

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Hassiba Benbouali de Chlef

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Nutrition et Sciences des Aliments



THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

Filière : Sciences Alimentaires et Nutrition Humaine

Spécialité : Sciences des Aliments

Par

Hiba NAÂS

Thème :

Isolement et caractérisation des espèces d'*Erwinia*, agents de la jambe noire et de la pourriture molle de pomme de terre

Soutenue le 28/07/2019, devant le jury composé de :

Mme. Allem Rachida	Professeur	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Président
Mr. Sebahia Mohammed	Professeur	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Directeur de thèse
Mr. Setti Benali	Professeur	Université Hassiba Benbouali de Chlef	Examineur
Mr. Bellahcene Miloud	Professeur	Centre Universitaire d'Ain Témouchent	Examineur
Mr. Karkachi Noureddine	MCA	Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella	Examineur

Année universitaire : 2018-2019

Dédicaces

À mes chers parents ;

NAAS Abdelkader et MIMOUN Houria , aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Votre patience sans fin, votre compréhension et vos encouragements sont pour moi le soutien indispensable que vous avez toujours su m'apporter,

Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain, et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.

En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour vous, je mets entre vos mains, le fruit de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme parents.

À la mémoire de mes grand-pères et mes grand-mères,

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon coeur, J'aurais tant aimé que vous soyez présents.

Je vous dédie aujourd'hui ma réussite et que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

À ma soeur Meriem

Aucune dédicace ne peut exprimer mon amour et ma gratitude de t'avoir comme sœur, je n'oublierais jamais ton encouragement et ton soutien le long de mes études,

Je te souhaite beaucoup de succès, de prospérité, une vie pleine de joie et de bonheur

À mes chères petites nièces Dorsaf et Feth El-Zahar

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur.

Cette thèse vous est dédiée...

Remerciements

À travers mes prières je remercie Dieu le tout puissant et le miséricordieux pour m'avoir aidé et permis de finaliser mon cursus jusqu'au Doctorat.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse le Pr SEBAIHA M. pour m'avoir autorisée d'entreprendre ce travail de thèse sous sa direction, pour ses remarques, ses conseils méthodologiques et sa disponibilité tout au long de la réalisation et la correction de ce travail, veuillez accepter l'expression de ma gratitude et de mes plus sincères remerciements.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres du jury qui ont accepté avec bienveillance d'évaluer ce travail, ils m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail et de participer au jury :

Pr. ALLEM R., Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef d'avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider ce jury.

Pr. BELLACHENE M., Professeur au Centre Universitaire de Ain Témouchent et Dr. KARKACHI N., Maître de conférence à l'Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, d'avoir accepté d'être membres de jury de ce travail pour juger et évaluer cette thèse malgré leurs nombreuses occupations, de se rendre à Chlef, un grand Merci pour vos efforts et votre contributions.

Pr. SETTI B., Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef, pour son aide, son grand effort, sa contribution et l'intérêt qu'il a porté à mon travail en acceptant d'examiner ma thèse.

Mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont accueilli, aidé et guidé pendant mon stage à Perugia, Italie, en premier lieu directeur du laboratoire Pr BUONAUJORO, pour l'opportunité qu'il m'a offert de travailler dans son laboratoire, et Dr MORETTI CH, je souhaite lui remercier du fond du cœur pour son aide et ses remarques,

Merci pour leur collaboration et serviabilité.

Un grand merci à Monsieur Dr BECCARA, pour ces précieuses aides en analyse statistique et sa disponibilité.

Un grand merci à Monsieur MEKHANEG, et toute l'équipe de la Station Régionale de Protection des Végétaux de Chlef (SRPV) pour leur aide.

Je souhaite également remercier du fond du cœur mes parents, ma sœur MERIEM et mon beau-frère HABIB, ils m'ont tant aidé durant toutes mes années d'études et dans tous les moments qui accompagnent ma vie.

Merci à toutes les familles NAAS, MIMOUN, TAHAR, BENESSALAH, MOULESSEHOUL, mes oncles, mes tantes, mes cousines, mes cousins et surtout un énorme merci à mon adorable cousin HADJ NAAS MOHAMMED HEMZA.

Un grand Merci à tous les amis (es), collègues et à tous ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de cette thèse, ils se reconnaîtront.

« Nous pensons que la vie est une chance, utilisant donc chaque seconde, chaque minute et chaque jour pour rendre service à notre famille, notre communauté, notre pays, au monde entier et si possible à l'univers tout entier... »

Résumé

Les bactéries appartenant au genre *Pectobacterium* sont des phytopathogènes bien connus comme agents causaux des maladies de la pourriture molle et de la jambe noire sur de nombreuses plantes cultivées dans le monde, particulièrement la pomme de terre, entraînant de pertes économiques importantes.

Durant la période entre 2012 et 2016, des cultures de pommes de terre présentant des symptômes de la pourriture molle sur le tubercule et la jambe noire sur leurs plants ont été collectées dans six zones productrices majeures de pommes de terre en Algérie, notamment Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaganem, Relizane et Tiaret.

Sur la base des symptômes de la maladie et des caractéristiques physiologiques et biochimiques, 21 isolats de bactéries responsables de la pourriture molle ont été isolés à partir de tubercules de pomme de terre malades.

Le test de pathogénicité des isolats testés a prouvé leur capacité à macérer la pomme de terre, avec des niveaux variables entre les isolats et également entre les cultivars. De plus, ces isolats ont produit des enzymes dégradant la paroi cellulaire végétale, telles que les pectinases, les cellulases, les protéases, et ont provoqué une réaction d'hypersensibilité sur les feuilles de géranium et de tabac.

L'analyse phylogénétique avec les séquences des gènes *mdh* et ADNr 16S et par Analyse de Séquences Multilocus (MLSA) des séquences partielles des gènes de ménage (*acnA*, *atpD*, *gyrB* et *infB*) ont confirmé les résultats obtenus à partir de tests physiologiques et biochimiques utilisés pour l'identification des bactéries, et ont révélé que six et 15 isolats étaient *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectivement.

À notre connaissance, il s'agit du premier signalement de *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* comme agent de la pourriture molle de la pomme de terre en Algérie.

Mots clés: Bactéries de la pourriture molle, pourriture molle, jambe noire, *Solanum tuberosum*, *Pectobacterium*, MLSA.

Abstract

Bacteria belonging to the genus *Pectobacterium* are well known plant pathogen causing soft rot and blackleg diseases on many cultivated plants worldwide, particularly potato, with severe economic losses.

During the period between 2012 and 2016, potato cultures showing symptoms of soft rot on their tuber and blackleg on their plants, were collected from six major potato growing areas in Algeria including Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaganem, Relizane and Tiaret.

On the basis of disease symptoms, physiological and biochemical features, 21 isolates of soft rot bacteria were isolated from diseased potato tubers.

Pathogenicity assay of the isolates tested proved their ability to macerate potato, with varying levels between the isolates and also between the cultivars. Moreover, these strains produced plant cell-wall degrading enzymes such as pectinases, cellulases, proteases, and elicited a hypersensitive reaction on geranium and tobacco leaves.

Phylogenetic analysis with the sequences of the *mdh* and 16S rRNA genes and with Multilocus Sequence Analysis (MLSA) of partial sequences of the housekeeping genes (*acnA*, *atpD*, *gyrB* and *infB*) confirmed the results obtained from physiological and biochemical assays used for identification of the bacteria, and revealed that six and 15 isolates were *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, respectively.

To our knowledge, this is the first report of *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* as the soft rot agent of potato in Algeria.

Keywords: Soft-rotting bacteria, soft rot, blackleg, *Solanum tuberosum*, *Pectobacterium*, MLSA.

ملخص

البكتيريا التي تنتمي إلى جنس " البكتوبكتريوم " (*Pectobacterium*) هي مُمرضات نباتية معروفة جيداً كعوامل مسببة لأمراض العفن الطري والساق السوداء في العديد من المحاصيل المزروعة في جميع أنحاء العالم ، وخاصة البطاطا، مسببة خسائر اقتصادية كبيرة .

خلال الفترة الممتدة ما بين 2012 و 2016 ، تم جمع محاصيل البطاطا التي تظهر عليها أعراض العفن الطري على الدرناات و الساق السوداء في شتلاتها في ستة مناطق رئيسية لإنتاج البطاطس في الجزائر ، بما في ذلك عين الدفلى ، الشلف ، معسكر ، مستغانم ، غليزان و تيارت.

على أساس أعراض المرض والخصائص الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية ، تم عزل 21 عزلة من بكتيريا العفن الطري من درناات البطاطا المريضة.

لقد أثبت اختبار القدرة الممرضة للعزلات التي خضعت للاختبار قدرتها على تمييز البطاطا ، مع وجود مستويات متفاوتة بين العزلات و كذلك بين أصناف البطاطا. بالإضافة إلى ذلك ، أنتجت هذه العزلات أنزيمات تحلل جدار الخلية النباتية ، مثل البكتيناز، السيلولاز والبروتياز ، وتسببت في تفاعل الحساسية على اوراق نبات الجيرانيوم والتبغ.

كما أُكِّد تحليل الفيلوجيني باستخدام تسلسل جين (*mdh*) و d'ADNr 16S وتحليل Multilocus للتسلسلات الجزئية لجينات *atpD* ، *gyrB* و *infB* النتائج التي تم الحصول عليها من الاختبارات الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية المستخدمة لتحديد البكتيريا ، وكشفت أن ستة عزلات وخمسة عشر أخرى ينتمون إلى *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *carotovorum* subsp. *brasiliense* ، على التوالي.

على حد علمنا، هذا هو التقرير الأول لـ *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* كعامل مسبب للعفن الطري للبطاطا في الجزائر .

الكلمات الدالة: بكتيريا العفن الطري ، العفن الطري، الساق السوداء ، *Pectobacterium* ، *Solanum tuberosum* ،

MLSA

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Liste des annexes

Introduction générale 1

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1. La plante hôte	4
I.1.1. Origine et systématique	4
I.1.2. Description morphologique	4
I.1.2.1. Partie aérienne	5
I.1.2.2. Partie souterraine	5
I.1.3. Multiplication et cycle végétatif de la pomme de terre	6
I.1.4. Les exigences écologiques de la plante de pomme de terre	8
I.1.4.1. Exigences en éléments fertilisants	8
I.1.4.2. Exigences édaphiques	9
I.1.4.2.1. Structure et texture du sol	9
I.1.4.2.2. pH	9
I.1.4.2.3. Salinité	9
I.1.4.3. Exigences climatiques	10
I.1.4.3.1. Température	10
I.1.4.3.2. Lumière	10
I.1.4.3.3. Humidité	10
I.1.5. Production de pomme de terre	10

I.1.5.1. Dans le monde	10
I.1.5.2. La filière de pomme de terre en Algérie	11
I.1.5.3. La filière de pomme de terre à Chlef	12
I.1.6. Consommation de la pomme terre	12
I.1.6.1. Dans le monde	12
I.1.6.2. En Algérie	13
I.1.7. La répartition géographique de la culture de la pomme de terre en Algérie	13
I.1.8. Les différentes variétés de pomme de terre cultivées en Algérie	14
I.1.9. Composition et valeur nutritionnelle, et thérapeutique	16
I.2. Le pathogène	18
I.2.1. Généralités sur les <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> spp	18
I.2.2. Historique et évolution de la taxonomie des <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> spp.	18
I.2.3. Ecologie et spectre d'hôtes des bactéries pectinolytiques <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> spp.	20
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> (Pcc)	20
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> (Pcb)	20
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> (Pa)	21
<i>Dickeya</i> spp	21
I.2.4. Les maladies de la pomme de terre dues aux bactéries pectinolytiques	22
I.2.4.1. Le cycle infectieux des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle	23
I.2.4.2. Symptômes sur plant et sur tubercule	24
I.2.4.2.1. Symptômes sur tubercule	24
I.2.4.2.2. Symptômes sur les parties aériennes	25
I.2.5. Transmission des maladies de la pomme de terre dues aux bactéries pectinolytiques	26
I.2.5.1. Rôle du tubercule mère	26
I.2.5.2. Rôle de l'eau et des aérosols	27
I.2.5.3. Rôle des insectes	27
I.2.5.4. Rôle du sol	27
I.2.6. Facteurs de virulence	27
I.2.6.1. Les enzymes extracellulaires	28
I.2.6.1.1. Enzymes pectinolytiques	29
I.2.6.1.1.1. Pectines méthylestérases	30
I.2.6.1.1.2. Pectines acétylestérases	30

I.2.6.1.1.3. Polygalacturonases	30
I.2.6.1.1.4. Pectate lyases	30
I.2.6.1.1.5. Pectine lyases	31
I.2.6.1.2. Les cellulases	31
I.2.6.1.3. Protéases	32
I.2.6.2. Systèmes de sécrétion des enzymes extra-cellulaires	32
I.2.6.3. Surface cellulaire	33
I.2.6.4. Sidérophores	34
I.2.6.5. Production de l'antibiotique carbapénème	34
I.2.6.6. Régulation de l'expression des gènes de virulences chez les bactéries pectinolytiques	35
I.2.7. Génomique des bactéries pectinolytiques	35
I.2.8. Méthodes de détection et d'identification des bactéries pectinolytiques	36
I.2.8.1. Méthodes phénotypiques et biochimiques	37
I.2.8.2. Méthodes sérologiques (immunologiques)	38
I.2.8.3. Méthodes de détection moléculaire	38
I.2.8.3.1. Détection basée sur la PCR avec des amorces spécifiques à l'espèce	38
I.2.8.3.2. PCR multiplex	39
I.2.8.3.3. PCR en temps réel	39
I.2.8.3.4. PCR de séquences répétées (REP-PCR)	39
I.2.8.3.5. Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (PCR-RFLP)	39
I.2.8.3.6. Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés (AFLP)	40
I.2.8.3.7. Polymorphisme de l'ADN Amplifié au Hasard (RAPD)	40
I.2.8.3.8. Analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène de l'ADNr	40
I.2.8.3.9. Multilocus Sequence Analysis (MLSA)	40
I.2.8.3.10. Séquençage de génome entier	40
I.2.8.4. D'autres outils	41
I.2.9. Méthodes de lutte contre les bactéries pectinolytiques	41
I.2.9.1. Pratiques culturales, sanitaires et de prophylaxie	41
I.2.9.2. Lutte chimique	42
I.2.9.3. Lutte génétique	43
I.2.9.4. Lutte biologique	43
I.2.9.5. Lutte Physique	44

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel biologique et échantillonnage	45
II.1.1. Traitement des échantillons	47
II.1.2. Les milieux de culture et solutions	48
II.2. Isolement des bactéries pectinolytiques	48
II.3. Identification des bactéries pectinolytiques	48
II.3.1. Test de virulence sur les tranches de pommes de terre	48
II.3.2. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats	49
II.3.2.1. Détermination du Gram par le test KOH 3%	49
II.3.2.2. Test d'Oxydase	49
II.3.2.3. Test de la catalase	49
II.3.2.4. Test de production d'indole	50
II.3.2.5. Réduction du saccharose	50
II.3.2.6. Tolérance au NaCl à 5%	50
II.3.2.7. Test de croissance à 37°C	50
II.3.2.8. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose	51
II.3.2.9. Identification biochimique par le système API 20 E	51
II.3.3. Identification moléculaire des isolats	51
II.3.3.1. Identification par PCR avec des amorces spécifiques aux genres <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i>	52
II.3.3.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique des isolats	52
II.3.3.1.2. Amplification	52
II.3.3.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	53
II.3.3.2. Identification des isolats par séquençage partiel du gène <i>mdh</i>	53
II.3.3.2.1. Analyse phylogénétique	54
II.3.3.3. Identification des isolats de <i>Pcb</i> par PCR	54
II.3.3.4. Identification des isolats par séquençage du gène de l'ADNr 16S	55
II.4. Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequences Analysis)	55
II.5. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires (pectinases, cellulases et protéase)	57

II.5.1. Test de l'activité pectinolytique	57
II.5.2. Test de l'activité cellulolytique	57
II.5.3. Test de l'activité protéasique	57
II.6. Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre	58
II.7. Test de la réaction d'hypersensibilité	58
II.8. Analyse statistique	59

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Collecte des échantillons	60
III.2. Isolement et purification des bactéries	60
III.3. Identification des bactéries	61
III.3.1. Test de virulence sur les tranches de pommes de terre	61
III.3.2. Identification microbiologique, biochimique et physiologique des bactéries	63
III.3.2.1. Identification biochimique par le système API 20 E	66
III.3.3. Identification moléculaire	69
III.3.3.1. Identification par PCR avec les paires d'amorces Y1/Y2, Pcc-F/Pcc-R, Eca1f /Eca2r et ADE1/ADE2	69
III.3.3.2. Identification par PCR et séquençage du gène <i>mdh</i>	71
III.3.3.3. Identification par PCR avec des amorces spécifiques à Pcb	74
III.3.3.4. Identification des bactéries par séquençage du gène de l'ADNr 16S	75
III.3.3.5. Prévalence et distribution des isolats	77
III.3.3.5.1. La prévalence des bactéries pectinolytiques selon les régions prospectées	78
III.3.3.5.2. Relation entre la prévalence des bactéries pectinolytiques et les saisons	79
III.3.3.5.3. Relation entre la prévalence des bactéries pectinolytiques et les cultivars de pomme de terre	81
III.4. Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequences Analysis)	81
III.5. Activité enzymatique dégradatives des tissus de pomme de terre	86
III.5.1. Activité pectinolytique	86
III.5.2. Activité cellulasique	86
III.5.3. Activité protéasique	86
III.6. Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre	87
III.6.1. Effet du facteur isolat	89

III.6.2. Effet du facteur variété de pomme de terre	90
III.7. Test d'hypersensibilité	92
Conclusion et Perspectives	95
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1: Taxonomie de la pomme de terre	4
Tableau 2: Les principaux pays du monde producteurs de pomme de terre, 2017	11
Tableau 3: Productions de pommes de terre en Algérie, 2010-2017	11
Tableau 4: Productions de pommes de terre à Chlef, 2014-2018	12
Tableau 5: Les principaux pays consommateurs de pomme de terre, par région, 2011	13
Tableau 6: Les principales wilayas productrices de pomme de terre en Algérie, 2017	14
Tableau 7: Liste provisoire des variétés à peau rouge de pomme de terre autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie en 2014	15
Tableau 8: Liste provisoire des variétés à peau blanche de pomme de terre autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie en 2014	16
Tableau 9: Teneur (pour 100g) en vitamines et minéraux des pommes de terre	17
Tableau 10: Les espèces de <i>Pectobacterium</i> et <i>Dickeya</i> et leurs hôtes récemment identifiés	21

Chapitre 2

Tableau 11: Les souches de référence utilisées dans cette étude	45
Tableau 12: Liste des amorces utilisées dans cette étude	56

Chapitre 3

Tableau 13: Origine des isolats utilisés dans cette étude	62
Tableau 14: Propriétés biochimiques et physiologiques des souches isolées à partir de tubercules de pommes de terre malades	65
Tableau 15: Codes obtenus après identification des isolats avec le système API	66

20 E

Tableau 16: Les résultats du test d'identification par la galerie API 20 E	68
Tableau 17: Résultats du test de la PCR avec les amorces spécifiques à Pcb	75
Tableau 18: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon la provenance	79
Tableau 19: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon la saison	80
Tableau 20: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon le cultivar de pomme de terre	81
Tableau 21: Les souches bactériennes étudiées dans cette étude, y compris les souches pour lesquelles des séquences ont été prises à partir GenBank	84
Tableau 22: Valeurs des poids de pourritures des tubercules des cultivars <i>Spunta</i> , <i>Fabula</i> et <i>Agata</i> de la pomme de terre.	88

Annexes

Tableau 23 : Présentation de l'ensemble des échantillons prélevés	
Tableau 24 : Mesure des poids de pourritures des tubercules de pomme de terre pour les variétés <i>Spunta</i> et <i>Fabula</i>	

Liste des figures

Chapitre 1

- Figure 1:** Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre et cycle végétatif 8
- Figure 2:** Les voies de transmission possibles de *Dickeya* spp. et *Pectobacterium* spp. , agents des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle. 24
- Figure 3:** Symptômes de la maladie de pourriture molle causée par *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sur tubercules de pommes de terre 25
- Figure 4:** Nécrose du xylème d'un plant de pomme de terre infecté par *Dickeya dianthicola* 26
- Figure 5:** Régulation globale de la virulence de Pcc 28
- Figure 6:** Voies de la dégradation des pectines chez *Dickeya* spp. 29

Chapitre 2

- Figure 7:** Parcelles de pommes de terre présentant des symptômes typiques de la maladie de la jambe noire dans la région de Chlef 46
- Figure 8:** Exemples d'échantillons de tubercules de pommes de terre présentant des symptômes de la maladie de la pourriture molle 46
- Figure 9:** Carte montrant les régions d'échantillonnage de tubercules et plants symptomatiques des maladies de la pourriture molle et la jambe noire (cercles en rouges) 47

Chapitre 3

- Figure 10:** Formation de cavités sur milieu CVP après dégradation de la pectine 60
- Figure 11:** Aspect des colonies pures des isolats sur milieu King B 61
- Figure 12:** Test de virulence sur les tranches de pommes de terre 61

Figure 13: Profils électrophorétiques des produits de la PCR sur gel d'agarose à 1% avec l'amorce Y1/Y2 des isolats testés	70
Figure 14: Profils électrophorétiques des produits de la PCR sur gel d'agarose à 1% avec l'amorce Pcc-F/Pcc-R des isolats testés	70
Figure 15: Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des séquences partielles du gène <i>mdh</i> (229 nt)	73
Figure 16: Profil électrophorétique des produits amplifiés par PCR avec les amorces BR1f/L1r spécifiques à Pcb sur gel d'agarose à 1%	74
Figure 17: Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des données concaténées de séquences partielles des quatre gènes de ménage <i>atpD</i> , <i>gyrB</i> , <i>infB</i> et <i>rpoB</i> (<i>atpD</i> , 642 nt, <i>gyrB</i> , 747 nt, <i>infB</i> , 615 nt, <i>rpoB</i> , 605-637 nt)	83
Figure 18: Révélation des activités cellulase (Cel), polygalacturonase (PG) et protéase (Prt) de l'isolat HNA24	87
Figure 19: Pouvoir pathogène des isolats testés sur deux cultivars de pommes de terre (<i>Spunta</i> et <i>Fabula</i>) mesuré en pesant le tissu macéré.	91
Figure 20: Résultats du test de pathogénicité sur tubercules de pomme de terre de la variété <i>Fabula</i> , inoculés par quelques isolats testés.	92
Figure 21: Résultats du test de pathogénicité sur tubercules de pomme de terre de la variété <i>Spunta</i> , inoculés par quelques isolats testés.	92
Figure 22: Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de tabac.	93
Figure 23: Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles géranium.	94

Annexes

Figure 24 : Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de tabac

Liste d'abréviation

- % : Pourcentage
- °C : Degré Celsius
- µl : Microlitre
- µm : Micromètre
- µmole : Micromole
- *acnA* : Aconitase hydrase 1
- ADH : Arginine-dihydrolase
- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AHL : Acylhomosérine lactone
- AMY : Fermentation de l'amygdalin
- ANOVA : Analyse de Variance
- ARA : Arabinose
- ARN : Acide Ribonucléique
- *atpD* : ATP synthase F1 sous-unité β
- BET : Bromure d'éthidium
- BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
- CIT : Utilisation de citrate
- CLSI : The Clinical and Laboratory Standards Institute
- CMC : Carboxy-Méthyle-Cellulose
- CNCC : Centre National de Contrôle et Certification des Semences et Plants
- CVP : Crystal Violet Pectate
- DMSO : Di-Methyl Sulf-Oxyde
- dNTPs : Désoxyribonucléotides triphosphates
- DO : Densité Optique
- *E* : *Erwinia*
- EDS : Eau distillée stérile
- EPS : Exopolysaccharides
- EDPV : Enzymes de dégradation de la paroi végétale
- FAO : Food and Agriculture Organization
- FAOSTAT : The Statistics division of FAO

- *gapA* : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A
- GEL : Gelatinase
- GLU : Fermentation de glucose
- GN : Gélose nutritive
- *gyrB* : DNA gyrase B
- H et L : Hugh et Leifson
- H₂O : Eau
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
- H₂S : Production de sulfure d'hydrogène
- ha : Hectare
- HR : Hypersensitive Response
- HRP : Hypersensitive Reaction and Pathogenicity
- *icdA* : Isocitrate dehydrogenase
- IND : Indole
- *infB* : Initiation translation factor 2
- INO : Fermentation de l'inositol
- ITCMI : Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles
- KB : Milieu King B.
- KOH : Hydroxyde de potassium.
- L : Litre
- LB : Luria Bertani
- LDC : Lysine decarboxylase
- LPS : Lipopolysaccharide
- M : Molaire
- MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.
- DRDPA : Direction de la Régulation et du Développement de la Production Agricole
- DSA : Direction de Services Agricoles
- MAN : Fermentation de manitol
- *mdh* : Malate déshydrogénase
- MEL : Fermentation de melibiose
- mg : Milligramme
- MgCl₂ : Magnésium chloride
- min : Minute

- ml : Millilitre
- MLSA : MultiLocus Sequence Analysis
- mm : Millimètre
- mM : Millimolaire
- Mol : Molaire
- Mt : Millions de tonnes
- NaCl : Chlorure de Sodium.
- NCBI : National Center for Biotechnology Information
- nm : Nanomètre
- ODC : Ornithine Decarboxylase
- ONPG : β -galactosidase
- Pb : Paire de base
- Pa : *Pectobacterium atrosepticum*
- Pcb : *Pectobacterium carotovorum subsp brasiliense*
- Pcc : *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum*
- Pco : *Pectobacterium carotovorum subsp. Odoriferum*
- PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
- PCWDE : Plant Cell Wall Degrading Enzymes (Enzymes de dégradation des parois cellulaires de la plante)
- PL : Pectate lyases
- PNL : Pectine lyases
- PG : Polygalacturonases
- PGA : Acide polygalacturonique
- *Pgi* : *Pgi*- glucose-6-phosphate isomerase
- pH : Potentiel d'hydrogène
- PL : Pectates lyases
- PM : Poids moléculaire
- PME : Pectine méthylestérases
- *proA* : *proA*- c-glutamyl phosphate reductase
- Prt : Protéases
- Pw : *Pectobacterium carotovorum subsp. wasabiae*
- QS: Quorum sensing
- RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
- RHA : Fermentation de rhamnose

- rpm : Rotation par minute
- SAC : Fermentation de sucrose
- SCRI : Scottish Crop Research Institute
- SOR : Fermentation de sorbitol
- spp. : Species
- SRPV : Station Nationale de Protection des végétaux.
- subsp. : Subspecies
- SST1 : Système de sécrétion de type I
- SST6 : Système de sécrétion de type VI
- T : Température
- T3SS : Système de sécrétion de type III
- TAE : Tris-acétate EDTA
- TDA : Tryptophan deaminase
- U : Unité
- UFC : Unité Formant Colonie.
- UK : United Kingdom
- URE : Urease
- USA : United State of America
- UV : Ultra-violet
- V : Voltes
- VP : Test de Voges-Proskauer pour la détection d'acétoin

Liste des annexes

Annexe I : Productions Scientifiques (Article joint).

