B., and Paret, M. L. 2018. Recombinase Polymerase Amplification Assay for Field Detection of Tomato Bacterial Spot Pathogens. *Phytopathology®*. 109:690–700.
- Sudisha, J., Niranjana, S. R., Umesha, S., Prakash, H. S., and Shekar Shetty, H. 2006. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and effect of seed treatments on disease incidence and fruit yield. *Biol. Control.* 37:196–205.



- Sulthana, S., Rajyaguru, P. I., Mittal, P., and Ray, M. K. 2011. rnr Gene from the Antarctic Bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W, Encoding a Psychrophilic RNase R $\nu$ . *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7896–7904.
- Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., and Yang, C.-H. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects. *Mol. Plant Pathol.* 17:1506–1518.
- Sutherland, I. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* 9:222–227.
- Swaroop, S. 1951. The range of variation of the most probable number of organisms estimated by the dilution method. *Indian J. Med. Res.*
- Takikawa, Y. 1991. Occurrence of bacterial leaf spot of maple incited by *Pseudomonas syringae* pv. *aceris* in Japan. *Ann Phytopath Soc Jpn.* 57:724–728.
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., and Smart, C. D. 2013. Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:6948–6957.
- Tavares, M., Kozak, M., Balola, A., and Sá-Correia, I. 2020. Burkholderia cepacia Complex Bacteria: a Feared Contamination Risk in Water-Based Pharmaceutical Products. *Clin. Microbiol. Rev.* 33(3):e00139-19.
- Taylor, J. D., Dudley, C. L., and Gray, L. P. (née. 1979a. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Ann. Appl. Biol.* 93:267–277.
- Taylor, J. D., Dudley, C. L., and Gray, L. P. (née. 1979b. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. *Ann. Appl. Biol.* 93:267–277.
- Teppner, H. 2004. Notes on *Lagenaria* and *Cucurbita* (Cucurbitaceae)--review and new contributions. *Phyton.* 44:245-308.
- Terrasson, E., Darrasse, A., Righetti, K., Buitink, J., Lalanne, D., Ly Vu, B., et al. 2015. Identification of a molecular dialogue between developing seeds of *Medicago truncatula* and seedborne xanthomonads. *J. Exp. Bot.* 66:3737–3752.
- Thapa, S. 2014. Field survival of *xanthomonas cucurbitae*, the causal agent of bacterial spot of pumpkin, and efficacy of selected chemicals and biocontrol agents for control of the diseases.
- Tian, L., Huang, C., Mazloom, R., Heath, L. S., and Vinatzer, B. A. 2020. LINbase: a web server for genome-based identification of prokaryotes as members of crowdsourced taxa. *Nucleic Acids Res.* 48:W529–W537.
- Tian, Q., Feng, J., Hu, J., and Zhao, W. 2016. Selective detection of viable seed-borne *Acidovorax citrulli* by real-time PCR with propidium monoazide. *Sci. Rep.* 6:35457.
- Tian, Y., Zhao, Y., Wu, X., Liu, F., Hu, B., and Walcott, R. R. 2015. The type VI protein secretion system contributes to biofilm formation and seed-to-seedling transmission of *Acidovorax citrulli* on melon. *Mol. Plant Pathol.* 16:38–47.
- Tóbiás, I., and Palkovics, L. 2003. Characterization of Hungarian isolates of zucchini yellow mosaic virus (ZYMV, potyvirus) transmitted by seeds of *Cucurbita pepo* var *Styriaca*. *Pest Manag. Sci.* 59:493–497.
- Tomihama, T., Nishi, Y., and Arai, K. 2007. Biofilm formation and resistance to bactericides of *Pseudomonas syringae* pv. *theae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 73:193–196.
- Trisciuzzi, N., Silletti, M. R., Gallitelli, D., and Spanò, R. 2018. First detection of tomato leaf curl New Delhi virus in melon and zucchini squash in southern Italy. *J. Plant Pathol.* 100:149–149.