Annexe II : Séquences nucléotidiques partielles des gènes du *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* séquencés pour cette étude.

Annexe III : Travaux réalisés dans le cadre de la thèse.

Annexe IV : Milieux de cultures utilisés.

Annexe V : Identification moléculaire.

Introduction générale

La pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) représente la quatrième culture après le riz, le blé et le maïs dans le monde (Reddy, 2018). Cependant, cette plante est exposée à plus de 200 maladies qui peuvent être d'origine fongique, bactérienne ou virale, réduisant d'une manière considérable le rendement et la qualité des pommes de terre (Arora et Khurana, 2004 ; van der Wolf et De Boer, 2007).

Les bactéries pectinolytiques appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (anciennement *Erwinia*) sont classées parmi les plus importants agents pathogènes de la pomme de terre, causant les maladies de la jambe noire de la pomme de terre aux champs et de la pourriture molle des tubercules aux champs et en post-récolte durant le stockage. Ces maladies sont considérées comme les plus graves qui affectent la pomme de terre, provoquant des pertes économiques et agronomiques importantes à travers le monde (Czajkowski et *al.*, 2015 ; Humphris et *al.*, 2015).

Les phytopathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* sont des bacilles à Gram négatif, et membres de la famille des *Enterobacteriaceae* qui ont notamment pour propriété commune la capacité de dégrader les composants de la paroi végétale grâce à la production d'une panoplie d'enzymes extracellulaires pectinases, cellulases et protéases (Pérombelon, 2002 ; Kõiv et *al.*, 2015).

Bien qu'elles causent les mêmes maladies, les bactéries pectinolytiques diffèrent d'une manière considérable en terme de leur distribution géographique, gamme d'hôtes et virulence (Pitman et *al.*, 2008 ; Panda, 2014). En effet, ces bactéries sont présentes sur tous les continents mais principalement dans les régions tempérées et à températures chaudes, affectant plusieurs espèces végétales, dont certaines sont d'intérêt économique majeur comme la pomme de terre, la tomate ou le maïs (Mantsebo et *al.*, 2014). Toutefois, la prévalence de ces différentes espèces bactériennes est variable d'un pays à l'autre (van der Wolf et *al.*, 2017).

Malgré la diversité (pathologique, écologique, biochimique, génétique, ...) des isolats de *Pectobacterium* et *Dickeya*, ces pathogènes produisent les mêmes symptômes sur les mêmes plantes, et peuvent donc être confondus ; ce qui rend leur discrimination et le diagnostic des maladies très difficile (Des essarts, 2015).

Ce problème est accentué beaucoup plus au cours de cette dernière décennie suite à l'isolement de plusieurs nouvelles espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* associées aux

maladies de la jambe noire et de la pourriture molle sur la pomme de terre dans différents pays (Toth et *al.*, 2011 ; van der Wolf et *al.*, 2014 ; Waleron et *al.*, 2019). Par exemple, une nouvelle sous-espèce de *Pectobacterium* similaire à *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, nommée Pcb, a été isolée au Brésil en 2004 (Duarte et *al.*, 2004 ; Nabhan et *al.*, 2012). Cette bactérie a été ensuite signalée dans plusieurs autres pays tels que l'USA, l'Afrique du Sud, Canada, New Zélande et la Corée (Kim et *al.*, 2009 ; van der Merwe et *al.*, 2010 ; De Boer et *al.*, 2012 ; Panda et *al.*, 2012 ; Choi et Kim, 2013).

Malgré les nombreuses études entreprises depuis longtemps, la jambe noire et la pourriture molle de la pomme de terre demeurent des maladies très destructrices et les moyens de lutte restent à ce jour très insuffisants. Actuellement avec la globalisation du commerce, on assiste aussi à une globalisation de ces agents phytopathogènes, et les dommages causés par ces derniers deviennent de plus en plus importants.

En effet, les données recueillies par ces études s'accordent sur le fait que la détection et l'identification précise de ces pathogènes, qui sont des étapes cruciales pour le suivi épidémiologique de ces maladies et la détermination des sources de contamination, demeurent difficiles (Garlant, 2015).

La filière Algérienne de la pomme de terre occupe une place stratégique dans l'économie de l'Algérie. La pomme de terre est surtout cultivée sur la côte méditerranéenne à climat tempéré. En 2017, l'Algérie a été classée 16^{ème} parmi les 20 premiers pays producteurs de pomme de terre, avec une production estimée à 4.6 millions de tonnes, pour une surface cultivée de 148692 hectares, soit un rendement moyen de 30.9 tonnes par hectare (t/ha) (FAOSTAT, 2019).

Malgré l'importance de la pomme de terre en Algérie, il n'existe que très peu de données sur les maladies de la pourriture molle et la jambe noire et les espèces en cause. Yahiaoui-Zaidi et *al.* (2003, 2010) ont isolé 100 souches appartenant au genre *Pectobacterium*, dont 40 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), 14 *Pectobacterium atrosepticum* (Pa) et 45 n'ont pas été identifiées au niveau de l'espèce ou sous-espèce. La majorité de ces isolats provenaient de cultures de pommes de terre locales, alors que quelques-uns ont été isolées à partir de tubercules de semences importées de la Hollande (Yahiaoui-Zaidi et *al.*, 2003).

L'objectif principal de ce projet était d'améliorer nos connaissances sur la prévalence et la diversité des phytopathogènes pectinolytiques associés aux maladies de la jambe noire et la pourriture molle de la pomme de terre en Algérie, à travers l'isolement et la caractérisation de ces bactéries dans six différentes régions géographiques parmi les plus productrices de pomme de terre, Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaganem, Relizane et Tiaret.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- Isolement des bactéries pectinolytiques à partir de tubercules de pomme de terre atteints de la pourriture molle.
- Caractérisation des isolats par des méthodes microbiologiques et biochimiques, des tests de pathogénicité et par des méthodes moléculaires basées sur la PCR.
- Détermination et comparaison de la diversité génétique des isolats par MLSA en utilisant 5 gènes de ménage.
- Evaluation et comparaison de l'agressivité des isolats par des tests de pathogénicité sur trois variétés de tubercules de pommes de terre et l'induction d'une réaction hypersensible sur feuilles de tabac et de géranium.

Chapitre I :
Revue bibliographique

I.1. La plante hôte

I.1.1. Origine et systématique

Originnaire de l'Amérique du sud, la pomme de terre (*Solanum tuberosum L.*) appartient à la famille des solanacées (Polese, 2006). Le genre *Solanum* regroupe environ 2600 espèces, dont plus de 200 sont tubéreuses et réparties en 21 séries taxonomiques (Hawkes, 1990 ; Gurib-Fakim, 2006).

À ce jour, plus de 5000 variétés de pommes de terre sont présentes dans différentes parties du monde, dont la majorité est principalement regroupée en Amérique du Sud (Zaheer et Akhtar, 2016 ; Majeed et Muhammad, 2018).

La plante fut introduite en Afrique à la fin du 19^{ème} siècle, où elle est rencontrée au nord et au sud du continent Africain (Yahiaoui-Zaidi, 2004).

Tableau 1: Taxonomie de la pomme de terre.

Taxonomie	
Royaume	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Solanales
Famille	Solanaceae
Genre	<i>Solanum L.</i>
Espèce	<i>Solanum tuberosum L.</i>

Source : Acquah (2007)

La pomme de terre est généralement cultivée dans plus d'une centaine de pays au climat tempéré, subtropical ou tropical. Elle pousse surtout dans les régions au climat tempéré frais, la température étant le principal facteur limitant de la production (FAO, 2008).

I.1.2. Description morphologique

La pomme de terre est une espèce herbacée, vivace par ses tubercules mais cultivée le plus souvent en culture annuelle (Rousselle et *al.*, 1996).

La reproduction de cette plante est assurée par le tubercule, qui est à la fois l'organe de multiplication et de consommation (Spire et Rousselle, 1996). Cette plante à fleurs gamopétales, dicotylédones dont plusieurs sont cultivées pour l'alimentation humaine, comporte à la fois des tiges aériennes et des tiges souterraines (Darpoux et Debelley, 1967). Ces caractères morphologiques sont très variables et sont une caractéristique variétale plus ou moins influencée par le milieu (Gallais et Bannerot, 1992).

I.1.2.1. Partie aérienne

La partie aérienne est composée de plusieurs tiges herbacées (tiges principales et latérales) portant des feuilles alternes. La tige principale qui peut atteindre jusqu'à 1 m de longueur, est dressée ou prostrée et porte des feuilles pointues et des fleurs, de couleurs violettes, bleutées et rouges violacées (Rousselle et *al.*, 1996 ; Soltner, 1999 ; Larousse agricole, 2002). Les fleurs sont généralement autogames, ne contiennent pas de nectar, mais souvent stériles d'où la production de fruit est généralement rare parfois nulle. Il existe des variétés de pomme de terre qui fleurissent abondamment mais qui ne fructifient pas (Soltner, 1988).

Le fruit est une petite baie non comestible contenant une quantité significative de solanine, un alcaloïde toxique (Reddy, 2018).

I.1.2.2. Partie souterraine

Le système souterrain représente la partie la plus intéressante de la plante puisqu'il contient le tubercule qui confère à la pomme de terre sa valeur alimentaire. Ce tubercule n'est pas une portion de racine, c'est une tige souterraine représentant environ 75 à 85% de la matière sèche totale de la plante (Rousselle et *al.*, 1996 ; Polese, 2006).

Le tubercule oblong, rond ou réniforme, est l'organe de réserve de la plante, où vont s'accumuler les sucres, riche en eau et en substances nutritives, il se forme à 15 cm environ sous le sol, et rattaché à la tige souterraine (stolon) par l'une de ses extrémités. À l'autre extrémité, se trouve la couronne, qui porte les yeux (bourgeons), disposés selon une hélice plus ou moins régulière (Kleinkopf, 1983). La couleur de la peau du tubercule varie entre le blanc, le jaune, le rouge, le rose, le brunâtre et le violet, tandis que la chair est généralement soit blanche, soit jaune (Bell et *al.*, 2000).

I.1.3. Multiplication et cycle végétatif de la pomme de terre

D'après Vreugdenhil et *al.* (2007), la multiplication de la pomme de terre peut se réaliser par différents modes, à savoir par boutures, par graines ou par tubercules, sachant que ce dernier est le mode le plus courant. Le bouturage est le mode de multiplication le plus approprié, afin d'obtenir un grand nombre de nouveaux tubercules à partir de quelques tubercules de variétés méritantes, tandis que la multiplication par graine ne se pratique que dans le but d'obtenir de nouvelles variétés.

La durée de cycle végétatif de la pomme de terre est très variable, et dépend de l'état physiologique des tubercules qui sont plantés, de l'ensemble des facteurs agro climatiques et des variétés utilisées (Soltner, 1988). Le temps écoulé entre le semis et la récolte est relativement plus court que celui des autres grandes cultures (moins de 90 jours) (Majeed et Muhammad, 2018).

Ce cycle se fait par le tubercule qui sert à la multiplication végétative et se déroule en trois étapes : la dormance, la germination et la tubérisation.

a-Dormance

Après la récolte, la plupart des variétés de pommes de terre traversent une période de dormance où le tubercule ne germe pas, même si les conditions de croissance (température, éclairage et humidité) sont favorables, et sa durée dépend beaucoup de la variété et des conditions d'entreposage, et surtout de la température (Péron, 2006). Pour hâter la germination, on peut traiter chimiquement les tubercules de semence ou les exposer alternativement à des températures élevées et basses (Chaumeton et *al.*, 2006).

b-Germination

Le tubercule commence à germer lorsqu'il est placé dans des conditions favorables aussitôt après la fin de son repos végétatif. Après une évolution physiologique interne, les tubercules deviennent capables d'émettre des bourgeons, cette évolution conduit d'abord à un seul germe qui se développe lentement et dans ce cas c'est toujours le germe issu du bourgeon terminal qui inhibe les autres bourgeons (dominance apicale). Les germes issus du tubercule mère s'allongent lentement et se ramifient latéralement traduisant la perte progressive de la dominance apicale (Bernhards, 1998).

c-Tubérisation

La durée de cette phase varie selon la variété utilisée et les conditions environnementales (Midoune, 2015). Cette phase peut s'étaler sur deux semaines depuis l'initiation des premiers tubercules jusqu'à l'initiation de tous les tubercules (Doumbouya, 2015).

Au bout d'un certain temps, les extrémités des stolons cessent de croître et se renflent pour former les ébauches des tubercules : c'est l'étape de tubérisation (Soltner, 2005). Le grossissement des ébauches de tubercules s'effectue par accumulation dans les tissus des substances de réserve synthétisées par le feuillage. Ce grossissement ralentit puis s'arrête au cours de la sénescence du feuillage qui est la phase finale à laquelle, il y'a arrêt du grossissement du plant (Kechid, 2005). Une hiérarchie s'établit entre ces organes de stockage qui entrent en compétition pour les nutriments : les tubercules croissant le plus vite limitent le développement des autres tubercules (Verhees, 2002).

Les caractéristiques morphologiques de la pomme de terre et son cycle végétatif sont présentés dans la figure 1.

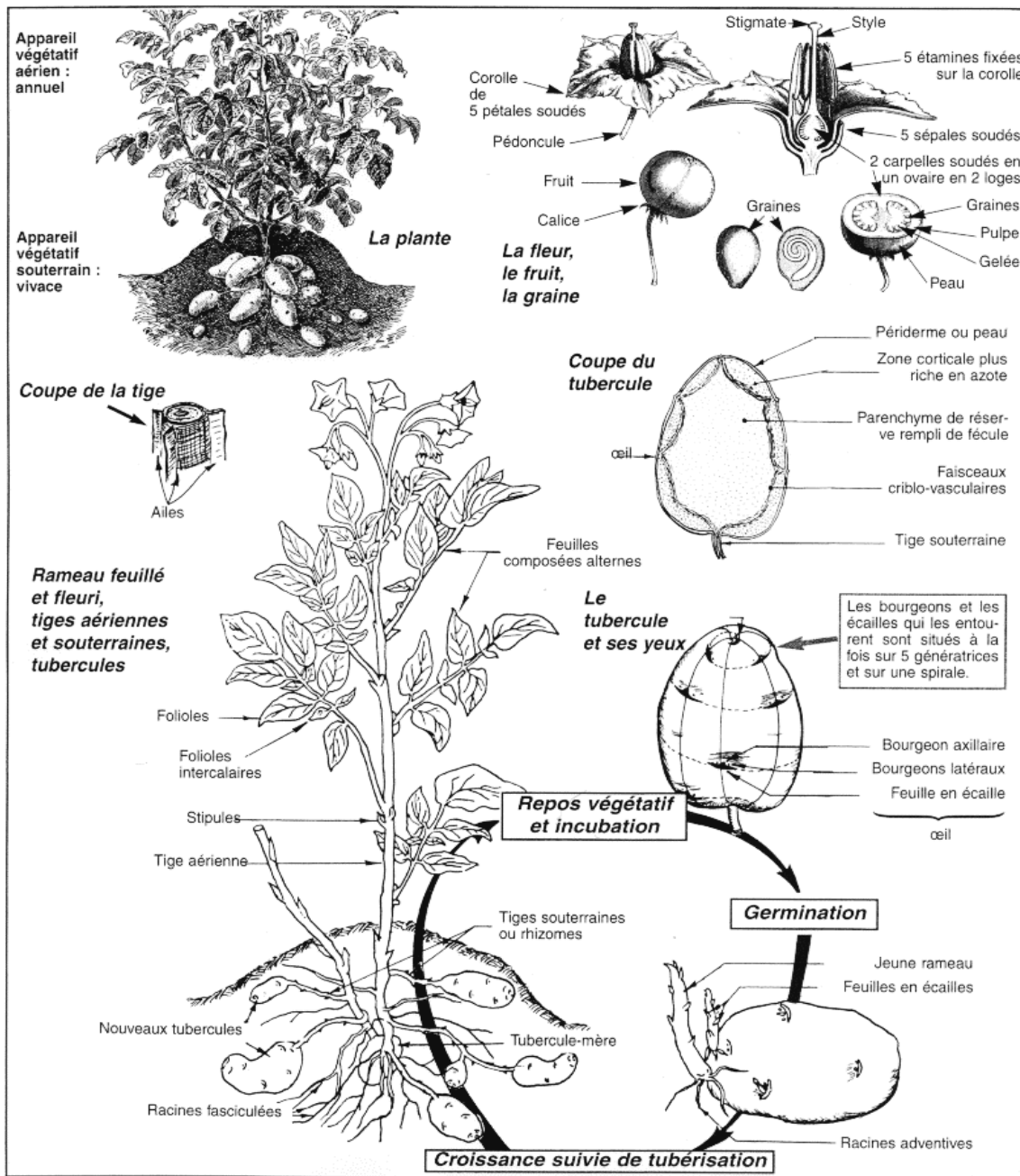


Figure 1: Caractéristiques morphologiques de la pomme de terre et cycle végétatif (Soltner, 2005).

I.1.4. Les exigences écologiques de la plante de pomme de terre

La plante de pomme de terre a des exigences spécifiques, qui sont :

I.1.4.1. Exigences en éléments fertilisants

La pomme de terre se classe parmi les plantes très exigeantes en éléments nutritifs, surtout en azote, phosphore et potassium. Il est donc indispensable de maîtriser la fertilisation pour assurer une bonne qualité des tubercules (Vannetzel, 2011).

Parmi ces éléments nutritifs, l'azote est le facteur déterminant du rendement de la culture puisqu'il favorise le développement du feuillage et même la formation et le grossissement des tubercules, de plus, l'acide phosphorique joue son rôle dans le développement racinaire comme facteur de précocité, tandis que les besoins en calcium, magnésium et soufre sont généralement notables (Belguendouz, 2012).

I.1.4.2. Exigences édaphiques

I.1.4.2.1. Structure et texture du sol

En général, la pomme de terre préfère les sols qui sont profonds, fertiles et meubles (Polese, 2006). Elle se développe mieux dans les sols à texture plus ou moins grossière (texture sablonneuse ou sablo-limoneuse) que dans les sols à texture fine et battante (texture argileuse ou argilo-lumineuse) qui empêchent tout grossissement de tubercule (Patel et Rajput, 2007). Selon Khayi (2015), la texture du sol augmente fortement la densité de la population pathogène.

I.1.4.2.2. pH

La pomme de terre donne de bons rendements sur des terres de sols légèrement acides (pH = 5.5 à 6) (Moule, 1972) ; néanmoins, elle peut s'adapter aux sols faiblement alcalins, tandis qu'une alcalinité excessive du sol peut causer le développement de la galle commune sur tubercule (Chaumeton et *al.*, 2006).

I.1.4.2.3. Salinité

La pomme de terre est une plante modérément sensible à la salinité par rapport aux autres cultures maraîchères. Cependant, un taux de salinité élevé peut bloquer l'absorption de l'eau par le système racinaire (Bustan et *al.*, 2004). De plus, la salinité peut entraîner des anomalies physiologiques dans la pomme de terre, provoquant une réduction de la croissance et du rendement (Rai et *al.*, 2011).

I.1.4.3. Exigences climatiques

I.1.4.3.1. Température

Les températures influencent beaucoup le type de croissance, les températures élevées stimulent la croissance des tiges, par contre les basses températures ont une influence défavorable sur la croissance des tubercules. Les températures optimales de croissance des tubercules se situent entre 15 et 25°C (Patel et Rajput, 2007).

I.1.4.3.2. Lumière

La pomme de terre est une plante héliophile, ses besoins en lumière sont importants surtout pendant la phase de croissance. Cette dernière est favorisée par la longueur élevée du jour (14 à 18h), tandis que les photopériodes courtes inférieures à 12h sont plus favorables à la tubérisation (Moule, 1972 ; Chibane, 1999). La plupart des cultivars utilisés dans les régions à climat tempéré ont des photopériodes critiques comprises entre 13 heures et 16 heures (Rousselle et *al.*, 1996).

I.1.4.3.3. Humidité

L'humidité est un facteur limitant de la production de pomme de terre, ce besoin de grandes quantités d'eau est dû à l'évaporation (Soltner, 1999). Les besoins en eau de cette plante varient au cours du cycle végétatif, ils sont surtout importants lors de l'initiation des tubercules (Crosnier, 1987), sachant qu'un stress hydrique se manifestant à ce stade pourrait être la cause d'une réduction du nombre de stolons formés par tige (Goulet-Fortin, 2009).

I.1.5. Production de pomme de terre

I.1.5.1. Dans le monde

La pomme de terre est la quatrième culture vivrière la plus importante à l'échelle mondiale après le riz, le blé et le maïs (Zhang et *al.*, 2017 ; Reddy, 2018), avec une production mondiale d'environ 388 millions de tonnes en 2017, répartis sur une superficie de près de 19 millions d'hectares (FAOSTAT, 2019). Au cours des dernières années, la production de pommes de terre a connu une augmentation dans les pays en voie de

développement et a actuellement dépassé celle des pays développés (FAO, 2008 ; Midoune, 2015).

L'Asie et l'Europe sont les deux principaux continents producteurs de pomme de terre représentant plus de 80% de la production mondiale (Tria,2009), dont presque le tiers de toutes les pommes de terre est récolté en Chine qui est le premier producteur avec une production de 99.2 millions de tonnes suivi par l'Inde avec 48.6 millions de tonnes, vient ensuite la Russie et l'Ukraine (tableau 2) (FAOSTAT, 2019).

Tableau 2: Les principaux pays du monde producteurs de pomme de terre, 2017.

Pays	Production (millions de tonnes)
Chine	99.2
Inde	48.6
Russie	29.5
Ukraine	22.2
Etats-Unis	20
Allemagne	11.7

Source : FAOSTAT (2019)

I.1.5.2. La filière de pomme de terre en Algérie

Depuis son introduction au milieu du 19^{ème} siècle, la pomme de terre est devenue l'un des produits les plus importants pour l'alimentation de la population Algérienne (Kechid, 2005). Selon la FAO (2019), l'Algérie a occupé la première place dans la production de la pomme de terre en Afrique pour l'année 2017. Les productions de la pomme de terre en Algérie durant la période 2010-2017 sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3: Productions de pommes de terre en Algérie, 2010-2017.

Année	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Production (millions de tonnes)	3.3	3.8	4.2	4.8	4.6	4.5	4.7	4.6

Source : FAOSTAT (2019)

Les chiffres présentés dans le tableau 3 indiquent que la production nationale de la pomme de terre en Algérie est en évolution, elle a augmenté de 3.3 millions de tonnes en 2010 à 4.6 millions de tonnes en 2017 (FAOSTAT, 2019).

I.1.5.3. La filière de pomme de terre à Chlef

La wilaya de Chlef occupe une place importante en matière de production de pommes de terre à l'échelle nationale, cette culture est cultivée selon trois types: primeur, saison, et l'arrière-saison (DSA Chlef, 2019).

Les chiffres de productions de pommes de terre à Chlef durant la période 2014-2018 sont indiqués sur le tableau 4.

Tableau 4: Productions de pommes de terre à Chlef, 2014-2018.

Année	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018
Production (qx)	1272040.00	1295530.00	1265090.00	1133195.00
Superficie (ha)	4411.00	4290.00	4342.00	4045.00

Source : DSA Chlef (2019)

La production est instable d'une année à l'autre et aussi même dans la saison. Durant la période 2014-2018, la production a baissé, et est passée de 12 millions de quintaux à 11 millions de quintaux. Les productions les plus élevées sont celles de la saison avec une production totale de 11 millions de quintaux et une superficie plantée de 40 45.00 hectares en 2018 (DSA Chlef, 2019).

I.1.6. Consommation de la pomme terre

I.1.6.1. Dans le monde

La pomme de terre est l'un des légumes les plus consommés dans le monde sous différentes formes, on compte près d'un milliard de consommateurs (FAO, 2008 ; Anwar et al., 2015).

D'après le tableau 5, on constate que les plus gros consommateurs de pommes de terre sont les Européens avec 84.16 kg / habitant, tandis que la consommation par habitant en Afrique reste modeste, mais elle est en perpétuelle augmentation (Tria, 2009).

Tableau 5: Les principaux pays consommateurs de pomme de terre, par région, 2011.

Région	Consommation (kg / habitant)
Afrique	18.7
Asie	28.99
Europe	84.16
Amérique	36.37
Océanie	47.89

Source: FAOSTAT (2015)

I.1.6.2. En Algérie

Comme cité précédemment, la pomme de terre constitue un aliment de base pour le consommateur Algérien, occupant la deuxième place après le blé (Kechid, 2005 ; Galfout, 2014).

La consommation de pomme de terre en Algérie a triplé en moyenne nationale par habitant et par an, passant de 10.18 kg en 1967 à 33.21 kg en 1988, et à plus de 56.12 kg en 2005, pour atteindre 64.78 kg / habitant / an en 2013 (FAOSTAT, 2015).

I.1.7. La répartition géographique de la culture de la pomme de terre en Algérie

La pomme de terre peut être cultivée dans n'importe quelle région du territoire national y compris dans les oasis du sud du pays (MADR, 2013), et à n'importe quel mois de l'année pourvu qu'il n'y ait pas de gel et de sécheresse (Omari, 2009). Contrairement aux autres pays, cette plante est cultivée trois fois durant l'année en Algérie: la saison, l'arrière-saison et la primeur (Lamara, 2015).

Il est à relever aussi que depuis quelques années les surfaces de cultures sont en constantes augmentation, en occupant de nouvelles zones où elle était pratiquement inconnue

: cas de Sedrata, de Djelfa, du Sud et de Ain Defla (Sadek, 2018). Les zones de production sont réparties comme suit :

- **L'Ouest** : constitué par les wilayas de Tlemcen, Mostaganem, Mascara, Tiaret et Chlef.
- **Au centre**, constitué par les wilayas d'Ain Defla, Tipaza, Alger, Boumerdes et Tizi ouzou.
- **À l'Est**, le petit bassin constitué par la wilaya de Skikda sur le littoral et celle de Guelma, Batna, Sétif et Tébessa.
- **Au Sud**, Il s'agit, en fait, des wilayas d'Adrar, Ghardaïa et surtout El oued (MADR, 2013).

Les principales wilayas productrices de pomme de terre en Algérie sont citées dans le tableau 6.

Tableau 6: Les principales wilayas productrices de pomme de terre en Algérie, 2017.

Wilaya	Production (tonnes)
El oued	1153000
Ain Defla	509344
Mostaganem	439976
Mascara	346401
Bouira	145253
Tyaret	143000
Tlemcen	142350

Source : MADRP-DRDPA (2017)

Sept wilayas produisent près de 70% de la production annuelle : El Oued (28%), Ain Defla (12%), Mostaganem (11%), Mascara (8%), Tiaret, Bouira, Tlemcen (4% chacune).

I.1.8. Les différentes variétés de pomme de terre cultivées en Algérie

L'espèce cultivée de la pomme de terre dans nos régions comprend plusieurs centaines de variétés déterminées par plusieurs critères telles que la forme du tubercule, la couleur de la peau et de la chair, ou encore la durée de conservation et la durée de culture (Boufares, 2012).

Cent cinquante-deux variétés sont inscrites au catalogue officiel Algérien des espèces et variétés cultivées de pomme de terre, comme autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie dont 22 destinées à la transformation (CNCC, 2013).

L'inscription est obligatoire pour leur commercialisation, elle est précédée de deux ans au cours desquels sont évalués les caractères d'utilisation, le rendement, le comportement vis-à-vis des parasites par le service de contrôle et certification des semences et plants CNCC (Boufares, 2012 ; Sadek, 2018).

Dans les variétés à peau blanche on trouve la variété *Spunta* qui est la plus dominante de 40 à 45% et *Fabula* de 10% au centre et l'Est du pays ; les variétés à peau rouge sont représentées par *Désirée* de 15 à 20%, *Kondor* à 15%, *Bartina*, *Amorosa* et les autres variétés occupent le reste du catalogue (Fiche produit pomme de terre Algérienne, 2013). Cependant, du point de vue production, ce sont les variétés rouges qui sont demandées par le producteur parce qu'elles présentent des rendements plus élevés, une grande facilité de stockage, et une plus grande résistance à la sécheresse et au verdissement (ITCMI, 1989).

Les tableaux 7 et 8 présentent les deux listes provisoires des variétés de pomme de terre selon la couleur de la peau, autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie.

Tableau 7: Liste provisoire des variétés à peau rouge de pomme de terre autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie en 2014.

N°	Nom de la variété	N°	Nom de la variété	N°	Nom de la variété
1	<i>Amorosa</i>	10	<i>Cornado</i>	19	<i>Raja</i>
2	<i>Asterix</i>	11	<i>Desiree</i>	20	<i>Red Cara</i>
3	<i>Barna</i>	12	<i>Dura</i>	21	<i>Red Pontiac</i>
4	<i>Bartina</i>	13	<i>Kondor</i>	22	<i>Rodéo</i>
5	<i>Cardinal</i>	14	<i>Kuroda</i>	23	<i>Rosara</i>
6	<i>Carmine</i>	15	<i>Margarita</i>	24	<i>Simply Red</i>
7	<i>Chieftain</i>	16	<i>Oléva</i>	25	<i>Stemster</i>
8	<i>Cleopatra</i>	17	<i>Oscar</i>	26	<i>Symfonia</i>
9	<i>Coralie</i>	18	<i>Pamela</i>	Source : Galfout (2014)	

Tableau 8: Liste provisoire des variétés à peau blanche de pomme de terre autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie en 2014.

N°	Nom de la variété	N°	Nom de la variété	N°	Nom de la variété	N°	Nom de la variété
1	<i>Accent</i>	25	<i>Ballade</i>	49	<i>Hanna</i>	73	<i>Pentland Dell</i>
2	<i>Adora</i>	26	<i>Baraka</i>	50	<i>Hermine</i>	74	<i>Provento</i>
3	<i>Agria</i>	27	<i>Bellini</i>	51	<i>Idole</i>	75	<i>Pentland Square</i>
4	<i>Alaska</i>	28	<i>Burren</i>	52	<i>Ilona</i>	76	<i>Rubis</i>
5	<i>Aida</i>	29	<i>Cantate</i>	53	<i>Isna</i>	77	<i>Remarka</i>
6	<i>Allegro</i>	30	<i>Carlita</i>	54	<i>Jaerla</i>	78	<i>Resy</i>
7	<i>Ailsa</i>	31	<i>Ceasar</i>	55	<i>Kennebec</i>	79	<i>Safrane</i>
8	<i>Ajiba</i>	32	<i>Anola</i>	56	<i>Kingston</i>	80	<i>Sahel</i>
9	<i>Ajax</i>	33	<i>Cosmos</i>	57	<i>Korrigane</i>	81	<i>Samanta</i>
10	<i>Akira</i>	34	<i>Claret</i>	58	<i>Labdia</i>	82	<i>Satina</i>
11	<i>Almera</i>	35	<i>Concurrent</i>	59	<i>Labodia</i>	83	<i>Secura</i>
12	<i>Ambo</i>	36	<i>Daifla</i>	60	<i>Latona</i>	84	<i>Slaney</i>
13	<i>Anna</i>	37	<i>Diamant</i>	61	<i>Liseta</i>	85	<i>Spunta</i>
14	<i>Apoline</i>	38	<i>Ditta</i>	62	<i>Lola</i>	86	<i>Superstar</i>
15	<i>Apollo</i>	39	<i>Escort</i>	63	<i>Maradona</i>	87	<i>Terra</i>
16	<i>Aranka</i>	40	<i>Fabula</i>	64	<i>Mirakel</i>	88	<i>Timate</i>
17	<i>Argos</i>	41	<i>Famosa</i>	65	<i>Monalisa</i>	89	<i>Tulla</i>
18	<i>Ariane</i>	42	<i>Elodie</i>	66	<i>Mondial</i>	90	<i>Ultra</i>
19	<i>Arinda</i>	43	<i>Elvira</i>	67	<i>Savan</i>	91	<i>Valor</i>
20	<i>Armada</i>	44	<i>Estima</i>	68	<i>Novita</i>	92	<i>Vivaldi</i>
21	<i>Arnova</i>	45	<i>Florice</i>	69	<i>Nicola</i>	93	<i>Voyager</i>
22	<i>Atika</i>	46	<i>Folve</i>	70	<i>Obelix</i>	94	<i>Xantia</i>
23	<i>Atlas</i>	47	<i>Frisia</i>	71	<i>O'siene</i>	95	<i>Yesmina</i>
24	<i>Balanse</i>	48	<i>Granola</i>	72	<i>Pamina</i>	96	<i>Ostara</i>

Source : Galfout (2014)

I.1.9. Composition et valeur nutritionnelle, et thérapeutique

La pomme de terre est un aliment énergétique riche en glucides (18%), pauvre en lipides (moins de 1%) et sa teneur en protéines est très élevée par rapport aux autres racines et tubercules. C'est une riche source de vitamines (B1, B3 et B6...) et de sels minéraux (potassium, phosphore et magnésium) (tableau 9) (Nyabyenda, 2005 ; Bonierbale, et al., 2010 ; Zaheer et Akhtar, 2016).

Cette composition varie selon le cultivar, les conditions de croissance et d'entreposage ainsi que le régime de fertilisation (Yaganza, 2005 ; Liu et *al.*, 2007).

Tableau 9: Teneur (pour 100g) en vitamines et minéraux des pommes de terre.

Constituant	Teneur moyenne	Minimum	Maximum
Eau (g)	49	33.6	65.4
Magnésium (mg)	28.1	26	33
Phosphore (mg)	111	96	129.48
Potassium (mg)	550	451	710
Calcium (mg)	12.3	9.3	15
Manganèse (mg)	0.21	0.2	0.25
Fer total (mg)	0.9	0.73	1.26
Cuivre (mg)	0.21	0.13	0.34
Zinc (mg)	0.59	0.38	1.03
Sélénium (µg)	0.27	0.005	0.4
Iode (µg)	14.3	7	29
Bêta-carotène (µg)	3	-	-
Activité vitaminique E (en équivalents alpha-tocophérol) (mg)	0.19	-	-
Vitamine C (mg)	13.3	-	-
Vitamine B1 ou Thiamine (mg)	0.12	-	-
Vitamine B2 ou Riboflavine (mg)	0.03	-	-
Vitamine B3 ou PP ou Niacine (mg)	2.22	-	-
Vitamine B5 ou Acide pantothénique (mg)	0.52	-	-
Vitamine B6 ou Pyridoxine (mg)	0.18	-	-
Vitamine B9 ou Folates totaux (µg)	28	-	-

Source : Bonierbale et *al.* (2010)

Les effets thérapeutiques que possède la pomme de terre sont nombreux; elle possède une action parasympholytique et anti-inflammatoire contre les constipations, gastrites, acidioses et indispositions hépatiques. Grâce à ses propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes, la pomme de terre peut être utilisée pour le traitement des plaies, brûlures et gerçures (Duraffourd et Lapraz, 2002).

Ses qualités nutritives, thérapeutiques et sa facilité de culture font de la pomme de terre un aliment très intéressant, cultivée à travers le monde et occupant une place importante et bien méritée dans nos menus quotidiens.

I.2. Le pathogène

I.2.1. Généralités sur les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp.

Les bactéries phytopathogènes, pectinolytiques et appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (anciennement regroupés sous le genre *Erwinia*), appartiennent à la famille des Entérobactériacées (Hauben et Swings, 2005). Ce sont des bacilles à Gram négatif, d'une longueur de l'ordre de 1-3µm, non sporogènes, mobiles via des flagelles péritriches, se présentent soit sous forme isolée, par paire ou parfois en courtes chainettes (Charkowski, 2006). Elles sont caractérisées par un métabolisme fermentatif ; le type respiratoire est anaérobie facultatif, oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive, leurs températures de croissance optimales varient, selon les espèces, entre 27 et 32°C et leurs températures maximales varient entre 32 et 42°C (Lelliott et Dickey, 1984).

Les bactéries de ces deux genres sont capables de produire des enzymes extracellulaires telles que les pectinases, cellulases et protéases, impliquées dans la dégradation de la paroi végétale et le développement des symptômes de la pourriture molle et de la jambe noire de la pomme de terre et de certains autres végétaux. Ces maladies peuvent se produire au champ ou durant le transport ou le stockage, réduisant de manière significative les rendements et les qualités des cultures, et engendrant ainsi des pertes économiques importantes (Toth et *al.*, 2011).

Durant leur phase de vie non infectieuse, les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. peuvent exister comme épiphytes et endophytes des plantes ou comme saprophytes dans le sol et les eaux (Pérombelon et Kelman, 1980 ; Pérombelon et Salmond, 1995).

Ces bactéries, qui étaient anciennement regroupées dans le genre *Erwinia*, sont maintenant re-classifiées dans deux genres différents, *Pectobacterium* et *Dickeya*. Pour cela, c'est sous cette nouvelle nomenclature que nous les citerons dans ce travail, bien que le titre de la thèse fasse référence au genre *Erwinia*.

I.2.2. Historique et évolution de la taxonomie des *Pectobacterium* et *Dickeya* spp.

La classification des bactéries pectinolytiques *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. a subi plusieurs remaniements au cours du temps. Cela est dû en grande partie à la grande diversité des caractéristiques phénotypiques, biochimiques, génétiques et de la gamme d'hôtes de ce

complexe groupe de phytopathogènes (Costa et al., 2006 ; De Boer et al., 2012 ; Khayi, 2015).

La première bactérie pectinolytique fut décrite pour la première fois par Jones qui l'isola en 1901 à partir d'une pourriture humide de la carotte sous le nom de *Bacillus carotovorus*. En 1902, Appel isola en Allemagne un organisme semblable d'une jambe noire de la pomme de terre qu'il dénomma *Bacillus phytophthorus*, alors que parallèlement aux Pays Bas, Van Hall (1902) isola d'un symptôme similaire une bactérie qu'il nomma *Bacillus atrosepticus* (Hellmers, 1959).

Le genre *Erwinia* a été proposé pour la première fois en 1917 par Winslow et al., et ceci en honneur à un phytopathologiste Américain : Erwin Frink Smith, pour englober toutes les entérobactéries pathogènes des végétaux, incluant à la fois les espèces pectolytiques telles que *E. carotovora* et *E. chrysanthemi* et non-pectolytiques (*E. amylovora*) (Winslow et al., 1917).

En 1945, Waldee proposa le transfert des *Erwinia* pectolytiques (*E. carotovora* et *E. chrysanthemi*) dans un nouveau genre, *Pectobacterium*, sur la base de leur activité pectolytique (Waldee, 1945). Toutefois cette proposition n'a pas été unanimement acceptée par les phytobactériologistes de l'époque ; et il a fallu attendre une cinquantaine d'années, et ceci suite aux nouvelles données fondées sur des méthodes moléculaires (comparaison des séquences du 16S, hybridation ADN-ADN), pour que cette nouvelle nomenclature soit vraiment adoptée par la communauté scientifique (Hauben et al., 1998).

Des analyses moléculaires plus poussées ont abouti à une nouvelle nomenclature des espèces d'*Erwinia*. Les *Erwinia* pectinolytiques sont maintenant réparties dans deux genres, *Pectobacterium* et *Dickeya* (en l'honneur d'un éminent microbiologiste, Robert S. Dickey) (Gardan et al., 2003 ; Samson et al., 2005).

Des bactéries similaires à *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ont été isolées au Brésil à partir de pommes de terre atteintes de la jambe noire, et ont été classifiées comme une nouvelle sous-espèce de *P. carotovorum*, à savoir, *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Duarte et al., 2004). La présence de la sous-espèce *brasiliensis*, a été ensuite reportée dans plusieurs pays, tels que l'USA (Yap et al., 2004 ; Ma et al., 2007 ; McNally et al., 2017), l'Afrique du Sud (van der Merwe et al., 2010), le Canada (De Boer et al., 2012), la Nouvelle Zélande

(Panda et al., 2012), la Corée (Choi et Kim, 2013), le Zimbabwe (Ngadze et al., 2012) et la Hollande (Nunes Leite et al., 2014).

Actuellement, le genre *Pectobacterium* comprend quatre espèces : *P. atrosepticum* (Pa) (anciennement *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*), *P. betavasculorum*, *P. wasabiae* et *P. carotovorum*. Cette dernière est-elle même divisée en huit sous-espèces : *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc) (anciennement *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), *P. carotovorum* subsp. *oderiferum* (Pco), *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcb) (Hauben et al., 1998 ; Gardan et al., 2003 ; Duarte et al., 2004), ainsi que *Pectobacterium parmentieri* (Khayal et al., 2015), *Pectobacterium polaris* (Dees et al., 2017), *Pectobacterium peruvienne* (Waleron et al., 2017), et plus récemment *Pectobacterium punjabense* (Sarfranz et al., 2018) et *Pectobacterium zantedeschiae* (Waleron et al., 2019).

Le genre *Dickeya* est divisé en huit espèces (*D. aquatic*, *D. chrysanthemi*, *D. dianthicola*, *D. dadantii*, *D. fangzhongdai*, *D. paradisiaca*, *D. solani*, et *D. zae*) (Charkowski, 2018).

I.2.3. Ecologie et spectre d'hôtes des bactéries pectinolytiques *Pectobacterium* et *Dickeya* spp.

Bien que *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. sont très proches sur le plan phylogénétique, et utilisent les mêmes stratégies de virulence pour causer les mêmes maladies chez un grand nombre d'espèces hôtes identiques, néanmoins leurs spectres d'hôtes et leurs distributions géographiques ne sont pas totalement chevauchants.

***Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc)**

Pcc possède la particularité de pouvoir infecter un large spectre d'hôtes, y inclut la pomme de terre, la carotte, la laitue, les oignons et le chou chinois (Pérombelon, 2002). Elle sévit dans des régions à différentes températures, aussi bien dans les zones tempérées que tropicales, et s'exprime préférentiellement à des températures plus élevées allant de 20 à 30 °C (Pérombelon et Kelman, 1987 ; Hélias, 2008).

***Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pcb)**

Pcb est un pathogène très agressif qui peut causer des infections sévères chez la

pomme de terre dans les régions tropicales et subtropicales (Brésil et Afrique du Sud). Cependant, des études récentes ont rapporté que cette sous espèce était présente aussi dans les régions à climat tempéré ainsi que dans divers autres régions du monde (Duarte et *al.*, 2004 ; de Haan et *al.*, 2008 ; van der Merwe et *al.*, 2010).

***Pectobacterium atrosepticum* (Pa)**

Pa infecte une gamme d'hôte relativement étroite par rapport aux autres *Pectobacterium* spp., tout en ayant la pomme de terre comme hôte principal (Pérombelon et Kelman, 1980). Elle est présente principalement dans des régions tempérées à climat frais et humide. Contrairement à Pcc, Pa est incapable de croître à une température de l'ordre de 37°C, mais se développe préférentiellement entre 15 et 25 °C (Hélias et *al.*, 1998).

***Dickeya* spp.**

Dickeya spp. peut affecter un grand nombre d'espèces végétales dans les régions à climat tropical et subtropical et s'exprime préférentiellement à des températures plus élevées que *Pectobacterium* spp., allant de 35 à 37°C (Pérombelon et Kelman, 1980).

Le tableau 10 représente les espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* et leurs hôtes.

Tableau 10: Les espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* et leurs hôtes récemment identifiés.

Espèces	Plantes hôtes
<i>Dickeya</i>	
<i>D. aquatic</i>	Isolée de l'eau, plante hôte inconnue
<i>D. chrysanthemi</i>	<i>Chrysanthemum</i> sp. ; <i>Vanda</i> sp.
<i>D. dadantii</i> subsp. <i>dadantii</i> et subsp. <i>dieffenbachiae</i>	<i>Amorphophallus konjac</i> ; <i>Anubias barteri</i> ; <i>Brassica rapa</i> ; <i>Phalaenopsis aphrodite</i> ; <i>Philodendron</i> sp. ; <i>Tagetes patula</i> ; <i>Musa</i> sp. ; <i>Vanilla plantifolia</i>
<i>D. dianthicola</i>	<i>Cichorium intybus</i> ; <i>Solanum tuberosum</i>
<i>D. fangzhongdai</i>	<i>Pyrus</i> sp.
<i>D. paradisiaca</i>	<i>Musa</i> sp.
<i>D. solani</i>	<i>Hyacinthus orientalis</i> ; <i>Solanum tuberosum</i>
<i>D. zae</i>	<i>Musa</i> sp. ; <i>Oryza sativa</i> ; <i>Zea mays</i>
<i>Dickeya</i> sp.	<i>Anasus comosus</i> ; <i>Phalaenopsis</i> sp.

Tableau 10 (Suite)

Espèces	Plantes hôtes
<i>Pectobacterium</i>	
<i>P. aroidearum</i>	<i>Curcubita pepo</i> ; <i>Ornithogalum dubium</i> ; <i>Persea americana</i> ; <i>Saccharum</i> spp. ; <i>Solanum tuberosum</i> ; <i>Zantedeschia aethiopica</i>
<i>P. atrosepticum</i>	<i>Helianthus annuus</i> ; <i>Solanum melongena</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> ; <i>Zantedeschia aethiopica</i>
<i>P. betavascularum</i>	<i>Beta vulgaris</i>
<i>P. brasiliense</i>	<i>Beta vulgaris</i> ; <i>Brassica oleraceae</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> <i>Capsicum annuum</i> ; <i>Cucumis sativus</i> ; <i>Cucurbita pepo</i> ; <i>Nicotiana tabacum</i>
<i>P. carotovorum</i>	<i>Abelmoschus esculentus</i> ; <i>Artemisia absinthium</i> ; <i>Brassica oleraceae</i> ; <i>Cichorium intybus</i> ; <i>Citrellus lanatus</i> ; <i>Cucumis sativus</i> ; <i>Cynara cardunculus</i> ; <i>Echonopsis chamaecereus</i> (syn. <i>Chamaecereus silvestrii</i>) ; <i>Fritillaria imperialis</i> ; <i>Hawthoria</i> ; <i>Ipomoea batatas</i> ; <i>Kalanchoe tubiflora</i> ; <i>Lactuca sativa</i> ; <i>Opuntia</i> sp. ; <i>Orostachys japonica</i> ; <i>Orostachys malacophylla</i> ; <i>Papaver somniferum</i> ; <i>Peperomia obtusifolia</i> ; <i>Peperomia caperata</i> ; <i>Plectranthus australis</i> ; <i>Pilea cadierei</i> ; <i>Pinellia ternata</i> ; <i>Rheum rhabarbarum</i> ; <i>Silybum marianum</i> ; <i>Saintpaulia ionantha</i> ; <i>Solanum lycopersicum</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> ; <i>Spathiphyllum wallisii</i> ; <i>Typhonium giganteum</i>
<i>P. odoriferum</i>	<i>Allium ampeloprasum</i> ; <i>Allium cepa</i> ; <i>Apium graveolens</i> ; <i>Brassica oleraceae</i> ; <i>Brassica rapa</i> ; <i>Cichorium endivia</i> ; <i>Cichorium intybus</i> ; <i>Daucus carota</i> ; <i>Ipomoea batatas</i> ; <i>Petroselinum crispum</i>
<i>P. parmentieri</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>P. wasabiae</i>	<i>Brassica oleraceae</i> ; <i>Eutrema japonicum</i> ; <i>Ipomoea batatas</i> ; <i>Solanum lycopersicum</i> ; <i>Solanum melongena</i>
<i>Pectobacterium</i> sp.	<i>Erythrina indica</i>

Source : Charkowski (2018)

I.2.4. Les maladies de la pomme de terre dues aux bactéries pectinolytiques

Les bactéries des genres *Pectobacterium* et *Dickeya* causent les maladies de la pourriture molle et la jambe noire chez une variété d'espèces végétales d'intérêts

économiques, notamment la pomme de terre, que ce soit en végétation ou lors de la conservation après récolte.

La progression et la nature des symptômes de ces maladies dépendent de facteurs liés aux pathogènes, conditions environnementales (température et humidité) et plantes hôtes (génotype, âge, physiologique, teneur en eau et minéraux, etc...) (Pérombelon, 2002).

I.2.4.1. Le cycle infectieux des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle

Les tubercules de semence et les sols infectés, sont les principales sources d'inoculum causant la contamination des tubercules-fils (De Boer, 2002 ; Yaganza, 2005). Néanmoins, les tubercules peuvent parfois s'avérer asymptomatiques mais être porteurs des bactéries, initiant le cycle d'infection des bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium* et *Dickeya* (figure 2), en présence de plusieurs facteurs favorables, telles que les conditions de stockage et les conditions environnementales, qui doivent être optimales pour le développement de la maladie. L'initiation de l'infection et le développement des symptômes au champ sont fonction de la température, de l'humidité (saturante et des conditions asphyxiantes), du niveau de contamination et de l'état de fertilité du sol (Elphinstone, 1987). La maladie de la jambe noire est généralement favorisée par des sols humides et des températures relativement fraîches.