- Trueman, C. L., Roddy, E., and Goodwin, P. H. 2014. First report of bacterial spot (*Xanthomonas cucurbitae*) of pumpkin in Ontario, Canada. *New Dis. Rep.* 30:8–8.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., and Vangronsveld, J. 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants: Bacterial seed endophytes. *Environ. Microbiol. Rep.* 7:40–50.
- Tymon, L. S., and Inglis, D. A. 2017. Identification and pathogenicity of *Pseudomonas syringae* genomospecies 1 phylogroup 2b causing leaf spots and fruit warts on cucurbits in western Washington, U.S. *J. Plant Pathol.* 99:713–722.
- Ushio, M., Yamasaki, E., Takasu, H., Nagano, A. J., Fujinaga, S., Honjo, M. N., et al. 2015. Microbial communities on flower surfaces act as signatures of pollinator visitation. *Sci. Rep.* 5:8695.
- Van Der Wolf, J. M., Birnbaum, Y., Van Der Zouwen, P. S., and Groot, S. P. C. 2008. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. *Seed Sci. Technol.* 36:76–88.
- Van dongen, J. T., Ammerlaan, A. M. H., Wouterlood, M., Van aelst, A. C., and Borstlap, A. C. 2003. Structure of the Developing Pea Seed Coat and the Post-phloem Transport Pathway of Nutrients. *Ann. Bot.* 91:729–737.
- Vanderplank, J. E. 1978. Variation in the Resistance of the Host and in the Pathogenicity of the Parasite. In *Genetic and Molecular Basis of Plant Pathogenesis, Advanced Series in Agricultural Sciences*, ed. J. E. Vanderplank. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 1–19.
- Vannette, R. L. 2020. The Floral Microbiome: Plant, Pollinator, and Microbial Perspectives. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 51:363–386.
- Vasebi, Y., Khakvar, R., Faghihi, M. M., and Vinatzer, B. A. 2019. Genomic and pathogenic properties of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from apricot in East Azerbaijan province, Iran. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 19:101167.
- Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45:472–489.
- Verma, A. K., and Agrawal, K. 2018. Location and histopathology of seed-borne bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* carried by pea seeds. *seeds.* 4:5.
- Vicente, J. G., and Holub, E. B. 2012. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Mol. Plant Pathol.* 1:2–18.
- Vidaver, A. K., Koski, R. K., and Van Etten, J. L. 1973. Bacteriophage  $\phi 6$ : a Lipid-Containing Virus of *Pseudomonas phaseolicola*. *J. Virol.* 11:799–805.
- Villela, J. G. A., Ritschel, P., Barbosa, M. A. G., Baccin, K. M. S., Rossato, M., Maia, J. D. G., et al. 2019. Detection of *Xanthomonas citri* pv. *viticola* on grapevine by real-time PCR and BIO-PCR using primers designed from pathogenicity and xanthomonadin gene sequences. *Eur. J. Plant Pathol.* 155:445–459.
- Vinatzer, B. A., Weisberg, A. J., Monteil, C. L., Elmarakeby, H. A., Sheppard, S. K., and Heath, L. S. 2017. A Proposal for a Genome Similarity-Based Taxonomy for Plant-Pathogenic Bacteria that Is Sufficiently Precise to Reflect Phylogeny, Host Range, and Outbreak Affiliation Applied to *Pseudomonas syringae* sensu lato as a Proof of Concept. *Phytopathology.* 107:18–28.
- Vleeshouwers, L. M., Bouwmeester, H. J., and Karssen, C. M. 1995. Redefining Seed Dormancy: An Attempt to Integrate Physiology and Ecology. *J. Ecol.* 83:1031–1037.