D'autres sources d'inoculum peuvent jouer un rôle de réservoir pour les bactéries: les repousses de tubercules, le sol de champ, les résidus de culture (pomme de terre ou autres cultures), l'eau d'irrigation et de pluie, les aérosols, mais aussi les diverses opérations culturales et les opérations mécanisées (les machineries contaminées). Ainsi, les blessures causées lors des manipulations techniques (arrachage, récolte, tri) fournissent également des voies d'entrée à l'intérieur des tubercules favorisent le développement des pathogènes.

La dissémination des pathogènes, ainsi la propagation de l'infection sont également facilitées par plusieurs facteurs ; tels que les nématodes, les vers de terre, les insectes. De plus, le manque de maturité, la salinité excessive, les radiations solaires, les dégâts causés par d'autres pathogènes sont également des facteurs favorables au développement des symptômes de pourriture molle (Kettani-Halabi, 2012 ; Moh, 2012 ; Des essarts, 2015).

Reverchon et Nasser en 2013 ont décrit trois principales mécanismes d'infection par les *Dickeya* : (i) l'adhésion à la surface de la plante et la pénétration intra-tissulaire dans la plante, que ce soit à travers des ouvertures naturelles tels que les stomates ou via des blessures; (ii) l'invasion de apoplastes ; et (iii) la dégradation de la paroi cellulaire de la plante. Les voies de transmission possibles de *Dickeya* spp. et *Pectobacterium* sont décrites dans la figure 2.

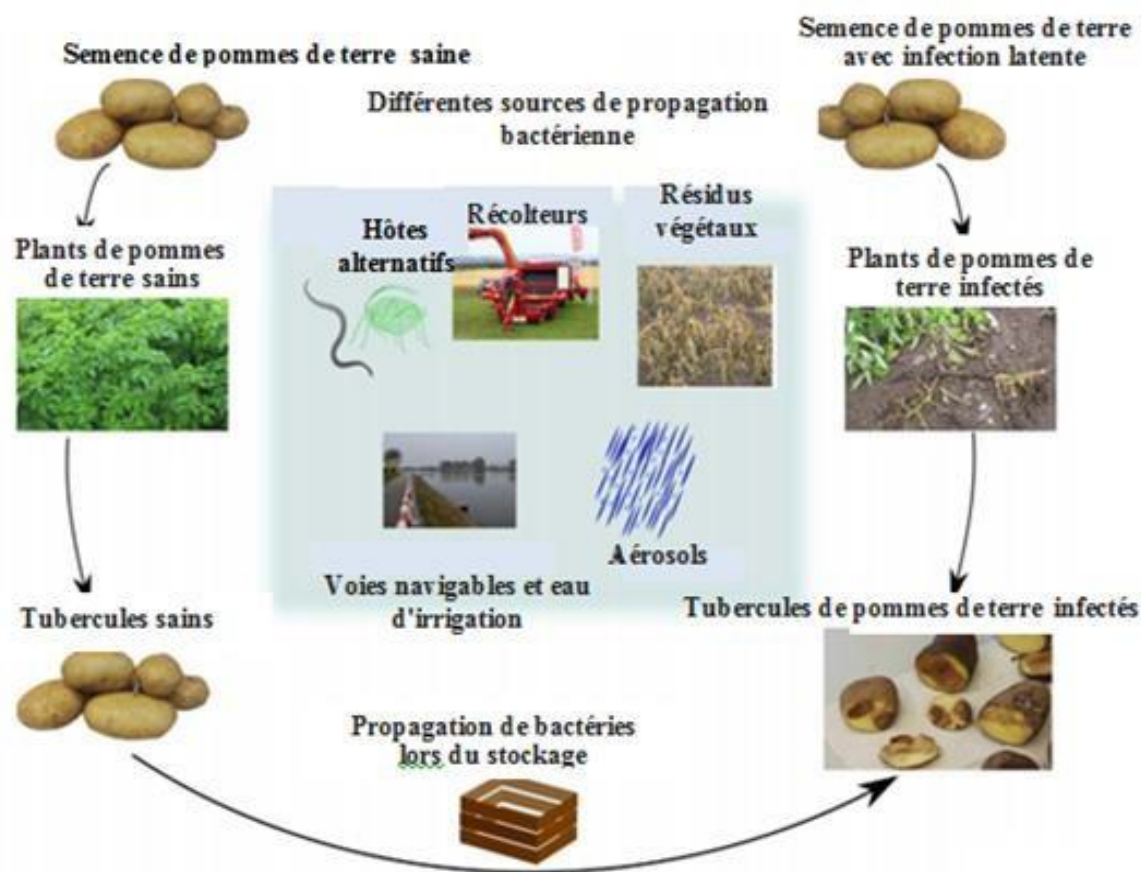


Figure 2: Les voies de transmission possibles de *Dickeya* spp. et *Pectobacterium* spp., agents des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle (adaptée de Motyka et al., 2017).

I.2.4.2. Symptômes sur tubercule et sur plant

I.2.4.2.1. Symptômes sur tubercule

La pourriture molle du tubercule de pomme de terre, due à Pa, Pcc et *Dickeya* spp., est la plus importante maladie bactérienne à l'échelle mondiale, où les tubercules peuvent être infectés au champ avant la récolte ou pendant le stockage (Toth et al., 2003 ; van der Wolf et De Boer, 2007).

À la faveur de conditions adéquates, les attaques précoces de la bactérie au champ peuvent faire pourrir les tubercules-mères avant ou durant la phase germinative et provoquant des manques ou retards à la levée (Moh, 2012). Même après la récolte, les tubercules en stockage peuvent développer des symptômes de pourriture molle (Hélias, 2008).

Des petites taches diffuses d'aspect graisseux peuvent débiter au niveau des lenticelles, puis s'étendent rapidement à l'intérieur du tubercule. La bactérie dégrade les tissus du tubercule provoquant une macération du parenchyme (Moh, 2012). La pourriture molle, d'aspect granuleux et de couleur claire, peut brunir jusqu'au noir (figure 3). De plus, l'odeur nauséabonde très prononcée au niveau des tissus du tubercule est due à la production de poches gazeuses au sein des tissus pourris (Pérombelon et Kelman, 1980). En conditions sèches, les lésions peuvent devenir creuses, dures et sèches (Moh, 2012 ; Des essarts, 2015).

1.2.4.2.2. Symptômes sur les parties aériennes

Pectobacterium spp. et *Dickeya* spp. attaquent la tige du plant de la pomme de terre en cours de végétation provoquant donc la jambe noire (Moh, 2012). Au stade plante, les bactéries colonisent d'abord les vaisseaux du xylème pour se propager ensuite dans l'ensemble de la plante (Czajkowski et al., 2009). Ces phénomènes interrompent le transport de l'eau et des éléments minéraux, vers le sommet de la plante, conduisant à des symptômes de flétrissement et de jaunissement du feuillage (Hélias et al., 2000 ; Laurila et al., 2010).

L'infection induit ensuite une pourriture molle de la tige qui prend une coloration brune foncée à noire, à la base des tiges (figure 4) (Moh, 2012), d'où le nom de maladie de la jambe noire, ainsi que des nécroses plus ou moins sèches (Pérombelon, 2002 ; Hélias, 2008).



Figure 3: Symptômes de la maladie de pourriture molle causée par *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* sur tubercules de pommes de terre (Jackson, 2010).



Figure 4: Nécrose du xylème d'un plant de pomme de terre infecté par *Dickeya dianthicola* (Charkowski, 2018).

Pectobacterium et *Dickeya* décomposent la pectine dans les parois des cellules végétales, mais celle-ci garde sa structure même dans les tissus infectés. Les deux espèces colonisent le xylème et provoquent le noircissement du tissu vasculaire de la plante.

I.2.5. Transmission des maladies de la pomme de terre dues aux bactéries pectinolytiques

La contamination des plants et tubercules de pommes de terre se fait à partir de différentes sources d'inoculum. Les semences et les sols infectés sont les principales sources d'inoculum, et la propagation de l'infection au champ est facilitée par les eaux d'irrigation et de pluie. La dissémination en entrepôt est de son côté assurée par le suintement de tubercules pourris et par les insectes (figure 2) (Yaganza 2005).

I.2.5.1. Rôle du tubercule mère

Le tubercule mère joue un rôle important dans la transmission et la dissémination de *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. (Czajkowski et al., 2009 ; Toth et al., 2011).

Au champ, la contamination de la descendance peut se produire après la pourriture du tubercule mère via le sol (Pérombelon, 2002). En outre, la contamination des tubercules fils peut également se produire à partir du tubercule mère infecté via les stolons susceptibles de transmettre les bactéries au travers le système vasculaire (Hélias et al., 2000). Le seuil minimum d'infection bactérienne permettant au symptôme de la jambe noire ou de la pourriture molle de se développer a été évalué aux environs de 10^3 bactéries par tubercule, ce seuil peut varier en fonction des conditions (Moh 2012 ; Des essarts, 2015).

En stockage, la maladie peut se propager à partir de quelques tubercules infectés au champ (Stevenson et *al.*, 2001), et la pourriture peut s'étendre à tout le stock causant ainsi des dégâts très importants (Pérombelon, 2002). Elphinstone et Pérombelon (1986) ont montré qu'un seul tubercule pourri est capable de contaminer 100 kg de tubercules aux alentours. Pour cela, les pertes économiques qui lui sont reliées peuvent être particulièrement importantes (Sharga et Lyon, 1998).

I.2.5.2. Rôle de l'eau et des aérosols

L'eau constitue une source non négligeable de bactéries *Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp.. Ces bactéries sont présentes dans les eaux de rivière, les pluies, la nappe phréatique, les aérosols et mêmes les océans (Moh, 2012).

La contamination des rivières par *Pectobacterium* spp. a été détectée dans plusieurs régions du monde (Pérombelon et Hyman, 1987 ; Laurila et *al.*, 2008 ; Cahill et *al.*, 2010). Les similitudes entre les souches isolées de pomme de terre et d'eau de rivières suggèrent fortement que ces dernières constituent des sources potentielles de contamination via l'irrigation (Laurila et *al.*, 2007).

I.2.5.3. Rôle des insectes

Les nématodes, les mouches, les pupes, les larves et les larves de certains insectes ou même les vers pourraient être des vecteurs potentiels de dissémination de *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. sur pomme de terre (Pérombelon et Kelman, 1980 ; Muniz et *al.*, 2007 ; Czajkowski et *al.*, 2011).

I.2.5.4. Rôle du sol

Plusieurs études ont montré que les sols ayant une capacité élevée de rétention d'eau (argilo-humiques) favorisent les conditions humides propices au développement des bactéries pectinolytiques, favorisant ainsi la contamination des tubercules et des plants (Bain et *al.*, 1990). La température du sol semble avoir un effet plus marqué sur la survie des bactéries. Les études menées par Pérombelon et Hyman (1989) ont montré que Pa et Pcc peuvent survivre plusieurs semaines, voire plusieurs mois, à des températures de sol avoisinant 10 à 20°C alors qu'elles meurent rapidement dans un sol dépassant les 25°C.

I.2.6. Facteurs de virulence

Les bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium* et *Dickeya* sont capables de causer les maladies de la pourriture molle et de la jambe noire grâce à un important arsenal de facteurs de virulence, principalement un grand nombre d'enzymes extracellulaires, qui leur permettent de s'attacher, pénétrer, proliférer et coloniser leurs plantes hôtes (figure 5) (Plener, 2010).

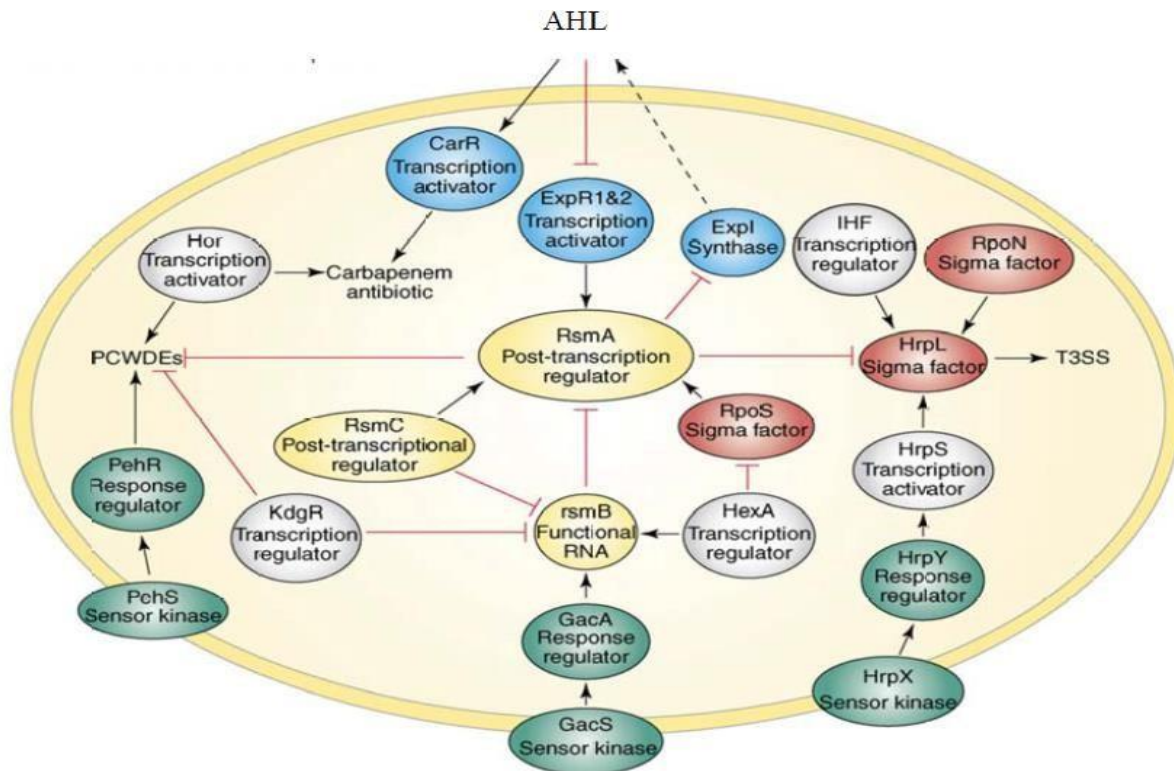


Figure 5: Régulation globale de la virulence de Pcc (Mole et *al.*, 2007).

Éléments en bleu sont associés à la communication de cellule à cellule; éléments verts : les systèmes TCST; éléments rouges : des facteurs sigma; et éléments jaunes font partie du système Rsm. Les systèmes de communication cellule à cellule sont situés en haut, les systèmes TCST sont situés en bas, les enzymes extracellulaires et la régulation des PSE sont situés à gauche, la régulation T3SS est située à droite et les régulateurs globaux sont situés au centre.

I.2.6.1. Les enzymes extracellulaires

La paroi végétale est une structure complexe composée de cellulose, pectine, hemicellulose et de protéines. Une fois dans les tissus de la plante, les bactéries pectinolytiques vont dégrader la paroi des cellules végétales afin de libérer des nutriments qui

leurs serviront comme source de carbone. Les espèces bactériennes responsables de la pourriture molle et la jambe noire sont capables de produire en abondance une très large gamme d'enzymes de dégradation de la paroi végétale (EDPV), pectinases, cellulases et protéases, qui sont essentielles à la pathogénicité et au développement des maladies de la pourriture molle et de la jambe noire (Barras et *al.*, 1994 ; Reverchon et Nasser, 2013).

I.2.6.1.1. Enzymes pectinolytiques

La pectine, le principal constituant de la paroi végétale, est un polysaccharide complexe constitué de résidus d'acides galacturoniques partiellement méthylestérifiés. La dégradation de ce polysaccharide par les phytopathogènes pectinolytiques est donc une étape cruciale dans le processus infectieux et le développement de la maladie (Matsumoto et *al.*, 2003).

Pour dégrader la pectine, les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. produisent différents types d'enzymes pectinolytiques, qui sont classifiées, selon leurs substrats et mode d'action sur le polymère pectine, en quatre principaux groupes, les pectine méthylestérases (PME), polygalacturonases (PG), pectate lyases (PL) et les pectine lyases (PNL) (figure 6).

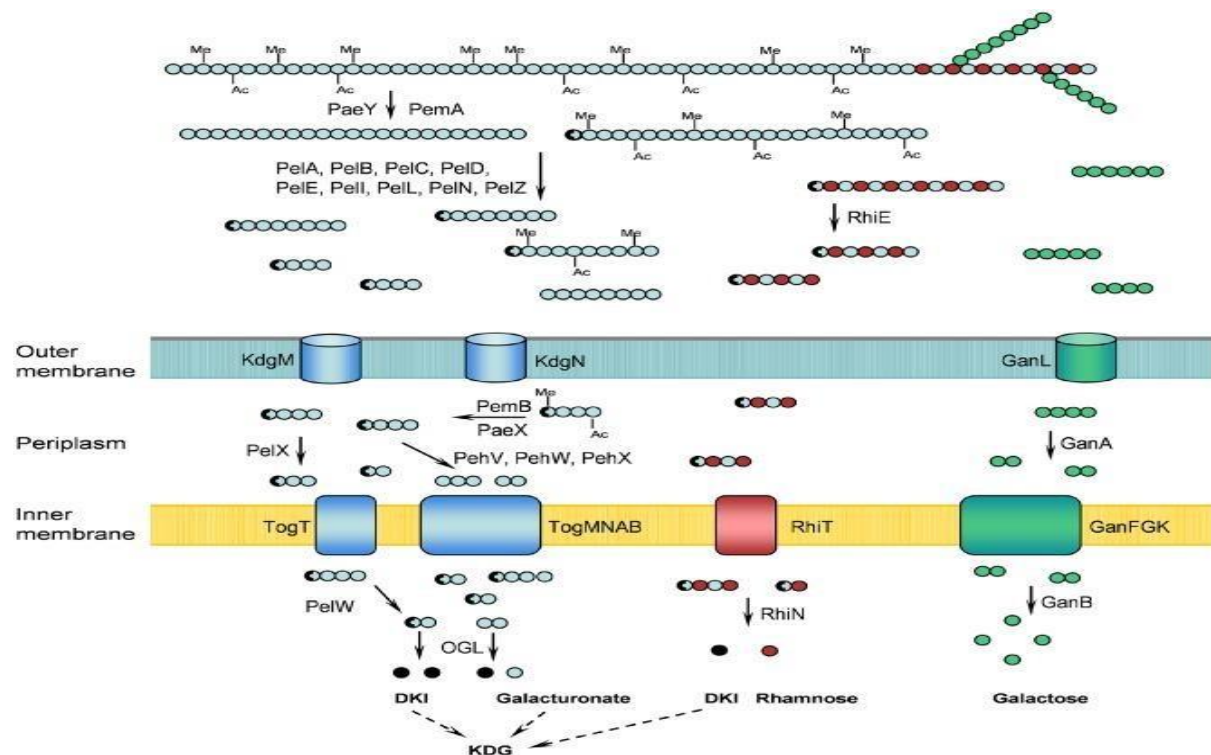


Figure 6: Voies de la dégradation des pectines chez *Dickeya* spp. (Hugouvieux-Cotte-Pattat et *al.*, 2014).

Les groupements méthyles et acétyles des pectines sont éliminés par les estérases extracellulaires PemA et PaeY, respectivement. La chaîne de polygalacturonates est clivée par les endo-pectate lyases PelA, PelB, PelC, PelD, PelE, PelI, PelL, PelN et PelZ. Les oligogalacturonates non-saturés entrent dans le périplasma à travers les porines KdgM et KdgN. Au niveau du périplasma, les groupements méthyles et acétyles restants sont éliminés par PemB et PaeX, respectivement, et les oligomères sont clivés par les exo-pectate lyase PelX et les exo-polygalacturonases PehV, PehW et PehX. Les oligomères sont transportés dans le cytoplasme par les transporteurs TogT et TogMNAB. Enfin, les enzymes cytoplasmiques PelW et OGL génèrent deux monomères, 5-keto-4-deoxyuronate (DKI) et galacturonate, qui sont ensuite métabolisés en 2-keto-3-deoxygluconate (KDG).

I.2.6.1.1.1. Pectines méthylestérases

Les pectines méthylestérases (PEM) (EC 3.1.1.11) sont des enzymes extra-cellulaires qui catalysent la première étape clé dans le processus de l'invasion des tissus végétaux, et qui consiste en la destérification des pectines pour produire la pectate, facilitant ainsi les actions des polygalacturonases et des pectate lyases (Wojciechowski et Fall, 1996).

I.2.6.1.1.2. Pectines acétylestérases

La pectine acétylestérase (EC 3.1.1) hydrolyse l'ester acétylique de la pectine formant de l'acide pectique et de l'acétate. *E. chrysanthemi* 3937 synthétise deux pectine acétylestérases, PaeY sécrétée et PaeX localisée dans le périplasma (Shevchik et Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997).

I.2.6.1.1.3. Polygalacturonases

Les polygalacturonases clivent par hydrolyse la liaison glycosidique α -(1-4) entre deux résidus galacturonanes au niveau des pectates, produisant ainsi des mono-, di- et oligogalacturonates (Pilnic et Rombouts, 1981 ; Kashyap et *al.*, 2001).

I.2.6.1.1.4. Pectate lyases

Les pectates lyases-like catalysent la dépolymérisation des pectines dé-estérifiées par trans-élimination de la liaison glycosidique α -(1-4) entre deux résidus GalA, qui aboutit à la formation d'une double liaison entre le C4 et le C5 à l'extrémité non réductrice du

polysaccharide clivé (Mayans et *al.*, 1997).

Les *Dickeya* spp. sont capables de produire huit pectate lyases, codées par les gènes *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pelL*, *pelZ* et *pelX* (Shevchik et Hugouvieux-Cotte-Pattat, 1997).

I.2.6.1.1.5. Pectine lyases

Les pectines lyases clivent préférentiellement les pectines et les polygalacturonates hautement méthylestérifiés, et libèrent des méthyl-oligogalacturonates insaturés par β -élimination (Hugouvieux-Cotte-Pattat et *al.*, 1996).

Le niveau d'estérification et la distribution des résidus estérifiés tout au long de la chaîne de la pectine varient selon le cycle de vie et les différentes espèces de plantes. Ainsi, le potentiel des microorganismes phytopathogènes de produire une variété d'enzymes pectinolytiques qui diffèrent dans leurs caractéristiques, particulièrement dans leurs spécificité aux substrats, leurs permettent une dégradation plus efficace des molécules de pectines et par conséquent la réussite de l'invasion et l'infection. Les produits de ces réactions sont transportés au périplasme à travers les porines KdgM et KdgN (Blot et *al.*, 2002).

I.2.6.1.2. Les cellulases

La cellulose est un polysaccharide qui consiste en des chaînes de molécules de glucose liées l'une à l'autre par des liaisons glucosidiques.

Les cellulases (*Cel*) sont des endohydrolases des liaisons 1,4- β -D-glucosidiques de la cellulose. Elles agissent en synergie avec les autres enzymes extracellulaires pour attaquer les parois des cellules primaires et secondaires des plantes (Toth et *al.*, 2003). Elles présentent une grande spécificité pour le substrat, hydrolysant préférentiellement l'hydroxyméthyl-cellulose et la carboxyméthyl-cellulose (Laurent et *al.*, 2000).

Pectobacterium et *Dickeya* spp. produisent au moins deux cellulases (Boyer et *al.*, 1984 ; Mae et *al.*, 1995 ; Zhou et Ingram, 2000). Dans certains cas, la mutation d'une seule enzyme suffit à affecter significativement la capacité de macération de la bactérie (Shevchik et *al.*, 1999), ce qui prouve que ces enzymes agissent en synergie pendant les différentes phases de l'infection pour dépolymériser les parois végétales de l'hôte (Plener, 2010).

I.2.6.1.3. Protéases

Les espèces et sous-espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* sécrètent de grandes quantités de protéases (Prt) qui facilitent la dégradation des protéines de la paroi végétale (Kyöstiö et al., 1991). Ces exo-protéines sont secrétées via un système de sécrétion de type (T1SS) (Hollande et al., 2005).

Quelques souches de *Dickeya* telle que *Dickeya dadantii* E16 par exemple, produisent au moins quatre métalloprotéases Prt A, B, C, et G (Delepelaire et Wandersman, 1990 ; Ghigo et Wandersman, 1992 ; Boyd et Keen, 1993). Récemment, Khayi et al. (2015) ont détecté 16 gènes codant pour des protéases chez *Pectobacterium wasabiae*.

Le rôle des protéases est moins clair que celui des enzymes pectinolytiques (Smadja et al., 2004). Selon Kyöstiö et al. (1991), ces enzymes sont produits lors de la macération de pommes de terre, mais elles ne macèrent pas les tissus végétaux. Néanmoins, Marits et al. (1999, 2002) ont montré que les mutants Prt- de Pcc sont moins virulents que le type sauvage, ce qui démontre leur importance dans la pourriture molle de la pomme de terre.

I.2.6.2. Systèmes de sécrétion des enzymes extra-cellulaires

Les bactéries possèdent plusieurs mécanismes de transport de molécules et protéines de leur cytosol vers le milieu extérieur ou directement à l'intérieur de la cellule hôte (Galan et Collmer, 1999). Ces systèmes de sécrétion jouent un rôle important dans la virulence, dont six différents types (SST1- SST6) sont connus chez les bactéries à Gram négatif, y inclut les *Pectobacterium* et *Dickeya* (Tseng et al., 2009).

Chez les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp., les EDPV sont secrétées au milieu extracellulaire à travers le SST1 (protéases) et le SST2 (pectinases et cellulases).

Le SST1 permet la sécrétion des protéases du cytoplasme au milieu extracellulaire en une seule étape. Tandis que la sécrétion des pectinases et cellulases par le SST2 s'effectue en deux étapes, les protéines sont tout d'abord transportées à travers la membrane interne au périplasma par le système Sec, puis les protéines sont exportées à travers la membrane externe de l'espace périplasmique vers le milieu extracellulaire par le système Out composé de 12 protéines Out C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N (Charkowski et al., 2012).

Les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. possèdent aussi un troisième système de sécrétion, SST3, composé d'une vingtaine de protéines codées par un locus nommé *hrp* «hypersensitive response and pathogenicity». Ce complexe protéique, qui n'est pas impliqué dans la sécrétion des EDPV, est comparable à une seringue moléculaire pour injecter directement dans le cytosol des cellules de l'hôte une batterie de protéines dites effecteurs ou harpines. Ces effecteurs jouent un rôle dans la virulence de l'agent pathogène en déjouant le système immunitaire de l'hôte pour évader la détection (Kim et *al.*, 1998).

I.2.6.3. Surface cellulaire

La surface cellulaire des bactéries est la première interface d'interaction entre le pathogène et l'hôte ainsi que la première ligne de défense contre tout obstacle qui peut empêcher l'infection. Plusieurs études de mutagenèse ont démontré que des constituants de la surface cellulaire tels que les exopolysaccharides (EPS), les lipopolysaccharides (LPS), les adhésines et les flagelles jouent un rôle important dans la pathogénicité des *Pectobacterium* et *Dickeya* spp.

Les EPS sont élaborés durant les premières étapes de la colonisation afin de masquer certains constituants bactériens pouvant éliciter des réponses de défense, ou pour protéger la bactérie contre des substances antimicrobiennes de l'hôte (Condemine et *al.*, 1999).

Les LPS contribuent à la résistance des *Pectobacterium* aux substances antimicrobiennes de l'hôte (Val et *al.*, 2006). Des études de mutagenèse ont montré que des mutations dans les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS réduit considérablement la colonisation de l'hôte et la virulence des *Pectobacterium* spp. (Newman et *al.*, 2001 ; Merrell et *al.*, 2002 ; Sofya et *al.*, 2003).

La mobilité à l'aide des flagelles est nécessaire pour la virulence des *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. Plusieurs études ont montré que des mutants non-motiles présentent une perte de virulence sur des plantes. Outre son rôle dans la mobilité, le flagelle peut également servir d'appendice adhésif au début de la phase de colonisation de l'hôte (Josenhans et Suerbaum, 2002 ; Hossain et *al.*, 2005 ; Lautier, 2007).

L'adhésion peut se faire aussi à l'aide de pili ou fimbriae (Craig et *al.*, 2004), des adhésines ou de la couche mucoïde.

I.2.6.4. Sidérophores

Le fer est un cofacteur essentiel à de nombreuses enzymes et participe à de nombreuses voies métaboliques que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes.

Comme de nombreuses bactéries, les phytopathogènes *Pectobacterium* et *Dickeya* spp., en milieu pauvre en fer, produisent des sidérophores capables de complexer le fer ferrique avec une très grande affinité. Les complexes fer-sidérophores sont transportés dans la cellule à l'aide de systèmes de transport spécifiques.

Les deux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* sont capables de produire des sidérophores, chrysobactine et achromobactine par *Dickeya dadanti* et chrysobactine et aérobactine par Pcc. Il a été démontré que des mutants affectés dans la production de ces sidérophores sont affectés dans leur pouvoir pathogène (Expert, 1999 ; Franza et al., 2005).

I.2.6.5. Production de l'antibiotique carbapénème

Les carbapénèmes appartiennent à la famille des antibiotiques β -lactamines (Elander, 2003). Cette molécule est l'acide (5R) -carbapen-2-em-3-carboxylique (Parker et al., 1982), elle est décrite comme une structure résistante à la dégradation par les β -lactamases, possédant un large spectre d'activité par rapport aux bactériocines (Ratcliffe et Alberschonberg, 1982).

Cet antibiotique du lactame est produit par certaines souches de *Pectobacterium* (McGowan et al., 1997), dont le système du quorum sensing (QS) contrôle sa production (Von Bodman et al., 2003).

Plusieurs avantages sont liés à la production de carbapénème, à savoir, la forme physique à *Pectobacterium* en réduisant le nombre de bactéries en concurrence dans le sol ou dans les plantes, macérées ou non (Whitehead et al., 2001). Sa production confère un autre avantage qui réside dans la résistance de *Pectobacterium* au carbapénème et aux antibiotiques apparentés produits par les bactéries concurrentes (Faure et Dessaux, 2007).

Les gènes de production de carbapénème sont regroupés dans un opéron de huit gènes (*carA-H*) et sont contrôlés de manière QS en réponse à l'accumulation de AHL (Pöllumaa et al., 2012).

Quelques souches de Pcc provenant de sources géographiquement diverses produisent de faibles concentrations du carbapénème (Matthew et *al.*, 1998).

I.2.6.6. Régulation de l'expression des gènes de virulence chez les bactéries pectinolytiques

L'utilisation de facteurs virulence multiples par *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. est régulée par un complexe réseau de régulateurs afin de synchroniser et coordonner la virulence avec les conditions environnementales (la présence de pectine ou d'extraits de plantes, la température, l'oxygène, la carence en fer, etc...) et la physiologie de l'hôte. Cette coordination de l'expression des facteurs de virulence est cruciale pour une évaison de la détection par le système immunitaire de l'hôte et le développement d'une infection appropriée (Charkowski et *al.*, 2012).

Pectobacterium et *Dickeya* spp. utilisent un système de communication cellulaire dépendant de la densité cellulaire appelé quorum sensing (QS) pour réguler un grand nombre de gènes impliqués dans la pathogénicité. Le système de QS est basé sur l'utilisation de petites molécules signal appelées auto-inducteurs ou acylhomosérine lactone (AHL).

Le QS permet l'expression des gènes d'EDPV seulement quand la population bactérienne atteint un certain seuil. De cette façon les bactéries peuvent survivre non détectées par les mécanismes de défense de la plante hôte lorsque leur densité est faible, et produisent les EDPV lorsque leur densité cellulaire est assez élevée.

En plus du QS, les *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. possèdent plusieurs systèmes de régulation, appelés systèmes de régulation à deux composantes, qui impliquent deux protéines, une protéine de surface appelée senseur kinase et une protéine cytoplasmique appelée régulateur de réponse. Chaque SEDC régule des gènes ou opéron spécifiques en réponse à des stimulus environnementaux (Mitrophanov et Groisman, 2008 ; Kettani-Halabi, 2012).

1.2.7. Génomique des bactéries pectinolytiques

La disponibilité des séquences d'une centaine de génomes de *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. a contribué énormément à l'amélioration des connaissances à propos des mécanismes moléculaires qui déterminent la pathogénie et la physiologie de ce groupe de pathogènes (Charkowski et *al.*, 2014). Après l'utilisation de ces séquences génomiques de ces

pathogènes pectinolytiques, il deviendra intéressant de développer, améliorer ou travailler à la mise en place de systèmes de détection de ces bactéries (Kang et al., 2003 ; Duarte et al., 2004 ; Pritchard et al., 2013), ainsi à l'élaboration et le développement des expériences s'intéressant à l'étude d'expression des gènes de virulence chez ces agents phytopathogènes (Liu et al., 2008 ; Kõiv et al., 2013).

Aujourd'hui on compte plus de 80 génomes d'espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* disponibles sur NCBI, constituant une base de données importante qui pourrait être utile pour la taxinomie (Khayy, 2015).

Plusieurs auteurs ont démontré dans leur études que les *Pectobacterium* et *Dickeya* possèdent les 6 systèmes de sécrétion décrits chez les *Enterobacteriaceae* (Glasner et al., 2008 ; Charkowski et al., 2012), à l'exception de *P. wasabiae* qui n'a pas de système de sécrétion de type III, ce dernier est largement étudié pour son implication dans les mécanismes de pathogénie et d'interactions hôtes-pathogènes (Kim et al., 2009 ; Pitman et al., 2010 ; Charkowski et al., 2012). Dans une étude rapportant le premier génome de *P. atrosepticum* SCRI1043 en 2004, une analyse a permis la caractérisation des déterminants génétiques de virulence de cette espèce tels que les systèmes de sécrétion, les phytotoxines et les enzymes de macération par comparaison aux pathogènes de plantes ou d'animaux de la famille des *Enterobacteriaceae* (Bell et al., 2004 ; Kwasiborski et al., 2013). Sept ans plus tard, le génome de la souche modèle *Dickeya dadantii* 3937 a été séquencé par la même technologie, dont son génome possède quatre gènes homologues de la famille des toxines insecticides *Cyt* de *B. thuringiensis* qui ne sont pas retrouvés dans Pa (Glasner et al., 2011), des gènes homologues aux gènes utilisés par les entérobactéries pour leur colonisation des nématodes (Grenier et al., 2006).

Khayy et ses collègues ont séquencé plus de 40 souches de *Pectobacterium* et *Dickeya*. De plus, ils ont pu assembler la séquence de *D. solani* 3337, contribuant de cette façon à l'assemblage génomique en utilisant les différentes méthodologies bioinformatiques et outils (logiciels et machines) disponibles au laboratoire (Khayy et al., 2014).

1.2.8. Méthodes de détection et d'identification des bactéries pectinolytiques

La gravité des maladies causées par *Pectobacterium* et *Dickeya* spp. en terme de pertes économiques, impose l'implication de méthodes de détection et d'identification

rapides, faciles et précises, que ce soit au champ ou en stockage, afin de mettre en place des mesures de lutte et de contrôle appropriés contre ces pathogènes (Czajkowski et *al.*, 2009).

Pendant de nombreuses années, la détection et l'identification de ces bactéries pectinolytiques dépendaient uniquement de l'isolement du pathogène sur milieux de culture sélectifs ou semi-sélectifs, tel que le milieu Cristal Violet Pectate (CVP) (Cuppels et Kelman, 1974), suivi d'analyses biochimiques et sérologiques. Plus tard, des techniques moléculaires basées sur l'amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été introduites et sont devenues les plus largement utilisées, en raison de leur grande spécificité, leur rapidité et leur reproductibilité par rapport aux méthodes traditionnelles (Czajkowski et *al.*, 2015), ce qui va accélérer considérablement la lutte contre ces pathogènes, qui demeure une préoccupation importante pour la filière pomme de terre du fait de dégâts provoqués. Cependant, ces méthodes présentant beaucoup d'avantages par rapport aux méthodes conventionnelles sont trop coûteuses pour leur utilisation en routine (Czajkowski et *al.*, 2009).

Quelques méthodes utilisées pour la détection et différenciation des espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* pectinolytiques sont décrites ci-dessous.

1.2.8.1. Méthodes phénotypiques et biochimiques

Ces pathogènes sont identifiés phénotypiquement sur le milieu CVP par la formation de cavités, seul ce milieu qui a été largement utilisé dans le monde entier reste le milieu de diagnostic le plus sélectif et préféré pour l'isolement de ce type de pathogène (Laurila et *al.*, 2008). Cependant, cette détection reste souvent provisoire et insuffisante pour une discrimination interspécifique.

L'approche biochimique était habituellement utilisée pour différencier les espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* des autres bactéries, dont les tests utilisés sont généralement ceux décrits précédemment par Hyman et *al.* (1998). Cependant, en se reposant souvent sur un nombre restreint de caractères, les données des tests biochimiques ne peuvent pas être fiables et même les procédures prennent beaucoup de temps (Czajkowski et *al.*, 2015), pour cela, il est souhaitable de les compléter par des méthodes sérologiques et moléculaires plus rapides décrites ci-dessous.

1.2.8.2. Méthodes sérologiques (immunologiques)

Les méthodes immunologiques de détection des espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* reposent sur une connaissance approfondie des sérogroupes existants.

Cependant, les espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* sont sérologiquement hétérogènes (Czajkowski et al., 2015). De plus, l'hétérogénéité des sérogroupes O présente dans les souches de Pcc infectant la pomme de terre en Europe a rendu la situation plus complexe, ce qui a empêché la mise au point de bonnes méthodes de détection de Pcc basées sur des interactions anticorps et antigènes (De Boer et al., 1979).

En outre, des tests ELISA et des antisérums sont commercialisés, mais les anticorps ne reconnaissent que 68% des souches de *Dickeya* spp. (Samson et al., 1990).

1.2.8.3. Méthodes de détection moléculaire

À l'heure actuelle, les techniques de biologie moléculaire basées sur l'analyse de l'ADN génomique bactérien sont les plus largement utilisées dans les laboratoires modernes pour la détection et la différenciation des espèces pathogènes de la jambe noire et de la pourriture molle des tubercules (Czajkowski et al., 2015). Ces techniques sont basées en grande partie sur les réactions de PCR (Polymérase Chain Réaction). Cependant, la combinaison de la PCR à d'autres techniques moléculaires (RFLP, RAPD, le séquençage...) a permis en plus de l'identification, la caractérisation des souches, la classification et la découverte de nouvelles espèces, et même l'étude de la diversité génétique des espèces et de sous espèces (Kettani-Halabi, 2012).

1.2.8.3.1. Détection basée sur la PCR avec des amorces spécifiques à l'espèce

Dans le passé, les gènes les plus fréquemment choisis étaient ceux associés à la virulence, tels que les gènes *pel* (Darrasse et al., 1994), *pelADE* (Nassar et al., 1996), et *pelY* (Fréchon et al., 1998). Une vaste étude phylogénétique basée sur l'ADNr 16S et la région transcrite intergénique 16S-23S a permis de déterminer d'autres gènes (Duarte et al., 2004).

1.2.8.3.2. PCR multiplex

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique dans leurs travaux, pour la détection des espèces pathogènes de *Pectobacterium* et *Dickeya* (Diallo et al., 2009 ; Potrykus et al., 2014 ; Humphris et al., 2015).

1.2.8.3.3. PCR en temps réel

Une évaluation des outils de PCR en temps réel développés par des laboratoires pour *D. solani* et *D. dianthicola* a été réalisée sur une large collection de souches (Elphinstone et al., 2011), en utilisant ainsi des souches types représentatives des six espèces de *Dickeya* (Samson et al., 2005). D'autres analyses PCR en temps réel ont été réalisées pour la détection du *Dickeya* spp. (Laurila et al., 2010) et Pwa (Kim et al., 2011).

1.2.8.3.4. PCR de séquences répétées (REP-PCR)

Les techniques basées sur la REP-PCR ont été largement utilisées pour la classification et la caractérisation des souches de *Pectobacterium* et de *Dickeya* dans plusieurs travaux, comme par exemple dans l'identification et la caractérisation des espèces de *Pectobacterium* et *Dickeya* isolées en Italie, en Afrique du Sud et au Zimbabwe (Buonauro et al., 2002 ; Ngadze et al., 2012 ; Moretti et al., 2016). Cette technique a permis aussi la classification d'un nouveau clade de *Dickeya* spp. biovar 3, *D. solani* (Degefu et al., 2013).

1.2.8.3.5. Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (PCR-RFLP)

Afin de différencier les espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya*, deux groupes des gènes ont été principalement utilisés ; les gènes internes (*l'ADNr 16S*, *l'ADNr 23S*, *RecA*, *gyrA*, et *gyrB*), et des gènes codant pour les facteurs de virulence (les gènes *pel*, les gènes *hrp*) (Czajkowski et al., 2015). Plusieurs auteurs ont appliqué la PCR-RFLP dans leurs travaux, à savoir Darrasse et al. (1994) ; Waleron et al. (2002) ; Yahiaoui-Zaidi et al. (2003) et Moretti et al. (2016).

1.2.8.3.6. Polymorphisme de Longueur de Fragments Amplifiés (AFLP)

L'analyse AFLP a permis de séparer clairement les Pcc de Pcb et de les regrouper en 12 groupes, provenant de divers emplacements géographiques (Yishay et *al.*, 2008 ; Nabhan et *al.*, 2012b ; Ngadze et *al.*, 2012).

1.2.8.3.7. Polymorphisme de l'ADN Amplifié au Hasard (RAPD)

La technique RAPD a été utilisée pour différencier les isolats de Pcc, de Pa des *Pseudomonas* spp. fluorescents pectinolytiques (Parent et *al.*, 1996).

1.2.8.3.8. Analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène de l'ADNr

Toth et *al.* (2001) ont décrit l'utilisation de la 16S-23S combinée avec la PCR (ITS-PCR) suivie par polymorphisme de restriction (ITS-RFLP) comme outils de base pour l'identification et la différenciation de *Pectobacterium* spp. Deux années plus tard, Fessehaie et *al.* (2003) montre que la phylogénie à base de 16S-23S s'est avérée plus efficace pour séparer les sous-espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* que lorsque l'analyse d'ADNr 16S était appliquée seule.

1.2.8.3.9. Multilocus Sequence Analysis (MLSA)

L'approche MLSA basée sur l'amplification des gènes constitutifs (*acnA*, *gapA*, *icdA*, *mdh*, *mtlD*, *pgi*, et *proA*) a été utilisée pour analyser la phylogénie des sous espèces de *Pectobacterium* (Kettani-Halabi, 2012). Elle a été également appliquée pour différencier les isolats des espèces de *Pectobacterium* et de *Dickeya* (Pitman et *al.*, 2010 ; Waleron et *al.*, 2013 ; Moretti et *al.*, 2016). En outre, Nabhan et *al.* (2012a) et Nykyri et *al.* (2012), ont utilisé le MLSA en combinaison avec d'autres méthodes pour reclasser certaines espèces.

1.2.8.3.10. Séquençage de génome entier

Le développement du séquençage du génome entier et l'annotation a entraîné une augmentation rapide des données génomiques facilement disponibles pour la détection et l'identification de ces pathogènes (Pritchard et *al.*, 2012). Jusqu'à juillet 2014, 24 et 22 génomes d'espèces de *Dickeya* spp. et de *Pectobacterium* spp. respectivement ont été entièrement séquencés, annotés, et publiés en ligne sur différentes base de données, à savoir le

Centre Américain pour les informations biotechnologiques (NCBI), pour pouvoir être utilisé par la suite dans les analyses comparatives (Czajkowski et *al.*, 2015).

1.2.8.4. D'autres outils

Plusieurs techniques différentes que celles de la biologie moléculaire ont été utilisées pour identifier les *Pectobacterium* et *Dickeya*, telle que la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette technique qui a été utilisée dans plusieurs études a efficacement permis de différencier plusieurs souches de *Pectobacterium* (De Werra et *al.*, 2015 ; Šalplachta et *al.*, 2015 ; Waleron et *al.*, 2019).

1.2.9. Méthodes de lutte contre les bactéries pectinolytiques

Les maladies phytopathogènes sont responsables de pertes économiques et agronomiques importantes dans le monde. Chaque année, la production agricole mondiale est réduite de 12 à 14%, 15% des dommages étant d'origine bactérienne (Kettani-Halabi, 2012). Le contrôle des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle de la pomme de terre est difficile, et à ce jour, il n'existe aucun moyen de lutte efficace contre ces maladies (Khayy, 2015). Cependant, plusieurs stratégies de lutte sont proposées ou en cours d'étude telles que la lutte chimique, la lutte génétique et la lutte biologique (Latour et *al.*, 2008 ; Czajkowski et *al.*, 2011). Le but de ces stratégies est de réduire d'une part les niveaux d'inoculum au départ de culture et d'autre part, à rechercher les conditions qui ralentissent la multiplication et la transmission de la maladie (Moh, 2012).

1.2.9.1. Pratiques culturelles, sanitaires et de prophylaxie

Ces méthodes permettent de limiter les dommages, en évitant la contamination des lots et en améliorant les conditions de production et de stockage de pommes de terre (Des essarts, 2015).

De plus, le nettoyage et la désinfection de tous les équipements qui entrent en contact avec les pommes de terre sont recommandés (RAP, 2017). Ainsi, l'utilisation de sols filtrants, de champs bien drainés et / ou ayant fait l'objet d'un travail du sol permettant leur assèchement est une mesure bénéfique pour réduire une humidité excessive autour des tubercules plantés, favorable à leur détérioration précoce (Hélias 2008).

Une récolte à des températures inférieures à 20°C et par temps sec est préférée. Il est aussi important d'assurer une bonne subérisation des blessures après l'opération de tranchage des semences avant leur plantation (Yaganza, 2005).

Les risques de blessures des tubercules peuvent être réduits par le bon réglage des machines agricoles pendant les opérations de récolte, de manutention et de calibrage (Van Vuurde et de Vries, 1994). Assurance d'un bon espacement des plants au champ (Howard et al., 1994 ; Agrios, 1997), ainsi que la pratique des rotations de cultures permettent également de réduire l'incidence de cette maladie (Stevenson et al., 2001 ; Yaganza, 2005).

Aussi, les producteurs peuvent simplement limiter la maladie de la pourriture molle pendant le stockage par l'élimination des tubercules endommagés ou malades (Kettani-Halabi, 2012).

I.2.9.2. Lutte chimique

En plus des mesures prophylactiques, les agriculteurs ont parfois recours à l'utilisation des produits chimiques peu efficaces pour des raisons de protection de l'environnement tels que les traitements à base de cuivre ou d'argono-mercure (Priou et Jouan, 1996).

Ainsi, l'immersion de tubercules de pommes de terre dans l'acide citrique, acétique, ascorbique ou malonique réduit le pourrissement des tubercules par le Pcc (Des essarts, 2015). Mills et al. (2006) ont montré qu'un traitement préventif des tubercules par un ensemble de sels inorganiques et organiques, tels que l'acétate d'aluminium, le méta-bisulfite de sodium, le benzoate de sodium, le sorbate de potassium, le propionate de calcium, l'hypochlorite de sodium, le bicarbonate de sodium et le sulfate de cuivre, peut inhiber la croissance des *Pectobacterium* in-vitro et altérant l'intégrité cellulaire bactérienne.

Une étude récente a montré que les amendements de sol calciques réduisent les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle pendant la saison de croissance en Zimbabwe (Ngadze, 2018).

Une réduction des dommages durant la récolte et le maintien des propriétés texturales et structurales des membranes végétales des tubercules peuvent être assurés par un

prétraitement par du CaCl₂ sur les tubercules irradiés aux rayons Gamma (Nayak et *al.*, 2007).

En plus de l'inefficacité des produits chimiques sur les pathogènes pectinolytiques, ils constituent aussi une menace non négligeable pour la communauté microbienne bénéfique vue le risque d'altération des équilibres écologiques dans la rhizosphère.

I.2.9.3. Lutte génétique

L'utilisation de tubercules de semences saines et certifiées réduit la charge bactérienne sur les tubercules et donc diminue la chance de développement de la maladie. Le choix de variété résistante est aussi à privilégier ainsi, l'amélioration de la résistance est considérée comme une des meilleures stratégies de lutte contre les maladies bactériennes (Pérombelon et Hyman, 1992).

I.2.9.4. Lutte biologique

La lutte biologique représente une stratégie alternative aux luttes chimiques et génétiques contre les *Pectobacterium* et *Dickeya*.

Cette approche est basée sur la capacité d'un agent biologique (virus, bactéries, et champignons) à entrer en compétition avec un agent pathogène dans le but de limiter l'infection de ce dernier (Compant et *al.*, 2005).

L'efficacité de l'utilisation des actinomycètes contre les *Pectobacterium* a été montrée par Baz et *al.* (2012). Les actinomycètes agissent par la production des substances antibiotiques qui inhibent la croissance des *Pectobacterium* et par conséquent le développement de la pourriture molle de différents cultivars de pommes de terre causé par Pcc et Pa.

Très récemment, quinze souches de *Bacillus*, isolées de la rhizosphère de la pomme de terre ont montré une activité inhibitrice contre les souches de Pcc in vitro (Gerayeli et *al.*, 2017). Cladera-Olivera et *al.* (2006) ont montré qu'une bactériocine produite par la souche *Bacillus Licheniformis* P40 possède un effet bactéricide sur Pcc. De même, *Bacillus substilis* BS 107, produisant des antibiotiques, possède une activité antagoniste vis-à-vis Pcc et Pa (Sharga et Lyon, 1998).

Pseudomonas a été suggéré aussi comme protecteur efficace des tubercules de pomme de terre contre la jambe noire et la pourriture molle en raison de sa sécrétion de plusieurs métabolites antibactériens comme des sidérophores (Krzyzanowska et *al.*, 2012 ; Des essarts, 2015). De plus, les bactéries lactiques constituent un groupe de grand intérêt dans la lutte biologique, elles sont capables d'inhiber la croissance de *Pcc* et *Dickeya* en produisant plusieurs composés tels que les acides organiques sidérophores ou le peroxyde d'hydrogène (Czajkowski et *al.*, 2011).