- Wadhams, G. H., and Armitage, J. P. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:1024–1037.
- Wagner, G. J., Wang, E., and Shepherd, R. W. 2004. New Approaches for Studying and Exploiting an Old Protuberance, the Plant Trichome. *Ann. Bot.* 93:3–11.
- Walcott, R. R., Fessehaie, A., and Castro, A. C. 2004. Differences in Pathogenicity between two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on Cucurbit Hosts. *J. Phytopathol.* 152:277–285.
- Walitang, D. I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y. K., Kang, Y., and Sa, T. 2017. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. *BMC Microbiol.* 17:209.
- Waliullah, S., Hudson, O., Oliver, J. E., Brannen, P. M., Ji, P., and Ali, M. E. 2019. Comparative analysis of different molecular and serological methods for detection of *Xylella fastidiosa* in blueberry. *PLOS ONE.* 14:e0221903.
- Walsh, M. G., de Smalen, A. W., and Mor, S. M. 2018. Climatic influence on anthrax suitability in warming northern latitudes. *Sci. Rep.* 8:9269.
- Weinert, L. A., Welch, J. J., Suchard, M. A., Lemey, P., Rambaut, A., and Fitzgerald, J. R. 2012. Molecular dating of human-to-bovid host jumps by *Staphylococcus aureus* reveals an association with the spread of domestication. *Biol. Lett.* 8:829–832.
- Weingart, H., Stubner, S., Schenk, A., and Ullrich, M. S. 2004. Impact of temperature on in planta expression of genes involved in synthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI.* pp 159-165.
- Weller, S. A., Simpkins, S. A., Stead, D. E., Kurdziel, A., Hird, H., and Weekes, R. J. 2002. Identification of *Agrobacterium* spp. present within *Brassica napus* seed by TaqMan PCR – implications for GM screening procedures. *Arch. Microbiol.* 178:338–343.
- Whitaker, T. W., and Bohn, G. W. 1950. The taxonomy, genetics, production and uses of the cultivated species of *Cucurbita*. *Econ. Bot.* 4:52–81.
- Wichmann, G., Ritchie, D., Kousik, C. S., and Bergelson, J. 2005. Reduced Genetic Variation Occurs among Genes of the Highly Clonal Plant Pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, Including the Effector Gene *avrBs2*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2418–2432.
- Wijesinghe, S. A. E. C., Evans, L. J., Kirkland, L., and Rader, R. 2020. A global review of watermelon pollination biology and ecology: The increasing importance of seedless cultivars. *Sci. Hortic.* 271:109493.
- Wilcox, G. E. (Purdue U., and Pfeiffer, C. L. 1990. Temperature effect on seed germination, seedling root development and growth of several vegetables. *J. Plant Nutr. USA.* 10.1080/01904169009364161
- Wintermantel, W. M. 2004. Pumpkin (*Cucurbita maxima* and *C. pepo*), a new host of Beet pseudo yellows virus in California. *Plant Dis.* 88:82–82.
- Wu, S., Wang, X., Reddy, U., Sun, H., Bao, K., Gao, L., et al. 2019. Genome of 'Charleston Gray', the principal American watermelon cultivar, and genetic characterization of 1,365 accessions in the U.S. National Plant Germplasm System watermelon collection. *Plant Biotechnol. J.* 17:2246–2258.
- Xanthopoulou, A., Montero-Pau, J., Mellidou, I., Kissoudis, C., Blanca, J., Picó, B., et al. 2019. Whole-genome resequencing of *Cucurbita pepo* morphotypes to discover genomic variants associated with morphology and horticulturally valuable traits. *Hortic. Res.* 6:1–17.