Toutefois, l'application de la lutte biologique aux maladies de la pomme de terre demeure au stade expérimentale, où très peu d'études ont été menées au champ pour prouver la capacité des antagonistes à limiter le développement du pathogène.

I.2.9.5. Lutte Physique

Plusieurs moyens de lutte physique (température, humidité et aération) permettent de lutter contre ces agents pathogènes. Ces approches sont mises en œuvre principalement pendant le stockage afin de préserver de bonnes conditions de stockage et pour éviter d'accroître la charge bactérienne potentielle autour des tubercules. Un contrôle de température et d'humidité et un maintien d'une aération adéquate au cours de cette étape permettent de limiter l'infection ainsi que la propagation du pathogène (Czajkowski et *al.*, 2011 ; Des essart, 2015).

Chapitre II :
Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique (LMGB) du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef (UHBC), laboratoire de Phytopathologie de la Station Régionale de la Protection des Végétaux (SRPV) de Chlef, Algérie, et laboratoire de Phytopathologie du Département des Sciences Agronomiques, Alimentaires et d'Environnement (DSA3), Université de Perugia, Italie.

II.1. Matériel biologique et échantillonnage

Durant la période entre 2012-2016 des échantillons de pomme de terre présentant des symptômes caractéristiques de la pourriture molle (les parties infectées sont de couleur crème à brune, avec une odeur désagréable caractéristique) et de la jambe noire (figure 7 et 8) ont été collectés sur les champs de culture et à partir des chambres de stockage dans des régions d'Algérie connues par leur production importante de pommes de terre : à savoir Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaganem, Relizane et Tiaret (figure 9).

Les souches de référence utilisées dans cette étude (tableau 11) proviennent de la collection de bactéries phytopathogènes du Département des Sciences de l'Agriculture, de l'Alimentation et de l'Environnement, Unité de la protection des végétaux, Université de Perugia, Italie (DAPP-PG).

Tableau 11: Les souches de référence utilisées dans cette étude.

Code	Souche
DAPP-PG 764	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
DAPP-PG 749	<i>P. wasabiae</i>
DAPP-PG 758	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>
DAPP-PG 759	<i>P. atrosepticum</i>
DAPP-PG 218	<i>Dickeya chrysanthemi</i>

Les variétés de pommes de terre collectées, la date et le lieu de prélèvement sont mentionnés dans le tableau 23 (annexe III).



Figure 7: Parcelles de pommes de terre présentant des symptômes typiques de la maladie de la jambe noire dans la région de Chlef.



Figure 8: Exemples d'échantillons de tubercules de pommes de terre présentant des symptômes de la maladie de la pourriture molle (A) et des plants de pommes de terre présentant des symptômes de la maladie de la jambe noire (B), ayant servi pour l'isolement.



Figure 9: Carte montrant les régions d'échantillonnage de tubercules et plants symptomatiques des maladies de la pourriture molle et la jambe noire (cercles en rouges).

Une fois prélevés, les échantillons sont mis dans des sacs en papier sellés et transportés au laboratoire pour être traités le même jour ou conservés à 4°C (pour quelques jours).

II.1.1. Traitement des échantillons

Le traitement des échantillons a été réalisé selon la méthode décrite par Pérombelon et van der Wolf (2002). Brièvement, les échantillons prélevés de tubercules sont lavés puis désinfectés superficiellement à l'eau de javel 5% et séchés. Ensuite, un grattage du matériel infecté a été effectué à l'aide d'un scalpel stérile, les fragments sont déposés dans une boîte de Pétri contenant 2 ml d'eau distillée stérile puis dilacérés finement et maintenus en macération pendant 20 min à température ambiante. Le macérât obtenu est récupéré pour faire l'isolement des bactéries.

II.1.2. Les milieux de culture et solutions

La composition des milieux de culture et des solutions utilisés dans cette étude est présentée dans l'annexe IV.

II.2. Isolement des bactéries pectinolytiques

Pour l'isolement du pathogène, des dilutions en série (1/10) des macérâts ont été effectuées, puis un volume de 0.1 ml de chaque dilution a été étalé sur la surface du milieu sélectif d'isolement Crystal Violet Pectate (CVP), préparé selon le protocole décrit par Hélias *et al.* (2012). Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 à 48h à 27°C.

Après incubation, seulement les colonies individuelles formant des cavités sur le milieu CVP sont purifiées par un repiquage successif sur le milieu King B afin d'obtenir des colonies pures pour être soumises à d'autres tests de caractérisation. Les isolats sont ensuite conservés à - 80°C dans du glycérol à 15 %.

II.3. Identification des bactéries pectinolytiques

Afin d'identifier les bactéries pectinolytiques, nous avons suivi une procédure basée sur plusieurs tests successifs : virulence, moléculaire, physiologiques et biochimiques.

II.3.1. Test de virulence sur les tranches de pommes de terre

Etant donné que les bactéries ciblées dans cette étude sont responsables de la pourriture molle chez les tubercules de pommes de terre, le test de virulence sur les tranches de pommes de terre permettra d'éliminer les bactéries indésirables et de garder uniquement les bactéries produisant les symptômes de la maladie de la pourriture molle.

Les tubercules de pommes de terre ont été lavés avec de l'eau et désinfectés par l'eau de javel diluée pour éliminer les bactéries se trouvant sur la surface des tubercules. La pomme de terre est ensuite découpée en tranches plus ou moins de la même taille et mises dans des boîtes de Pétri stériles, contenant du papier absorbant humide pour favoriser le développement du symptôme. Des colonies bactériennes de chaque isolat ont été déposées sur la surface des tranches de pommes de terre, puis incubées à 27°C pendant 24h. Le résultat est considéré positif lorsque les symptômes de pourriture molle apparaissent sur les tranches (Pérombelon et van der Wolf, 2002).

II.3.2. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats

Les isolats ayant montré une activité pectinolytique sur le milieu CVP et possédant un pouvoir pathogène sur les tranches de pommes de terre, ont été soupçonnés être *Pectobacterium spp.* ou *Dickeya spp.*, et ont été soumis à des tests physiologiques et biochimiques : réaction de Gram, les tests de catalase et oxydase, l'activité oxydative-fermentative, la production de substances réductrices à partir du saccharose, croissance à 37°C, la tolérance à 5% de NaCl, la production d'indole à partir de tryptophane et une identification avec le système Api 20 E.

II.3.2.1. Détermination du Gram par le test KOH 3%

La réaction de Gram a été effectuée par la méthode de solubilisation de KOH décrite par Ryu (1940). Pour cela, deux gouttes d'une solution de KOH à 3% ont été mises en contact avec une colonie bactérienne de 24 à 48 heures, tout en agitant légèrement le mélange.

Le Gram est considéré négatif s'il y a formation d'un filament visqueux (agglutination). En cas d'absence de filaments, il s'agit de bactérie Gram positif.

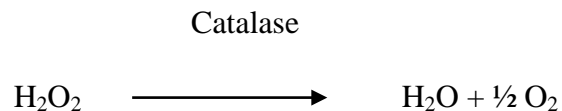
II.3.2.2. Test d'Oxydase

Ce test permet la détection de l'enzyme cytochrome C oxydase qui réduit l'O₂.

Une colonie bactérienne est mise sur un disque d'oxydase humidifié légèrement avec une goutte d'eau distillée stérile. Le disque prend une couleur violette si la bactérie est oxydase positive, en cas d'absence de la coloration après 30 secondes, la bactérie est oxydase négative (Pérombelon et van der Wolf, 2002).

II.3.2.3. Test de la catalase

La catalase est une enzyme respiratoire qui catalyse la libération de molécules d'eau et d'oxygène à partir du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



L'activité catalase a été révélée en déposant une goutte de H₂O₂ sur une colonie bactérienne sur une lame en verre.

La réaction est positive lorsqu'il y a une effervescence (Hyman et *al.*, 1998).

II.3.2.4. Test de production d'indole

Un milieu de culture liquide (indole) est inoculé avec une colonie bactérienne, puis incubé pendant 24 à 48 heures à 27°C. Une réaction positive est traduite par la formation d'un anneau rose après l'addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs, indiquant une production d'indole à partir de tryptophane (Pérombelon et van der Wolf, 2002).

II.3.2.5. Réduction du saccharose

Ce test permet de déterminer si la bactérie transforme le sucrose en substances réductrices.

Des colonies fraîches de 24h sont inoculées dans 2 ml du milieu à 5% de saccharose. Après incubation à 27°C pendant 2 à 3 jours, la révélation est effectuée par l'ajout d'un même volume du réactif de Benedict et incubation pendant 10 min dans un bain-marie. La présence des sucres réducteurs du saccharose se traduit par une apparition d'un précipité de couleur jaune-orange (Hyman et *al.*, 2002).

II.3.2.6. Tolérance au NaCl à 5%

Une suspension bactérienne dense de chaque isolat est inoculée dans des tubes à essai contenant une solution de bouillon nutritif additionné de NaCl à 5% puis incubée à 27°C pendant deux jours. La turbidité du milieu est examinée à l'œil nu (Hyman et *al.*, 1998).

II.3.2.7. Test de croissance à 37°C

Les isolats bactériens sont ensemencés sur le milieu GN, puis incubés à 37°C pendant 48h. *Dickeya* spp. et *Pcc* sont capables de croître aux deux températures, tandis que *Pa* croît uniquement à 27°C (Dye, 1968).

II.3.2.8. Test de mise en évidence du métabolisme oxydatif/fermentatif du glucose

Ce test permet de déterminer les voies de dégradation du glucose par les bactéries (oxydative ou fermentative).

Une colonie fraîche (de 24 à 48 heures) est ensemencée par piqure centrale, à l'aide d'un fil de platine stérilisé, dans deux tubes à essai gélosés contenant le milieu Hugh et Leifson. Le premier est recouvert d'une huile de vaseline stérile afin d'étudier le caractère fermentaire, le second est en condition d'aérobiose et sert à étudier le caractère oxydatif des souches.

Après incubation pendant 48 heures à une température de 27°C, la voie fermentation/oxydation est révélée par le virement de couleur du vert au jaune due à l'acidification du milieu détectée. Les bactéries fermentatives acidifient les deux milieux (couleur jaune), par contre, les bactéries oxydatives acidifient le milieu mis en aérobiose (Hugh et Leifson, 1953).

II.3.2.9. Identification biochimique par le système API 20 E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des Entérobactéries comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés.

Les suspensions bactériennes à identifier ont été inoculées dans les micro-tubes de la galerie et incubées à 27°C pendant 24 heures. Les réactions produites se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait visuellement sur la base d'un tableau de lecture fournit par le fabricant. L'identification est effectuée grâce à un profil numérique à l'aide d'un catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

II.3.3. Identification moléculaire des isolats

Les isolats ont fait l'objet d'une identification moléculaire par amplification des régions d'ADN par PCR avec les paires d'amorces Y1/Y2 (Darrasse et *al.*, 1994), Eca1f/Eca2r (De Boer et Ward, 1995), Pcc-F/Pcc-R (Kang et *al.*, 2003) et ADE1/ADE2 (Nassar et *al.*, 1996) spécifiques au genre *Pectobacterium*, l'espèce Pa ; la sous- espèce Pcc et aux espèces *Dickeya* spp., respectivement.

Les paires d'amorces nucléotidiques utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 12.

II.3.3.1. Identification par PCR avec des amorces spécifiques aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya*

Cette identification a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire, Génomique et Bioinformatique (LMGB) du Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Hassiba Benbouali de Chlef (UHBC).

II.3.3.1.1. Extraction de l'ADN chromosomique des isolats

L'extraction de l'ADN chromosomique des isolats suspects a été effectuée par la méthode du choc thermique.

À partir d'une culture jeune, quelques colonies pures sont suspendues dans 500 µl de l'eau distillée stérile, la suspension est ensuite chauffée à 95°C pendant 10 min, puis placée directement dans la glace à -20°C pendant 10 min. Cette étape d'alternation (chauffage et refroidissement) peut être répétée plusieurs fois pour permettre un maximum de lyse des cellules bactériennes et la libération de l'ADN. La suspension est ensuite centrifugée à 13 000 rpm pendant 10 mn. Le culot est éliminé alors que le surnageant contenant de l'ADN, qui servira pour l'amplification par PCR, est conservé à -20°C.

II.3.3.1.2. Amplification

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un volume final de 25 µl dans des tubes eppendorfs contenant 3µl d'ADN, 1.25 µl de chaque amorce (10 µM), 0.5 µl de dNTPs (10 mM), 5 µl de tampon (5X) et 0.125 µl de Taq polymérase. Le volume est complété à 25 µl par l'eau ultra-pure stérile.

Les amplifications ont été effectuées à l'aide du thermocycleur de type Techne TC-4000 (Cole-Parmer Ltd), programmé comme suit : l'étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, suivit par 30 cycles de 30 sec de dénaturation à 94°C, 45 sec d'hybridation pour les deux paires d'amorces Y1/Y2 et Pcc-F/Pcc-R à 60°C, et 1.30 min d'élongation à 72°C. Le dernier cycle est suivi d'une extension finale de 7 min à 72°C (Onkendi et Moleleki, 2014).

Le même protocole a été utilisé pour la détection de Pa avec l'amorce Eca1f/Eca2r, à l'exception de la température d'hybridation qui était 67°C.

La détection de *Dickeya* spp. a été réalisée selon Nassar et *al.* (1996), en utilisant l'amorce ADE1/ADE2.

Un témoin négatif contenant seulement le mélange réactionnel et l'eau distillée stérile, et des témoins positifs qui contiennent les ADN des souches de référence : DAPP-PG 764 (Pcc), DAPP-PG 759 (Pa) et DAPP-PG218 (D.ch).

II.3.3.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Dix microlitres de chaque produit d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) (Sigma aldrich), coloré avec une solution de bromure d'éthidium (BET) dans du tampon TAE (0.5X), sous un voltage constant (100 V) pendant 30 min. L'ADN est visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV, et la taille des amplicons est révélée par un marqueur de poids moléculaire à 100 bp (Promega, USA).

II.3.3.2. Identification des isolats par séquençage partiel du gène *mdh*

Plusieurs études ont montré que la séquence du gène de ménage codant pour la malate déshydrogénase (*mdh*) est phylogénétiquement informatif pour les bactéries entériques (Ma et *al.*, 2007 ; Pitman et *al.*, 2010 ; Moretti et *al.*, 2016).

Les isolats qui étaient positifs avec la PCR de l'étape précédente en utilisant des amorces Y1/Y2, Eca1f/Eca2r, Pcc-F/Pcc-R et ADE1/ADE2 (tableau 12), ont été soumis à une PCR suivit par séquençage partiel du gène malate *mdh*.

L'ADN chromosomique a été extrait en utilisant un kit commercial d'extraction de l'ADN génomique bactérien GenElute (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait est ensuite récupéré, et stocké à -20°C.

La qualité et la concentration des ADN obtenus ont été testées sur gel d'agarose à 1,5 % et par un spectrophotomètre UV / VIS OPTIZEN. La méthode d'extraction d'ADN est indiquée dans l'annexe V.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume total de 50 µL constitué de tampon PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 mM de chaque dNTP, 0.2 µM de chaque amorce, 2 U Taq polymérase et 50 ng d'ADN bactérien. Le programme d'amplification consiste en une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivi de 35 cycles à 94°C pendant 30 sec, 52°C pendant 30 sec, 72°C pendant 1 min, et finalement une extension finale à 72°C pour 7 min. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5% (p/v) dans une solution TAE (0.5X) pendant 45 min à 100 V et ont été visualisés sous lumière UV.

Les produits PCR du gène *mdh* ont été séquencés par MacroGen Europe (Pays-Bas) et comparés à ceux de GenBank en utilisant le programme BlastN.

II.3.3.2.1. Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique des isolats a été effectuée par la comparaison des séquences partielles du gène *mdh* de nos isolats avec celles des entérobactéries apparentées aux bactéries de la pourriture molle, qui sont disponibles dans la base de données GenBank.

Des analyses phylogénétiques et évolutives moléculaires ont été réalisées par la construction de l'arbre phylogénétique en utilisant le logiciel MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), basé sur la méthode de maximum de vraisemblance (Maximum likelihood ML) (Tamura et Nei, 1993). Ce logiciel permet une analyse rapide d'un nombre important de séquences basée sur une analyse statistique de bootstrap à 1000 répliques. *Yersinia pestis* CO92 a été utilisée comme référence externe (exogroupe) afin d'enraciner l'arbre.

II.3.3.3. Identification des isolats de Pcb par PCR

L'amplification par PCR avec les amorces BR1f/L1r spécifiques à *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (tableau 12) a été réalisée selon le protocole décrit par Duarte *et al.* (2004).

La PCR a été réalisée dans 20 µl de mélange réactionnel constitué de tampon PCR, 1.5 Mm de MgCl₂, 0.4 mM de chaque dNTP, 0.2 uM de chaque amorce, 2 U de Taq polymérase et 25 ng d'ADN bactérien. Le profil de température de PCR a été effectué à l'aide du thermocycleur de type MyCycler Thermal Cycler (BioRad, CA, USA), qui a été préalablement programmé selon le protocole suivant : Une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 1.5 min, 5 cycles à 95°C pendant 30 sec, 60°C pendant 30 sec et 72°C pendant 4.5 min, 5 cycles à 95°C pendant 30 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C pendant 4.5 min, 25

cycles à 95°C pendant 30 sec, 50°C pendant 30 sec et 72°C pendant 4.5 min, et l'extension finale à 72°C pendant 7 min. Les amplifiats ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.2% (p/v) dans du tampon TAE (0.5X) (1 h, 100 V) et ont été visualisés sous lumière UV.

II.3.3.4. Identification des isolats par séquençage du gène de l'ADNr 16S

L'ADNr 16S a été amplifié en utilisant les amorces P0 et P6 (tableau 12). Les produits de la PCR des ADNr 16S ont été séquencés par MacroGen Europe (Pays-Bas), et les séquences ont été comparées avec celles présentes dans la base de données GenBank en utilisant le programme BlastN (Waleron et *al.*, 2014).

II.4. Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequences Analysis)

Afin d'analyser les relations phylogénétiques entre les isolats, nous avons utilisé la technique MLSA, qui consiste en l'amplification et le séquençage de quatre gènes de ménage : l'aconitase hydratase 1 (*acnA*), ATP synthase F1 sous-unité β (*atpD*), DNA gyrase B (*gyrB*) et le facteur d'initiation de la traduction 2 (*infB*) (tableau 12).

Ces gènes ont été amplifiés en utilisant leurs amorces spécifiques (tableau 12) selon le protocole décrit par Brady et *al.* (2008). Les produits de la PCR des quatre gènes (*acnA*, *atpD*, *gyrB* et *infB*) ont été séquencés par MacroGen Europe (Pays-Bas). Les analyses phylogénétiques et d'évolution moléculaire ont été réalisées comme indiqué ci-dessus.

Matériel et Méthodes

Tableau 12: Liste des amorces utilisées dans cette étude.

Organisme cible	Amorces	Séquence (5' à 3')	Région cible	Amplicon taille (bp)	Références
<i>Pectobacterium</i> spp.	Y1 Y2	TTACCGGACGCGAGCTGTGGCGT CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT	Pel gene	434	Darrasse et al. (1994)
Pa	Eca1f Eca2r	CGGCATCATAAAAACACG GCACACTTCATCCAGCGA	Pa genome	690	De Boer et Ward (1995)
Pcc	Pcc-F Pcc-R	GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG	Pcc genome	550	Kang et al. (2003)
<i>Dickeya</i> spp.	ADE1 ADE2	GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC	Pel ADE	420	Nassar et al. (1996)
Pcb	BR1f	5'-GCGTGCCGGGTTTATGCACT-3'	IGS	690	Duarte et al. (2004)
	L1r	5'-CAAGGCATCCACCGT-3'			
	P0	5'-GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	ADNr 16S	1550	Gutell et al. (1994)
	P6	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'			
	mdh86F	5'-CCCAGCTTCCTTCAGGTTTCAGA-3'	<i>mdh</i>	460	Ma et al. (2007)
	mdh628R	5'-CTGCATTCTGAATACGTTTGGTCA-3'			
	acnA1	5'-GCCTCGCCGCCGCTGGTGGT-3'	<i>acnA</i>	300	
	acnA2	5'-CCGCGCATCATCACTTCATG-3'			
	atpD-01-F	5'-RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT-3'	<i>atpD</i>	711	Brady et al. (2008)
	atpD-02-R	5'-TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG-3'			
	gyrB-01-F	5'TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT-3'	<i>gyrB</i>	744	
	gyrB-02-R	5'-CMCCYTCCACCARGTAMAGTT-3'			
	infB-01-F	5'-ATYATGGGHCAYGTHGAYCA-3'	<i>infB</i>	996	
	infB-02-R	5'-ACKGAGTARTAACGCAGATCCA-3'			

II.5. Mise en évidence des activités enzymatiques extracellulaires (pectinases, cellulases et protéases)

II.5.1. Test de l'activité pectinolytique

Ce test a été réalisé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu minimum M63 supplémenté du saccharose à 2g/l et du PGA à 4g/l. 2 µl d'une suspension bactérienne de chaque isolat contenant 10^8 CFU/ml a été déposée sur la surface du milieu puis incubée pendant 48h à 30°C. Les boîtes ont été ensuite recouvertes d'une solution aqueuse d'acétate de cuivre (10%) pendant 30 min (Reverchon *et al.*, 1986).

L'acétate de cuivre forme un complexe avec le PGA pour donner au milieu une couleur bleue. Si la bactérie dégrade le PGA, il y a formation d'un halo blanchâtre sur fond bleu autour des colonies, le diamètre duquel est proportionnel à l'activité des pectinases produites.

II.5.2. Test de l'activité cellulolytique

Ce test a été effectué sur des boîtes de Pétri contenant le milieu minimum M63 supplémentée de 2g/l de Carboxy-Méthyl-Cellulose (CMC) et 2g/l du saccharose selon le protocole de Andro *et al.* (1984). 2 µl d'une suspension bactérienne de chaque isolat contenant 10^8 CFU/ml a été déposée sur la surface du milieu puis incubée pendant 48h à 30°C. Les boîtes sont inondées pendant quelques minutes par une solution de 2 % de rouge de Congo, puis lavées avec une solution de 5 M NaCl.

Si la bactérie dégrade le CMC il y a formation d'un halo orange autour de la colonie, le diamètre duquel est proportionnel à l'activité des cellulases produites.

II.5.3. Test de l'activité protéasique

L'activité protéasique a été déterminée sur le milieu LB solide contenant 1% de lait écrémé en poudre selon la méthode de Boussebart (2010). 2 µl d'une suspension bactérienne de chaque isolat contenant 10^8 CFU/ml a été déposée sur la surface du milieu puis incubée pendant 48h à 30°C.

La présence de protéases se manifeste par l'apparition d'une zone claire sur fond trouble autour des colonies.

II.6. Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre

Afin de démontrer le potentiel de nos isolats bactériens à causer la pourriture molle chez la pomme de terre, nous avons effectué un test de pathogénicité sur des tubercules de trois variétés de pomme de terre : *Spunta*, *Fabula* et *Agata*, selon le protocole décrit par Laurila et al. (2008).

Les tubercules de pommes de terre ont subi des rinçages successifs dans de l'eau de robinet, désinfectés par l'eau de javel diluée, rincés dans l'eau distillée stérile puis séchés et ensuite pesés.

Chaque tubercule a été inoculé à l'aide d'une seringue avec 100 µl (10^8 UFC/ml) d'une culture bactérienne de chaque isolat préalablement incubée sur milieu GN pendant 24h à 27°C. Ensuite, les tubercules inoculés ont été recouverts avec une huile de vaseline puis incubés à 22°C. Des tubercules témoins ont été inoculés avec de l'eau distillée stérile (témoin négatif). Chaque expérience a été effectuée en trois répétitions (trois tubercules pour chaque isolat).

La virulence a été évaluée en déterminant la quantité du tissu macéré par la pesé du tubercule avant et après quatre jours suivant l'inoculation.

II.7. Test de la réaction d'hypersensibilité

Le test de la réaction d'hypersensibilité (HR) a été effectué sur des plants de tabac (*Nicotiana tabacum*, cv *Havana 425*) et de géranium (*Pelargonium hortorum*), selon le protocole décrit par Moretti et al. (2016). A cet effet, une suspension bactérienne d'environ 10^8 UFC/ml est injectée sur la surface inférieure /de la feuille (à l'intérieur des nervures), à l'aide d'une seringue. Les plants de tabac et de géranium inoculés sont ensuite incubés à 24°C pendant 48h. Les témoins positif et négatif sont inoculés avec des souches de référence Pcc (DAPP-PG 764) et Pw (DAPP-PG 749), respectivement.

L'induction d'une HR aboutit à une mort cellulaire locale qui se manifeste par l'apparition de lésions nécrotiques visibles autour des sites d'inoculation des feuilles.

II.8. Analyse statistique

L'impact potentiel de la région d'étude, de cultivar de la pomme de terre et de la saison sur la prévalence des bactéries pectinolytiques a été analysé à l'aide du test de Khi-2. Lorsque les conditions d'utilisation de ce test ne sont pas réunies (effectif théorique inférieur à 3), le test du rapport de vraisemblance a été utilisé dans notre étude.