- Xin, X.-F., Kvitko, B., and He, S. Y. 2018. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:316.
- Xin, X.-F., Nomura, K., Aung, K., Velásquez, A. C., Yao, J., Boutrot, F., et al. 2016. Bacteria establish an aqueous living space in plants crucial for virulence. *Nature.* 539:524–529.
- Xu, H., Su, W., Zhang, D., Sun, L., Wang, H., Xue, F., et al. 2017. Influence of environmental factors on *Cucumis melo* L. var. *agrestis* Naud. seed germination and seedling emergence. *PLoS ONE.* 12(6):e0178638.
- Yan, L., Hu, B., Chen, G., Zhao, M., and Walcott, R. R. 2017. Further Evidence of Cucurbit Host Specificity among *Acidovorax citrulli* Groups Based on a Detached Melon Fruit Pathogenicity Assay. *Phytopathology.* 107:1305–1311.
- Yang, B., Sugio, A., and White, F. F. 2005. Avoidance of Host Recognition by Alterations in the Repetitive and C-Terminal Regions of AvrXa7, a Type III Effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant-Microbe Interactions®.* 18:142–149.
- Yoshioka, R., Uematsu, H., Takikawa, Y., Kajihara, H., and Inoue, Y. 2020. PCR detection of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the causal agent of bacterial black node in barley and wheat, using newly designed primer sets. *J. Gen. Plant Pathol.* 86:387–392.
- Young, J. M. 1991. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902. *Ann. Appl. Biol.* 118:283–298.
- Young, J. M. 2010. Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J. Plant Pathol.:*S5–S14.
- Young, J. M., Dye, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G., and Robbs, C. F. 1978. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N. Z. J. Agric. Res.* 21:153–177.
- Yu, A., Lepère, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., et al. 2013. Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:2389–2394.
- Zajączkowska, U., Kucharski, S., and Guzek, D. 2015. Are trichomes involved in the biomechanical systems of *Cucurbita* leaf petioles? *Planta.* 242:1453–1465
- Zeng, W., and He, S. Y. 2010. A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 153:1188–1198.
- Zhang, S., Fu, Y., Mersha, Z., and Pernezny, K. 2017. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean. *Crop Prot.* 98:8–15.
- Zhang, X., and Babadoost, M. 2018. Characteristics of *Xanthomonas cucurbitae* Isolates from Pumpkins and Survival of the Bacterium in Pumpkin Seeds. *Plant Dis.* 102:1779–1784.
- Zhang, Y.-P., Jia, F.-F., Zhang, X.-M., Qiao, Y.-X., Shi, K., Zhou, Y.-H., et al. 2012. Temperature effects on the reactive oxygen species formation and antioxidant defence in roots of two cucurbit species with contrasting root zone temperature optima. *Acta Physiol. Plant.* 34:713–720.
- Zhao, M., Dutta, B., Luo, X., Burdman, S., and Walcott, R. 2020. Genetically Distinct *Acidovorax citrulli* Strains Display Cucurbit Fruit Preference Under Field Conditions. *Phytopathology®.* 110:973–980.
- Zhao, W., Zhu, S., Liao, X., Chen, H., and Tan, T. 2007. Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in seeds using a specific TaqMan probe. *Mol. Biotechnol.* 35:119.

- Zheng, X., Spivey, N. W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z. Q., Klessig, D. F., et al. 2012. Coronatine Promotes *Pseudomonas syringae* Virulence in Plants by Activating a Signaling Cascade that Inhibits Salicylic Acid Accumulation. *Cell Host Microbe*. 11:587–596.
- Zhou, Z., Wu, Y., Yang, Y., Du, M., Zhang, X., Guo, Y., et al. 2015. An Arabidopsis Plasma Membrane Proton ATPase Modulates JA Signaling and Is Exploited by the *Pseudomonas syringae* Effector Protein AvrB for Stomatal Invasion. *Plant Cell*. 27:2032–2041.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., et al. 2006. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Cell*. 125:749–760.
- Zlatković, N., Prokić, A., Gašić, K., Kuzmanović, N., Ivanović, M., and Obradović, A. 2019. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Squash and Watermelon in Serbia. *Plant Dis*. 103:2667–2667.



# Annexes





**Annexe 1.** Données supplémentaires sur les symptômes induits par P135 (calde 2d), P108 (Clade 2b) et P99 (cluster A, VCZ) sur une gamme d'hôtes de 11 Cucurbitacées (lecture à J+7 après le spray à  $10^7$  ufc/mL )

*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* cv. Opale

W



P135

P108



P99

*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* cv. Mischief

W



P135

P108



P99



*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* cv. Tosca

W



P135

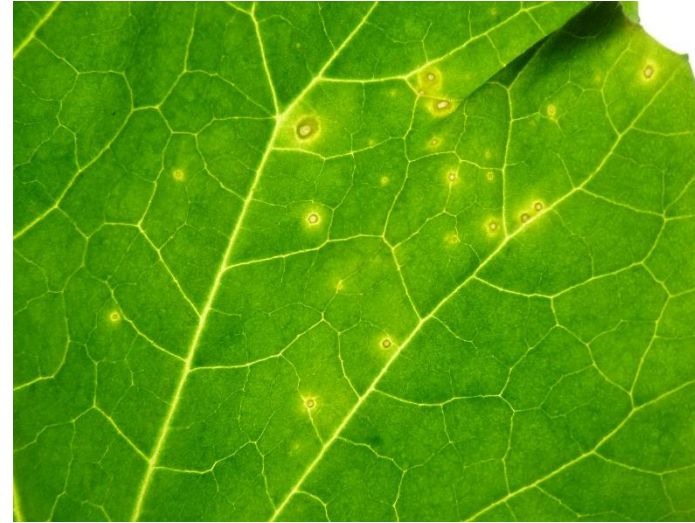
P108



P99

*Cucurbita moschata*

W



P135

P108



P99



*Cucurbita pepo* subsp. *texana*

W



P135

P108



P99

*Cucumis melo* var. cantalupsis

W



P135

P108



P99



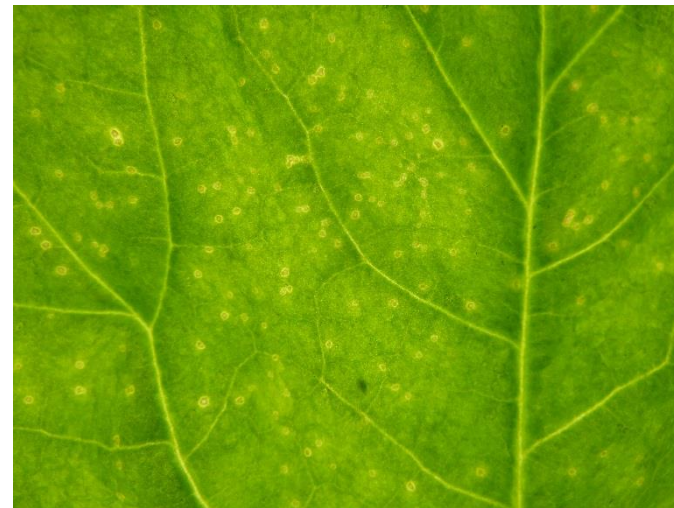
*Cucumis melo* var. galia

W



P135

P108



P99

*Cucurbita maxima*

W



P135

P108



P99



*Cucumis melo* var. *inodorus*

W



P135

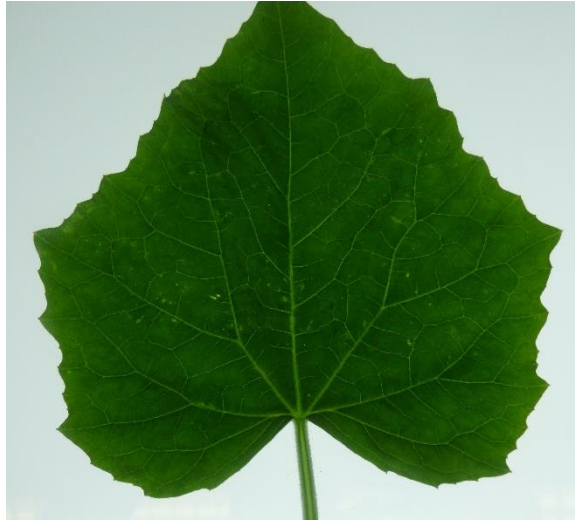
P108



P99

*Cucumis sativus*

W



P135

P108



P99



*Citrullus lanatus*

W



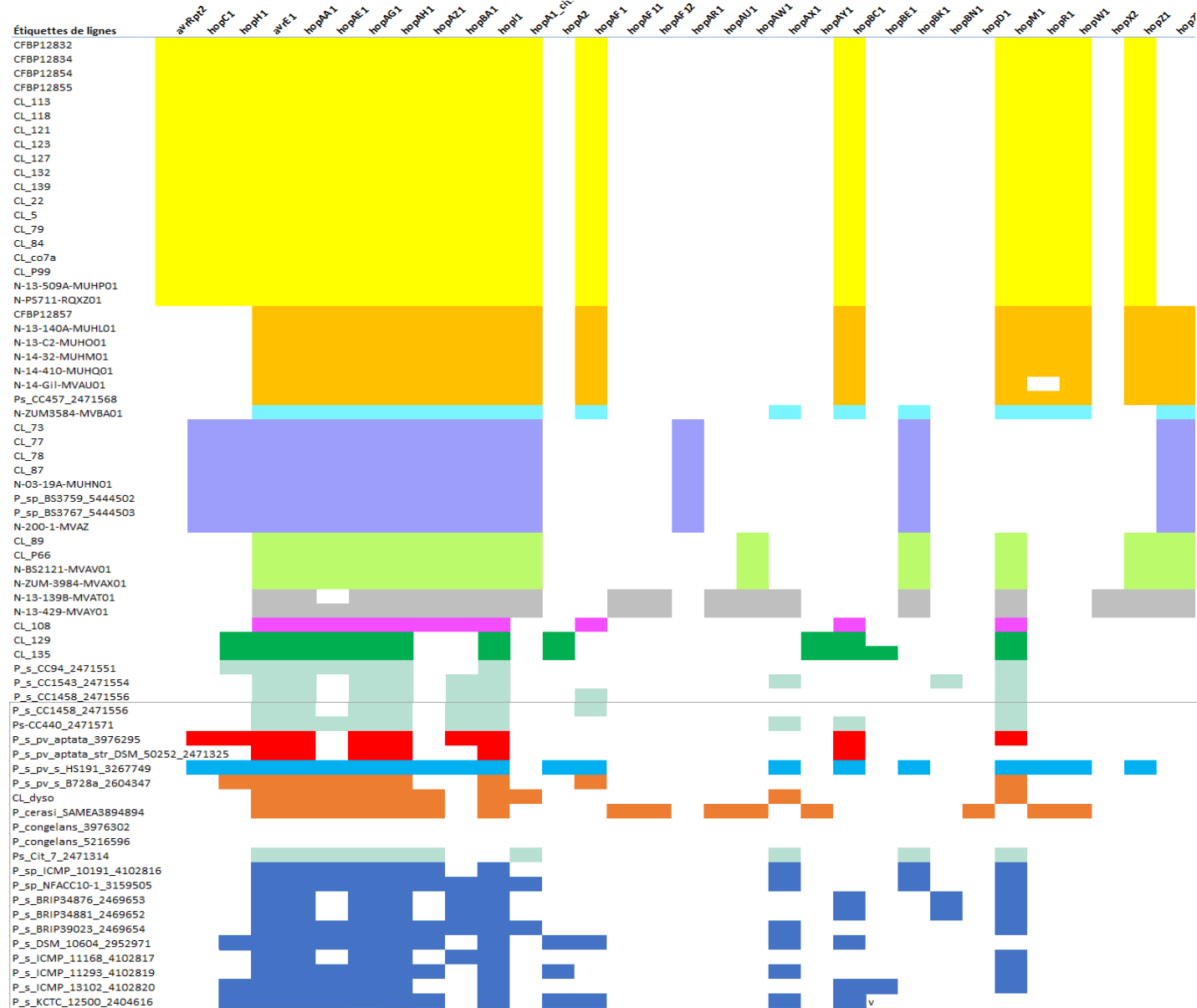
P135

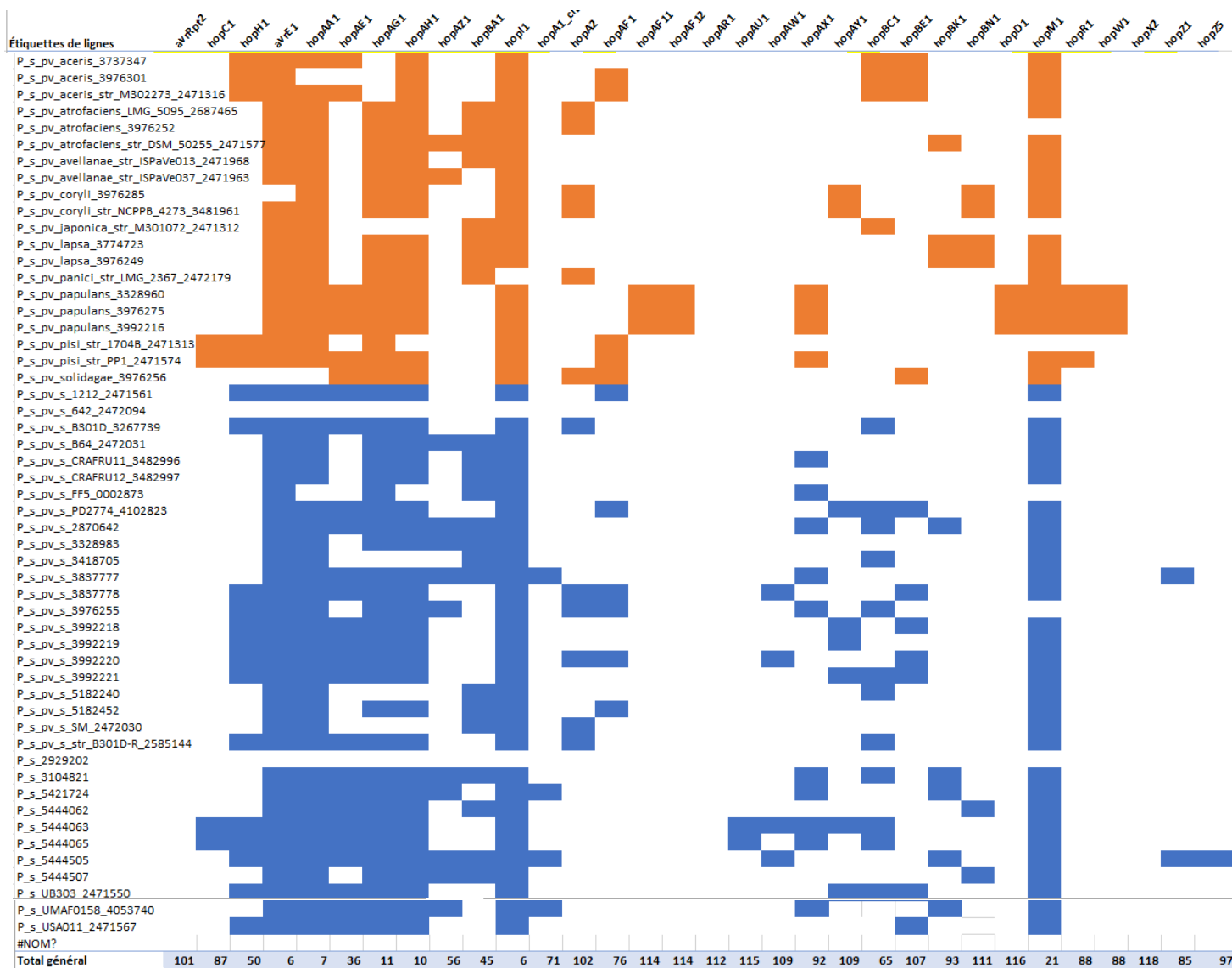
P108



P99

## Annexe II. Répertoires de d'ET3 pour 120 génomes. Les cases colorées indiquent la présence de l'ET3









## RÉSUMÉ

La nervation blanche de la courgette (VCZ) affecte les plantules en pépinière et induit des nécroses, des éclaircissements des