La comparaison de la variabilité de la virulence des différentes souches de bactéries pectinolytiques isolées dans cette étude a été réalisée à l'aide du test d'ANOVA. Si une différence significative de la virulence entre les différentes souches est détectée, le test post-hoc de Tukey pour des comparaisons multiples a été réalisé pour déterminer les différentes classes de variabilité de ces souches. Dans ce travail, les différences ont été considérées statistiquement significatives lorsque le P-value est inférieur à 0.05.

Chapitre III :
Résultats et discussion

III.1. Collecte des échantillons

Durant la période entre 2012-2016, 247 échantillons de plants et tubercules de pommes de terre présentant des symptômes typiques des maladies de la jambe noire et de la pourriture molle ont été collectés aux champs de culture et à partir des chambres de stockage, dans six différentes zones de production de pommes de terre dans le nord de l'Algérie (Ain Defla, Chlef, Mascara, Mostaganem, Relizane, et Tiaret).

III.2. Isolement et purification des bactéries

L'isolement des bactéries a été réalisé sur le milieu sélectif Crystal Violet Pectate (CVP) (Hélias et *al.*, 2012). La présence du crystal violet inhibe la croissance des bactéries Gram positif, alors que la dégradation de la pectine présente dans le milieu permet la mise en évidence des colonies pectinolytiques par la formation de cavités. Un exemple de résultat de ce test est illustré sur la figure 10.

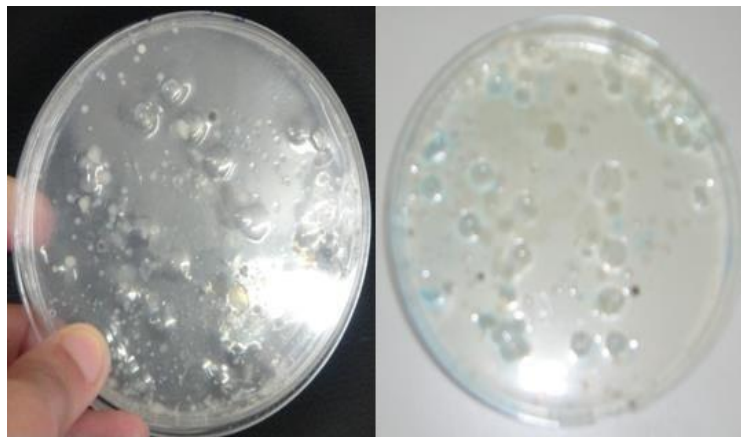


Figure 10: Formation de cavités sur milieu CVP après dégradation de la pectine.

Seules les colonies formant des cavités sur le milieu CVP ont été sélectionnées et purifiées sur milieu King B (figure 11). Cette opération a été répétée trois fois jusqu'à l'obtention de cultures pures.



Figure 11: Aspect des colonies pures des isolats sur milieu King B.

III.3. Identification des bactéries

Les isolats purs ont été sélectionnés et ont été soumis à un test de virulence sur tranches de pommes de terre, pour subir par la suite une série de tests physiologiques, biochimiques, moléculaires, et de pathogénicité afin de confirmer leur appartenance au genre *Pectobacterium* ou *Dickeya*.

III.3.1. Test de virulence sur les tranches de pommes de terre

Les isolats sélectionnés ont tous été testés sur des tranches des tubercules de pommes de terre. Une suspension bactérienne de chaque isolat est déposée sur des tranches de pomme de terre et incubée à 27°C pendant 24 heures. La macération des tranches a été examinée et un exemple des résultats obtenus est représenté dans la figure 12:



Figure 12: Test de virulence sur les tranches de pommes de terre.

À l'issue de ce test, 21 isolats bactériens répartis sur des zones géographiques différentes (tableau 13), capables de former des cavités sur milieu CVP, avec une capacité de macération sur les tranches de pommes de terre, ont été sélectionnés et ensuite soumis aux différents tests d'identification.

Tableau 13: Origine des isolats utilisés dans cette étude.

Isolat	Cultivar de pomme de terre	Date d'échantillonnage	Lieu de d'échantillonnage
HNA1	<i>Spunta</i>	Mars 2015	Ain Defla (Abadia)
HNA2	<i>Désirée</i>	Sept. 2015	Tiaret
HNA3	<i>Spunta</i>	Nov. 2015	Chlef (Karimia)
HNA4	<i>Kondor</i>	Oct. 2015	Chlef (Boukadir)
HNA5	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
HNA6	<i>Spunta</i>	Sept. 2014	Ain Defla (El-Amra)
HNA8	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain Defla
HNA9	<i>Kondor</i>	Juin 2015	Chlef (Mouafkia)
HNA11	<i>Désirée</i>	Juill. 2015	Ain Defla
HNA12	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Ain Defla (Djelida)
HNA13	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Ain Defla (BeniRached)
HNA15	<i>Spunta</i>	Oct. 2015	Ain Defla (Dawia)
HNA17	<i>Spunta</i>	Mars 2015	Chlef (Karimia)
HNA18	<i>Désirée</i>	Oct. 2015	Mostaganem (Debdaba)
HNA19	<i>Désirée</i>	Sept. 2015	Tiaret
HNA20	<i>Kondor</i>	Mars 2015	Ain Defla
HNA21	<i>Spunta</i>	Févr. 2015	Ain Defla (Attaf)
HNA22	<i>Spunta</i>	Mars 2015	Ain Defla
HNA24	<i>Spunta</i>	Nov. 2015	Relizane (Oued Djemaa)
HNA26	<i>Désirée</i>	Oct. 2014	Chlef (Medjaja)
HNA27	<i>Désirée</i>	Janv. 2014	Tiaret

III.3.2. Identification microbiologique, biochimique et physiologique des bactéries

Quatre caractéristiques de base indiquent si une bactérie appartient à un des deux genres *Pectobacterium* ou *Dickeya* : activité pectolytique, anaérobie facultative, catalase positive et oxydase négative (Oliveira et al., 2003). Le test d'indole, la température de croissance et la tolérance au sel fournissent des informations supplémentaires qui aident à différencier entre les genres *Pectobacterium* et *Dickeya*. De plus, la température de croissance permet aussi de différencier entre les espèces et les sous espèces au sein du genre *Pectobacterium*. Pa ne peut pas croître à 37°C alors que Pcc et *Dickeya* spp. peuvent croître à cette température (Toth et al., 2001).

Le test d'oxydation/fermentation est un test essentiel permettant la distinction entre *Pectobacterium* spp. et / ou *Dickeya* spp. et les autres bactéries.

Les 21 isolats bactériens isolés ont été soumis à des tests microbiologiques, physiologiques et biochimiques. Les résultats sont présentés dans le tableau 14. Tous nos isolats étaient Gram négatif, possédaient une activité catalase et un métabolisme fermentaire, oxydase négatif, indole négatif sauf pour 3 isolats (HNA2, 8 et 9). La température de croissance optimale de tous les isolats était entre 25 et 27°C. De plus, les isolats étaient également capables de se développer à 37°C, à l'exception des isolats HNA18 et 22. Tous les isolats avaient une tolérance à 5% NaCl, de plus, les isolats n'étaient pas capables de réduire le saccharose à l'exception de l'isolat HNA22.

Comme cité précédemment, tous les isolats se sont révélés négatifs pour la production d'indole à l'exception de 3 isolats HNA2, 8 et 9. Cependant il est possible que ces trois isolats appartiennent à une autre espèce au sein du genre *Pectobacterium*. Ceci n'est pas surprenant, car certaines nouvelles espèces et sous-espèces isolées au cours de ces dernières années, qui appartenaient au genre *Pectobacterium*, possédaient des caractères différents, ce qui rend leur identification par les tests classiques difficile (Boer et al., 2012).

En tenant compte de l'ensemble des tests montrés dans le tableau 14, 18 isolats ont présenté des caractéristiques très similaires et pourraient appartenir à l'espèce Pcc.

Avec la reconnaissance d'autres espèces et sous-espèces, y compris Pb, Pw, Pcb et Pco, il est désormais plus difficile de faire une identification précise basée uniquement sur des tests biochimiques, car les profils d'utilisation des glucides et d'autres caractéristiques

phénotypiques varient selon les souches de la même espèce ou de la même sous-espèce (De Boer et *al.*, 2012). De plus, il existe de nombreux isolats atypiques et des souches couramment détectés qui ne montrent pas de réactions biochimiques typiques (Yap et *al.*, 2004 ; Charkowski, 2006).

Résultats et discussion

Tableau 14: Propriétés biochimiques et physiologiques des souches isolées à partir de tubercules de pommes de terre malades.

Souche	Gram	Catalase	Oxydase	Formation de cavités sur CVP	Croissance à 37°C	Métabolisme fermentatif	Test de virulence	Substances réductrices	Production d'indole	Croissance 5% NaCl
HNA1	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA2	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
HNA3	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA4	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA5	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA6	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA8	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
HNA 9	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
HNA11	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA12	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA13	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA15	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA17	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA18	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
HNA19	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA20	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA21	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA22	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
HNA24	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA26	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
HNA27	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+

+ : Réaction positive; - : Réaction négative.

III.3.2.1. Identification biochimique par le système API 20 E

Les isolats ont également été soumis à une identification biochimique à l'aide des galeries API 20 E. Après inoculation des galeries par les suspensions bactériennes et leur incubation à 27°C durant 24h, la lecture des réactions produites a été réalisée en se référant au tableau d'interprétation désigné pour cette galerie (API 20 E). La compilation des résultats a permis de déterminer 11 codes à sept chiffres, et l'identification des bactéries est obtenue à l'aide d'une base de données en ligne. Le tableau 15 résume les codes obtenus après la compilation des résultats des isolats testés.

Tableau 15: Codes obtenus après identification des isolats avec le système API 20 E.

Isolat	APIWeb Code	Identification
HNA3	1207373	Pcc
HNA4		
HNA5		
HNA6		
HNA11		
HNA15		
HNA17		
HNA19		
HNA20	1207173	
HNA8	1247373	<i>Dickeya</i> spp.
HNA9	1247173	
HNA1	1205373	<i>Erwinia rhapontici</i>
HNA12	3202373	
HNA13	1207153	<i>Ponteoa</i> spp. (73.6%)
HNA2	3245373	<i>Enterobacter sakazakii</i> (98.7%)
HNA18	2206042	<i>Pseudomonas luteila</i> (84.3%)
HNA22		
HNA21	1206373	<i>Serratia rubidaea</i> (53.4%, 55.9%)
HNA24	1206273	

Pcc: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Comme on peut le constater d'après le tableau que certains codes obtenus étaient communs à plusieurs isolats tandis que le reste des isolats testés ont donné des codes différents.

Les tests biochimiques montrent que huit isolats HNA3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, et 19 possèdent le même code (1207373), alors que l'isolat HNA20 possède un code différent (1207173). Ces deux codes ont été documentés dans d'autres travaux comme correspondants à *Pcc* (Mergaert et *al.*, 1984 ; Lacroix et *al.*, 1995 ; Buonauro et *al.*, 2002 ; Terta et *al.*, 2011). Les 12 autres isolats possèdent des codes différents à ceux attribués à *Pcc*. Cette variabilité des codes obtenus par le test de galerie API 20 E a été reportée dans plusieurs études, indiquant que ce test n'est pas concluant dans l'identification des espèces appartenant aux genres *Pectobacterium* et *Dickeya* (Mergaert et *al.*, 1984 ; Lacroix et *al.*, 1994).

L'hétérogénéité des caractères morphologiques et biochimiques constatée chez les bactéries pectinolytiques ainsi que l'ensemble des données présentées dans cette étude confirment la faiblesse de ces approches classiques comme moyens d'identification et soulèvent l'importance des outils moléculaires comme moyens d'identification plus précis et fiables (Pitman et *al.*, 2008 ; Moleleki et *al.*, 2013).

Tableau 16: Les résultats du test d'identification par la galerie API 20 E.

Résultats et discussion

Isolat	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
HNA1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA2	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA4	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA8	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA9	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA11	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA12	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
HNA15	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA17	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA18	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
HNA19	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA20	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
HNA21	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
HNA22	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
HNA24	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+

+: Réaction positive; - : Réaction négative

III.3.3. Identification moléculaire

III.3.3.1. Identification par PCR avec les paires d'amorces Y1/Y2, Pcc-F/Pcc-R, Eca1f/Eca2r et ADE1/ADE2

Afin d'identifier avec plus de précision nos isolats, nous avons utilisé la méthode de l'amplification de l'ADN par PCR, en utilisant quatre paires d'amorces, Y1/Y2 spécifique au gène *Pel* du genre *Pectobacterium* (Darrasse et al., 1994) ; tandis que les autres amorces Pcc-F/Pcc-R (Kang et al., 2003), Eca1f/Eca2r (De Boer et Ward, 1995) et ADE1/ADE2 (Nassar et al., 1996) sont spécifiques à Pcc, Pa et *Dickeya* spp., respectivement.

Les résultats de la PCR sont représentés sur les figures 13 et 14. Les profils électrophorétiques ont montré que tous les isolats étaient positifs avec les amorces Y1/Y2 et Pcc-F/Pcc-R, en raison de la présence d'amplicons d'une taille de 434 pb et 550 pb, respectivement. Ceci suggère que les isolats appartiennent au genre *Pectobacterium* et plus précisément à l'espèce Pcc.

Par contre, aucun amplicon n'a été obtenu avec les amorces Eca1f/Eca2r et ADE1/ADE2, spécifiques à Pa et *Dickeya* spp., respectivement, ce qui indique l'absence de ces deux types de bactéries parmi nos isolats.

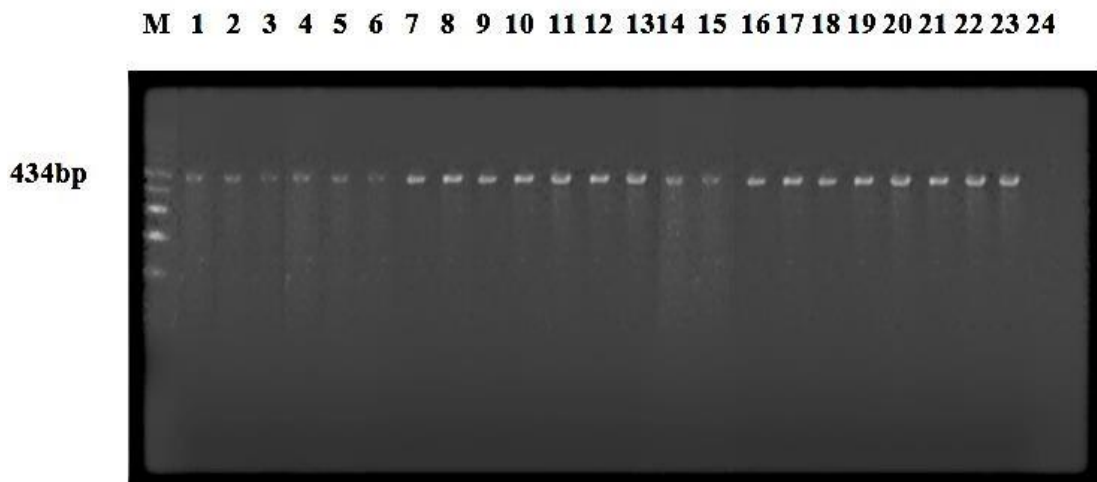


Figure 13: Profils électrophorétiques des produits de la PCR sur gel d'agarose à 1% avec l'amorce Y1/Y2 des isolats testés. Souches HNA1, HNA2, HNA3, HNA4, HNA5, HNA6, HNA8, HNA9, HNA11, HNA12, HNA13, HNA15, HNA17, HNA18, HNA19, HNA20, HNA21, HNA22, HNA24, HNA26, HNA27 (puits 1-21) , souche de Pcc DAPP-PG 751 (puit 22) et de Pa DAPP-PG 218 (puit 23) comme contrôles positifs et contrôle négatif (puit 24).

M = marqueur de taille (100 pb).

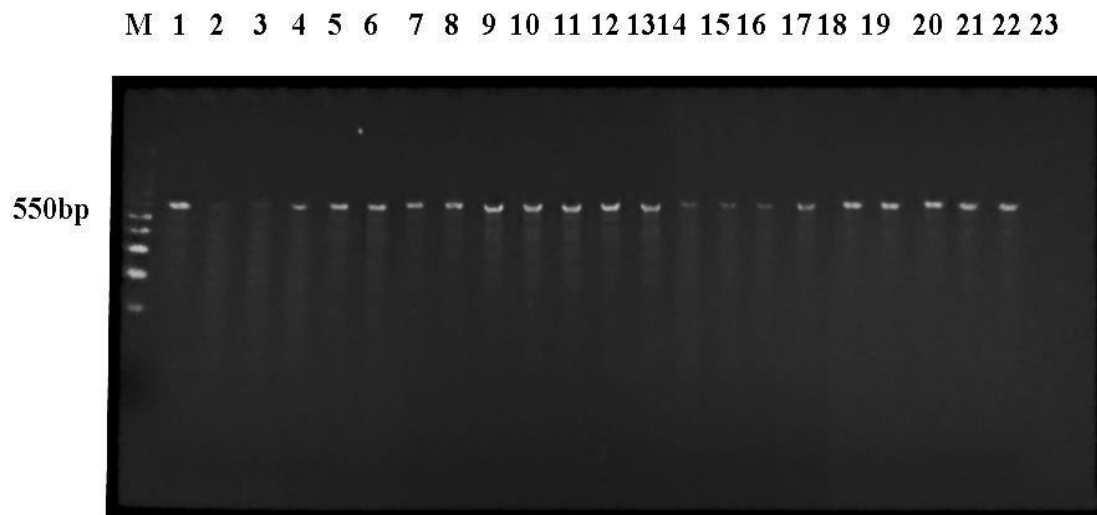


Figure 14: Profils électrophorétiques des produits de la PCR sur gel d'agarose à 1% avec l'amorce Pcc-F/Pcc-R des isolats testés. Souches HNA1, HNA2, HNA3, HNA4, HNA5, HNA6, HNA8, HNA9, HNA11, HNA12, HNA13, HNA15, HNA17, HNA18, HNA19, HNA20, HNA21, HNA22, HNA24, HNA26, HNA27 (puits 1-21) , souche de Pcc DAPP-PG 751 (puit 22) comme contrôle positif et contrôle négatif (puit 23). M = marqueur taille (100 pb).

III.3.3.2. Identification par PCR et séquençage du gène *mdh*

Le séquençage partiel du gène de ménage codant pour la malate déshydrogénase (*mdh*) a été largement utilisé pour la caractérisation phylogénétique des entérobactéries (Ma et al., 2007 ; Pitman et al., 2010 ; Sadeghi-Seraji et al., 2018). Ce gène est présent chez la plupart des entérobactéries et sa séquence est variable d'une espèce à une autre permettant ainsi l'identification des bactéries (Palacio-Bielsa et al., 2010).

L'arbre phylogénétique de type Maximum likelihood ML, réalisé avec l'analyse des séquences partielles du gène *mdh*, représenté sur la figure 15, indique clairement qu'en général nos isolats sont séparés en deux groupes. Un groupe comprend quatorze isolats similaires aux Pcc. En particulier, onze de ces isolats ont des séquences *mdh* identiques à celles de certaines souches de Pcc isolées au Liban, USA et aux Pays-Bas (Moretti et al., 2016 ; Ma et al., 2007). Tandis que le deuxième groupe, comprend six isolats (HNA2, 8, 9, 15, 26 et 27) qui sont très similaires aux souches de Pcb, y compris la souche de référence LMG 21371T. Les isolats HNA8, 15, 26 27 ont des séquences *mdh* identiques à celle d'une souche de Pcb isolée au Canada CFIA 1009, dont le génome a été séquencé récemment (Li et al., 2015), et d'une souche de Pcb Japonaise Pcbm-3 (Fujimoto et al., 2017).

Il est intéressant de noter à partir de l'arbre phylogénétique (figure 15) que les isolats de Pcc HNA12 et 13, qui ont été isolés durant la même période (Sept.2015), de la même région (Ain Defla) et à partir du même cultivar de pomme de terre (*Spunta*), sont groupés séparément. Ceci suggère l'existence d'une diversité génétique parmi nos isolats de Pcc. Une telle diversité intra sous-espèce de Pcc a été notée dans de nombreuses études et a été corrélée avec sa gamme d'hôtes étendue et sa large distribution géographique (Darrasse et al., 1994, Hélias et al., 1998 ; Avrova et al., 2002 ; Gardan et al., 2003 ; Yap et al., 2004 ; Ma et al., 2007 ; Nabhan et al., 2012).

La souche Pcc HNA12 était génétiquement la plus divergente des autres souches de Pcc, même de celles qui ont été isolées dans la même région. Par contre, les six isolats de Pcb ont été isolés durant des périodes séparées (entre Janv.2014 et Sept.2015) et de trois régions différentes (Ain Defla, Chlef et Tiaret), malgré cela ils étaient tous regroupés dans un même groupe, indiquant que les isolats Algériens de Pcb sont phylogénétiquement très proches.

Une homogénéité très élevée au niveau génétique des souches européennes de Pcb, qui a été attribuée à leur introduction récente en Europe, a été aussi précédemment constatée (Nunes Leite et *al.*, 2014).

En fait, les résultats de cette analyse ont montré que le séquençage du gène *mdh* a été discriminant et a permis l'identification d'isolats de Pcb, qui n'ont pas été identifiés par PCR, en utilisant la paire d'amorces Pcc-F/Pcc-R spécifique à Pcc.

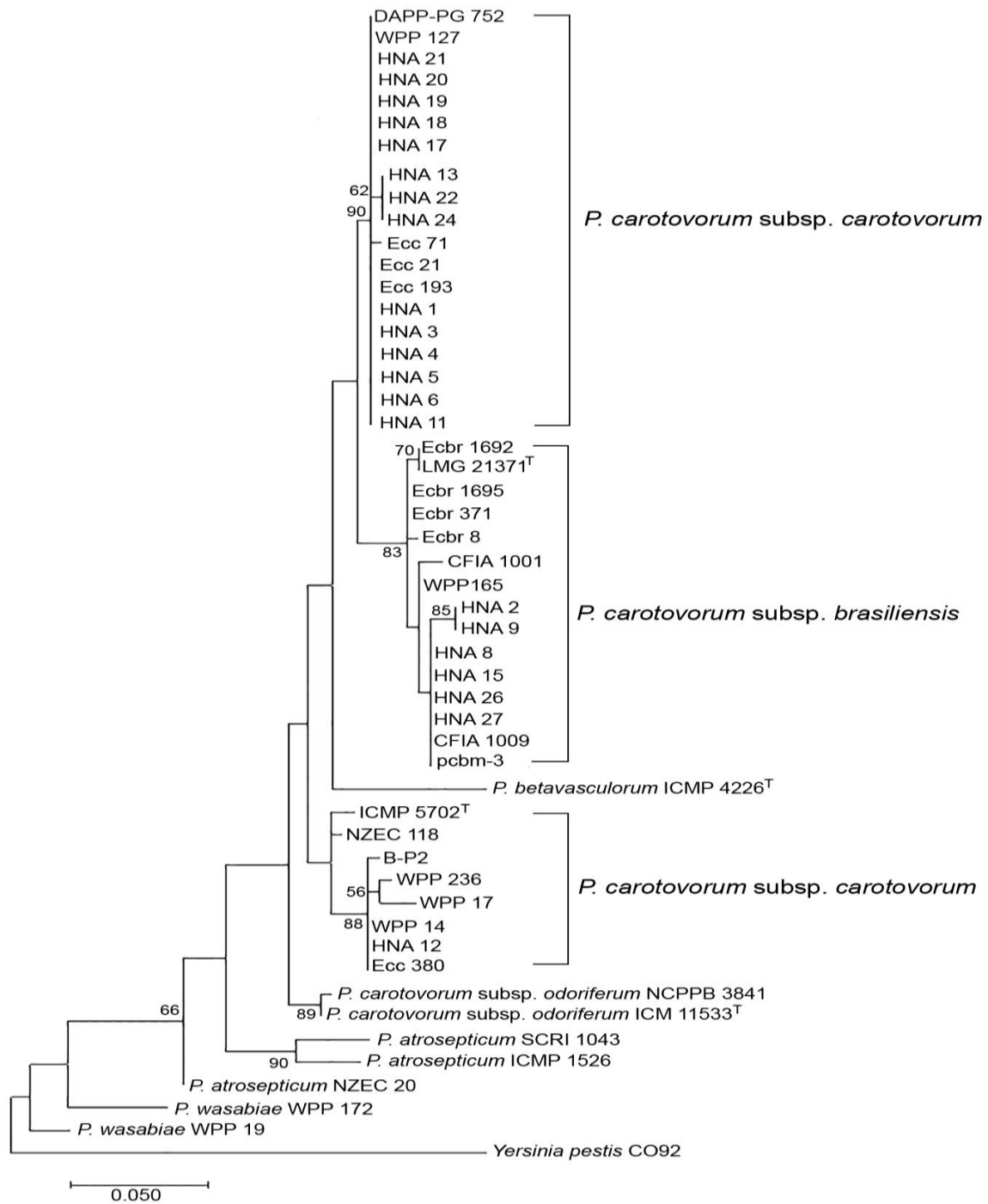


Figure 15: Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des séquences partielles du gène *mdh* (229 nt) montrant la position phylogénétique des 21 souches Algériennes (HNA) isolées de tubercules de pomme de terre présentant des symptômes de la maladie de pourriture molle au sein du genre *Pectobacterium*. Barre, 5% de substitutions de nucléotides. Les valeurs (%) des bootstrap après 1000 simulations sont représentées sur chaque nœud. Seules les valeurs $\geq 50\%$ sont affichées. Les souches marquées d'un exposant BT représentent les souches types de l'espèce ou de la sous-espèce.