nervures, des retards et des blocages de croissance. Cette maladie transmise par les semences est causée par des bactéries du complexe d'espèces *Pseudomonas syringae* (Pssc). La fréquence des lots de semences contaminés croît depuis une 20<sup>aine</sup> d'années et peu de connaissances épidémiologiques sur la VCZ sont disponibles. L'objectif de cette thèse était de caractériser les souches VCZ et de comprendre comment elles contaminent les graines. Ainsi, 54 souches VCZ ont été caractérisées phylogénétiquement, génotypiquement et phénotypiquement. Des outils moléculaires de détection et d'identification ont été développés grâce aux analyses de génomique comparative et utilisés lors d'une enquête épidémiologique dans des parcelles de courgette porte-graines et dans les lots de semences. Les voies de transmission aux graines de 2 souches VCZ ont été étudiées. Les résultats montrent que les souches VCZ appartiennent à cinq lignées génétiques (Clusters A à E) du phylogroupe 2 du Pssc et possèdent des gammes d'hôtes étroite (Cluster A) ou large (Cluster B à E) au sein des Cucurbitacées en lien avec leur répertoires d'effecteurs de type III. Un nouveau schéma de typage multilocus et une nouvelle q-PCR multiplex mettent en évidence la prédominance des souches du cluster A dans les lots de semences mais pas dans les parcelles en végétation. Les voies transmission florale et vasculaire sont empruntées par 2 souches VCZ des Clusters A et E. Ces données permettant une meilleure compréhension de la VCZ serviront de base à l'amélioration de la lutte contre cette maladie.

**mots-clés :** *Pseudomonas syringae*, *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*, Cucurbitacées, Transmission par la semence, q-PCR, MLSA, MLST, épidémiologie

## ABSTRACT

Zucchini vein clearing (VCZ) affects plantlets grown in nurseries and induces necrosis, vein clearing, growth delays and stunting. This seed-borne disease is caused by bacteria belonging to the *Pseudomonas syringae* species complex (Pssc). Frequency of contaminated seed lots has been increasing since 20 years and knowledge about VCZ epidemiology remains limited. The aim of this PhD thesis was to characterize VCZ strains and to understand how they contaminate seeds. For this purpose, 54 VCZ strains were characterized phylogenetically, genotypically and phenotypically. Molecular tools for detection and identification were developed through comparative genomic analyzes and used for an epidemiological survey in zucchini seed multiplication plots and in seed lots. Different transmission pathways of two VCZ strains to seeds were studied. The results showed that the VCZ strains belonged to five genetic lineages (Clusters A to E) of phylogroup 2 of the Pssc and strains displayed narrow (Cluster A) or wide (Cluster B to E) host ranges within Cucurbitaceae according to their repertoires of type III effectors. A new multilocus typing scheme and a new q-PCR multiplex highlighted the predominance of strains from cluster A in seed lots but not in zucchini seed multiplication plots. The two tested VCZ strains representing Cluster A and E contaminated seeds through the floral and the vascular pathways. These data provide a better understanding of VCZ and should be used to improve disease management.

**keywords :** *Pseudomonas syringae*, *Cucurbita pepo* subsp. *pepo*, Cucurbits, seed-borne transmission, q-PCR, MLSA, MLST, epidemiology

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex  
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



# ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Caroline Lacault**  
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une  
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,  
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.  
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées  
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **11/03/2021**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint  
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université  
40 rue de rennes – BP 73532  
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