III.3.3.3. Identification par PCR avec des amorces spécifiques à Pcb

Afin de confirmer l'identité des six souches identifiées comme Pcb par l'analyse de la séquence du gène *mdh*, on a réalisé une amplification par PCR avec une paire d'amorces BR1f/L1r spécifique à cette sous-espèce. Le profil électrophorétique obtenu est montré dans la figure 16.

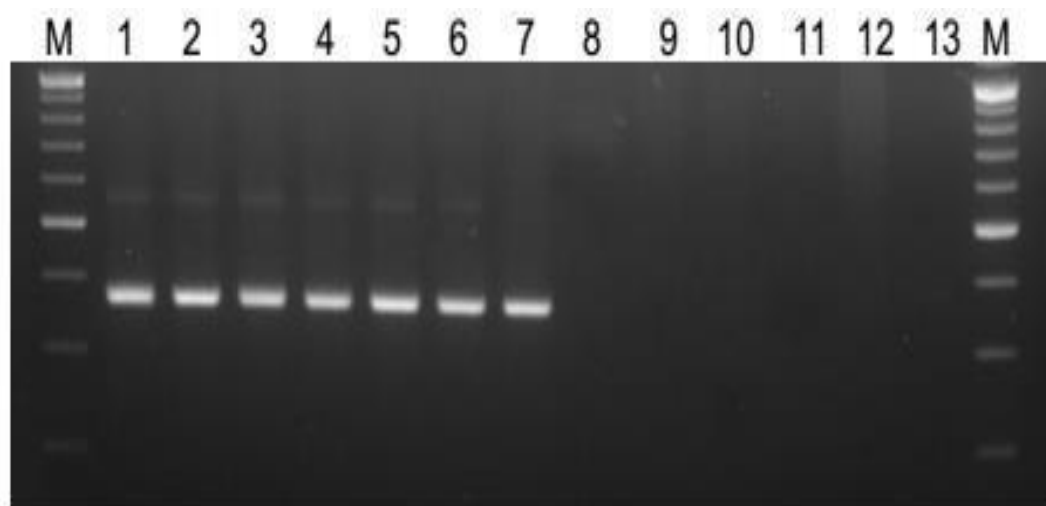


Figure 16: Profil électrophorétique des produits amplifiés par PCR avec les amorces BR1f/L1r spécifiques à Pcb sur gel d'agarose à 1%. Souches HNA2, HNA8, HNA9, HNA15, HNA26, HNA27 (Puits 1-6); souche de Pcb LMG 21371T (puit 7) ; souches HNA21, HNA5, HNA22, HNA18 (puits 8-11) et souche de Pcc DAPP-PG 751 (puit 12). Puit 13 : eau. M = marqueurs de taille.

Les résultats de la figure 16 ont montré que les six souches (HNA2, 8, 9, 15, 26, 27) ont généré un produit de 690 pb, ce qui confirme qu'elles appartiennent effectivement à Pcb. Les informations concernant ces souches sont montrées dans le tableau 17.

Tableau 17: Résultats du test de la PCR avec les amorces spécifiques à Pcb

Souche	Lieu d'échantillonnage	Amplification BR1f/L1r	Èspece bactérienne
HNA1	Ain Defla	-	
HNA11	Ain Defla	-	
HNA12	Ain Defla	-	
HNA13	Ain Defla	-	
HNA20	Ain Defla	-	
HNA21	Ain Defla	-	
HNA22	Ain Defla	-	
HNA6	Ain Defla	-	-
HNA17	Chlef	-	
HNA3	Chlef	-	
HNA4	Chlef	-	
HNA18	Mostaganem	-	
HNA24	Relizane	-	
HNA5	Relizane	-	
HNA19	Tiaret	-	
HNA8	Ain Defla	+	
HNA15	Ain Defla	+	
HNA9	Chlef	+	Pcb
HNA26	Chlef	+	
HNA2	Tiaret	+	
HNA27	Tiaret	+	

III.3.3.4. Identification des bactéries par séquençage du gène de l'ADNr 16S

Pour confirmer beaucoup plus l'identité de nos isolats, l'ADNr 16S d'un isolat représentatif des sous-espèces Pcc (HNA18) et Pcb (HNA26) a été amplifié et séquencé, puis les séquences ont été comparées avec celles des séquences de l'ADNr 16S des entérobactéries présentes dans la base de données GenBank. L'analyse a montré une forte similarité (100% et 99.55%) avec des souches de Pcc et Pcb, respectivement.

Collectivement, les résultats de l'analyse des séquences du gène *mdh*, l'amplification par PCR avec des amorces spécifiques à Pcb et l'analyse des séquences du gène de l'ADNr 16S ont tous confirmé l'appartenance de 6 de nos isolats Algériens à la sous-espèce Pcb. À notre connaissance, c'est la première signalisation de la présence de Pcb en Algérie comme l'agent causal de la maladie de la pourriture molle de pomme de terre.

Pcb fus isolée pour la première fois en 2004 au Brésil à partir de plantes de pomme de terre atteintes de la jambe de noire (Duarte et *al.*, 2004), puis elle a été rapportée dans plusieurs autres pays tels que la Belgique, les Pays-Bas (Elphinestone et Toth, 2007), l'Afrique du Sud (van der Merwe et *al.*, 2010), le Pérou, l'Allemagne, la Syrie (Nabhan et *al.*, 2012a, b), le Canada (De Boer et *al.*, 2012), la Nouvelle-Zélande (Panda et *al.*, 2012), le Kenya (Onkendi et Moleleki, 2014), la Suisse (de Werra et *al.*, 2015), la Pologne (Waleron et *al.*, 2015), la Turquie (Ozturk et Aksoy, 2016), le Japon (Fujimoto et *al.*, 2017), les États-Unis (Yap et *al.*, 2004 ; Ma et *al.*, 2007 ; McNally et *al.*, 2017), la Chine (Zhao et *al.*, 2018) et la Russie (Voronina et *al.*, 2019).

Ce pathogène a été isolé à partir de nombreuses plantes telles que le piment, les carottes, l'artichaut, le concombre, le poivre, la tomate, la betterave à sucre, les courgettes et le tabac (Lee et *al.*, 2014 ; Waleron, et *al.*, 2015 ; Onkendi et *al.*, 2016).

La large distribution dans de nombreux pays du monde ainsi que sa présence sur de nombreuses plantes hôtes, font de Pcb un agent pathogène redoutable qui peut présenter un grand risque sur la production de la pomme de terre (Panda, 2014). Il a été démontré dans des tests d'inoculation de plantes avec des souches de Pcb que celle-ci provoque des symptômes très sévères de la maladie, ceci peut expliquer d'une part la dissémination rapide de ce pathogène, bien que ceci ne constitue pas le seul facteur (Onkendi et *al.*, 2013). Il se pourrait qu'une combinaison entre une virulence élevée et une adaptation flexible de ce pathogène à des conditions environnementales diversifiées peut être derrière la prévalence élevée de Pcb.

À ce stade on ne peut pas confirmer si Pcb a été récemment introduite en Algérie à travers l'importation des tubercules de semences contaminés ou par d'autres moyens, ou si elle existait déjà en Algérie et qu'elle n'a pas été détectée auparavant, particulièrement dans les travaux de Yahiaoui-Zaidi et *al.* (2003) effectués dans d'autres régions de l'Algérie. Cependant, deux hypothèses peuvent être formulées:

(i) Premièrement, vu la dissémination rapide de Pcb à travers le monde, il est donc possible que Pcb a été récemment introduite en Algérie à travers l'importation des tubercules de semences contaminés ou par d'autres moyens. Cette possibilité a été suggérée auparavant en Europe suite à la démonstration que les souches Européennes de Pcb étaient génétiquement très homogènes (Nunes Leite et *al.*, 2014).

(ii) Il est aussi possible que les souches de Pcb existaient depuis bien longtemps en Algérie et qu'elles n'étaient pas détectées par Yahiaoui-Zaidi et *al.* en 2003, par manque d'information phylogénétique plus précise. Cette possibilité est supportée par le fait que nos isolats de Pcb n'ont été identifiés qu'après l'utilisation d'outils moléculaires impliquant les analyses des séquences des gènes *mdh* et ADNr 16S. Il est donc possible que certaines souches identifiées comme étant Pcc dans l'étude Yahiaoui-Zaidi et *al.* (2003) pourraient être des souches de Pcb, mais elles n'ont pas été distinguées comme telles à cause des limites des techniques utilisées par ces auteurs. Cette possibilité est aussi corroborée par plusieurs études qui ont reporté que certaines souches de *Pectobacterium* spp. isolées depuis des dizaines d'années en Amérique du Nord, en Europe et en Corée ont été récemment identifiées par des méthodes moléculaires comme étant des Pcb (De Boer et *al.*, 2012 ; Lee et *al.*, 2014).

III.3.3.5. Prévalence et distribution des isolats

Les données générées dans cette étude ont révélé la présence de 21 isolats appartenant au genre *Pectobacterium*, prélevés sur des tubercules de pommes de terre symptomatiques de différentes variétés cultivées dans 5 régions du Nord-Ouest de l'Algérie (Ain Defla, Chlef, Mostaganem, Relizane et Tiaret). Les fréquences d'isolement étaient 71% pour Pcc (n=15) et 29% pour Pcb (n=6), détectées dans 6% et 2.42% des échantillons de pomme de terre analysés (n=247), respectivement. Parmi les 6 régions prospectées, les isolats de Pcc et Pcb proviennent de 5 et 3 différentes régions géographiques d'Algérie, respectivement, dont la majorité a été isolée de Ain Defla (n=10, 47.6%) suivi par Chlef (n=5, 23.80%), Tiaret (n=3, 14.28%), Relizane (n=2, 9.52%) et Mostaganem (n=1, 4.76%) (tableau 13).

La prédominance de Pcc en Algérie, qui a été aussi signalée dans une étude précédente par Yahiaoui-Zaidi et *al.* (2003), peut être due aux conditions climatiques favorables à la croissance de cette sous-espèce. Il est bien établi que les souches de Pcc sont mieux adaptées aux températures élevées, du fait qu'elles possèdent une large gamme de température de croissance (5 à 36°C) (Pérombelon, 1992). La prédominance de la sous-espèce Pcc a été aussi confirmée dans des études effectuées au Maroc et en Tunisie (Terta et *al.*, 2010 ; Faquih et *al.* 2015 ; Romdhani et El Mahjoub, 1990 ; Priou et El Mahjoub, 1994 ; Priou et El Mahjoub, 1999 ; Hibar et *al.*, 2007). De plus, la dominance de cette sous espèce a été signalée dans d'autres pays à travers le monde (Avrova et *al.*, 2002 ; Oliveira et *al.*, 2003).

En Europe, 5 espèces bactériennes sont actuellement dominantes, *P. atrosepticum*, *P. wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *Dickeya solani* et *D. dianthicola* (Toth et al., 2011 ; Waleron et al., 2013 ; Nunes Leite et al., 2014). Cependant, récemment on a observé une transition de *P. atrosepticum*, comme l'agent dominant, vers *D. solani* et *P. wasabiae* et plus récemment Pcb, une sous espèce émergente depuis 2012, qui est en train de devenir une espèce majeure de pomme de terre dans certains pays (van der Wolf et al., 2017).

En revanche, aucune souche de Pa n'a été détectée dans cette étude, ceci n'est pas surprenant car cette espèce est mieux adaptée aux régions avec des climats plus frais (Dupuis et al., 2005 ; Czajkowski et al., 2012). De plus, Pa possède une gamme d'hôtes très réduite par rapport aux autres bactéries du genre *Pectobacterium*, étant principalement rencontrée en association avec la pomme de terre (Pérombelon, 2002).

Pendant longtemps, dans les zones à climat tempéré, notamment en Europe et en Amérique du Nord, Pa a été le principal agent responsable de la jambe noire. Toutefois, au cours des deux dernières décennies, pour des raisons inconnues, cette prévalence sur le continent Européen a diminué (van der Wolf et al., 2017).

Il est à noter aussi qu'aucune bactérie appartenant au genre *Dickeya* n'a été détectée dans cette étude, même si les conditions climatiques en Algérie lui sont optimales. Le même résultat a été constaté en Tunisie (Priou et El Mahjoub, 1999). Par ailleurs, récemment une nouvelle sous-espèce de *D. dianthicola* a été retrouvée associée aux symptômes de jambe noire sur pomme de terre dans le nord du Maroc (Oulghazi et al., 2017).

III.3.3.5.1. La prévalence des bactéries pectinolytiques selon les régions prospectées

Les résultats du tableau 18 montrent qu'il y a une différence significative ($P= 0.02$) de la prévalence de nos isolats de bactéries pectinolytiques dans les différentes régions géographiques d'où ils ont été isolés. Une prévalence élevée a été enregistrée à Tiaret (3/13, 23%), suivi par Ain Defla (10/63, 16%), Mostaganem (1/7, 14%), Relizane (2/21, 9%), Chlef (5/132, 4%) et Mascara (0, 0%).

Pcc était l'agent le plus dominant à Ain Defla, où la majorité des isolats ($n=10$, 53%) a été isolée dans cette région ($n=8$, 13%), suivi par Chlef ($n=3$, 2%), Relizane ($n=2$, 9.5%), Mostaganem ($n=1$, 14%) et Tiaret ($n=1$, 8%). Cependant, Pcb était dominante à Tiaret ($n=2$,

15%).

Tableau 18: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon la provenance.

Lieu de collection	Nombre d'échantillons collectés	Nombre d'isolats (Pcc et ou Pcb)	Fréquence (%)	Fréquence (%)	
				Pcb	Pcc
Ain Defla	63	10	15.87	3.17	12.7
Chlef	132	5	3.78	1.51	2.27
Mascara	11	0	/	/	/
Mostaganem	7	1	14.28	/	14.28
Relizane	21	2	9.52	/	9.52
Tiaret	13	3	23.07	15.38	7.69

Ce résultat est consistant avec celui d'autres études qui ont établi que la prévalence des bactéries pectinolytiques diffère non seulement d'un continent à l'autre ou d'un pays à l'autre mais aussi d'une région à l'autre au sein d'un même pays (van der Wolf *et al.*, 2017 ; Charkowski, 2018). Cette distribution peut être influencée par plusieurs facteurs, comme la capacité d'adaptation de chaque espèce et/ou sous espèce aux conditions pédoclimatiques de chaque région.

III.3.3.5.2. Relation entre la prévalence des bactéries pectinolytiques et les saisons

D'après les résultats montrés dans le tableau 19, il est clair qu'il existe une différence significative ($P < 0.001$) entre la prévalence des bactéries pectinolytiques entre les saisons. Une prévalence élevée a été enregistrée durant l'automne (13/55, 24%), suivi par le printemps (4/43, 9%), l'hiver (2/68, 3%), et l'été (2/81, 2%).

En outre, la prévalence de chaque sous espèce a également changé d'une saison à l'autre. Les prévalences les plus élevées des Pcc et Pcb ont été enregistrées durant la même saison, l'Automne (16.36%, 7.27%, respectivement).

Tableau 19: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon la saison

Saison	Nombre d'échantillons collectés	Nombre d'isolats (Pcc et ou Pcb)	Fréquence (%)	Fréquence (%)	
				Pcb	Pcc
Automne	55	13	23.63	7.27	16.36
Hiver	68	2	2.94	1.47	1.47
Printemps	43	4	9.30	/	9.30
Été	81	2	2.46	1.23	1.23

Ce résultat confirme ceux d'autres études qui ont établi que les facteurs environnementaux, particulièrement la température, exercent une forte influence sur l'Epidémiologie des bactéries pectinolytiques.

Il a été démontré que la prévalence des bactéries pectinolytiques peut changer non seulement d'une saison à l'autre, mais aussi d'une année à l'autre, comme dans le cas d'une étude effectuée en Russie, où la prévalence des bactéries du genre *Dickeya* dans les lots de semences de pomme de terre a passé de 3% à 26-28% en seulement quatre ans (Ignatov et al., 2015).

Selon Pérombelon (2002), la distribution de ces pathogènes peut être influencée par les conditions climatiques, telles que la température, un facteur environnemental qui joue un rôle important dans la distribution de ces agents pathogènes.

De plus, Golanowska et al. (2017) ont émis l'hypothèse que la propagation rapide de nouvelles espèces de bactéries pectinolytiques telles que *D. solani*, Pw et Pcb en Europe a été liée à une augmentation des températures du printemps et de l'été suite au réchauffement de la planète.

Il a été reporté que la sévérité des maladies de la jambe noire et la pourriture molle de la pomme de terre dépendent de la température et l'humidité, dont les conditions optimales du développement de ces maladies sont entre 15 et 25°C et des conditions humides (Pérombelon, 2002). Dans une étude effectuée en Californie, Farrar et al. (2000) ont démontré

qu'a des températures entre 30 et 35°C, les souches de *Dickeya* spp. sont plus virulentes que Pcc.

III.3.3.5.3. Relation entre la prévalence des bactéries pectinolytiques et les cultivars de pomme de terre

Comme montré dans le tableau 20, il n'existe aucune différence significative des fréquences d'isolement selon les cultivars de pomme de terre (P= 0.70). Le même résultat a été obtenu par Maisuria et Nerurkar (2012), cependant la prévalence est en corrélation avec la gamme d'hôtes (Pérombelon et Kelman, 1980).

Tableau 20: Prévalence des bactéries pectinolytiques selon le cultivar de pomme de terre.

Cultivar	Nombre d'échantillons collectés	Nombre d'isolats (Pcc et ou Pcb)	Fréquence (%)	Fréquence (%)	
				Pcb	Pcc
<i>Désirée</i>	55	6	10.90	5.45	5.45
<i>Kondor</i>	35	3	8.57	2.86	5.71
<i>Spunta</i>	147	12	8.16	1.36	6.8
<i>Bartina</i>	9	0	/	/	/
<i>Vivaldi</i>	1	0	/	/	/

III.4. Analyse de la diversité génétique par MLSA (Multilocus Sequences Analysis)

Pour effectuer une analyse phylogénétique sur nos isolats, nous avons utilisé la technique MLSA, qui consiste à l'amplification et le séquençage de plusieurs gènes de ménage (conservés) à savoir *acnA*, *atpD*, *gyrB* et *infB* (Pitman et al., 2010 ; Moretti et al., 2016), à partir de quelques-uns de nos isolats de Pcb (HNA9 et 27) et de Pcc (HNA5, 12, 18 et 22), sélectionnés sur la base du phylogramme *mdh* (figure 15). Les séquences partielles obtenues, présentées dans l'annexe II, ont été déposées dans la banque de données GenBank sous les numéros d'accès indiqués dans le tableau 21.

Les données des séquences nucléotidiques partielles concaténées de ces quatre gènes (*acnA*, *atpD*, *gyrB* et *infB*) ont été utilisées pour construire un arbre phylogénique de type Maximum likelihood ML (figure 17).

L'arbre phylogénétique issu de cette analyse révèle et confirme que les isolats HNA9 et 27 sont regroupés avec les Pcb (CFIA 1009, CFIA 1001, LMG 21371), tandis que les autres isolats HNA5, 12, 18 et 22 sont regroupés avec la souche libanaise DAPP-PG752 appartenant à Pcc (figure 17).

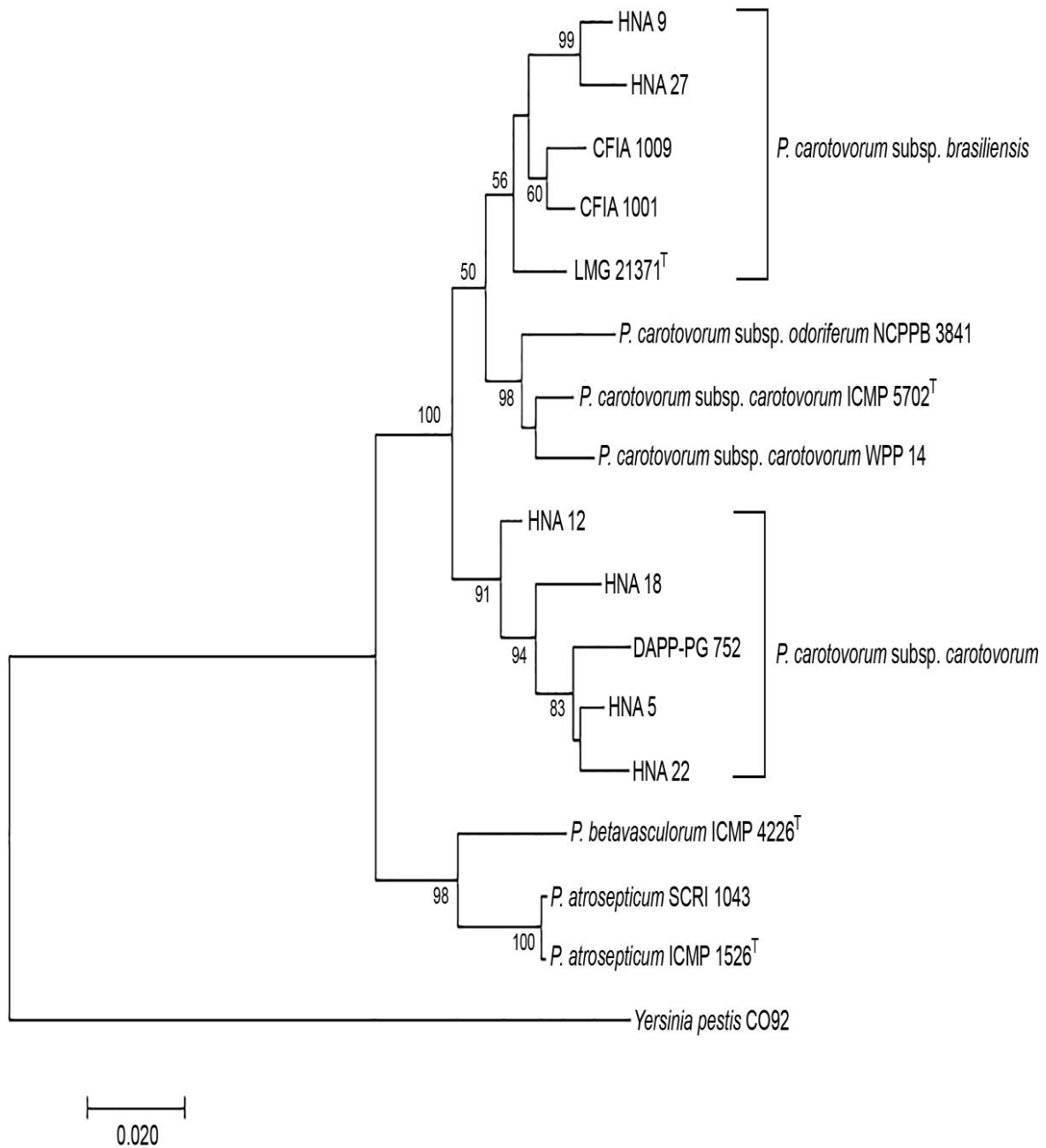


Figure 17: Arbre phylogénétique (Maximum likelihood ML) construit à partir des données concaténées de séquences partielles des quatre gènes de ménage *atpD*, *gyrB*, *infB* et *rpoB* (*atpD*, 642 nt, *gyrB*, 747 nt, *infB*, 615 nt, *rpoB*, 605-637 nt) montrant la position phylogénétique des souches Algériennes (HNA) isolées de tubercules de pomme de terre avec des symptômes de la maladie de pourriture molle au sein du genre *Pectobacterium*. Barre, 2% de substitutions de nucléotides. Les valeurs (%) des bootstrap après 1000 simulations sont représentées sur chaque nœud. Valeurs uniquement >50% sont indiquées. Les résultats d'analyses obtenus durant ce travail ont permis de signaler pour la première fois la présence de Pcb en Algérie au niveau des parcelles de production de pomme de terre.

Résultats et discussion

Tableau 21: Les souches bactériennes étudiées dans cette étude, y compris les souches pour lesquelles des séquences ont été prises à partir GenBank.

Souche	Hôte	Origine	Numéro d'accension					
			16S	<i>mdh</i>	<i>acnA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>								
ICMP 1526 ¹	<i>Solanum tuberosum</i>	UK		GQ144373	JN600333	JF311476	JF311589	JF311702
NZEC20	<i>Solanum tuberosum</i>	Nouvelle Zélande		GQ144374				
SCRI 1043	<i>Solanum tuberosum</i>	UK		EF550788	EF550630	ECA4512	ECA4438	ECA0712
<i>Pectobacterium betavascularum</i>								
ICMP 4226 ¹	<i>Beta vulgaris</i>	USA		GQ144369				
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>								
LMG 21371 ^T	<i>Solanum tuberosum</i>	Brésil		JF926799	JF926769	JF311492	JF311605	JF311718
CFIA 1001	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada		JF926797	JF926767	----- NZ_JPSM00000000* -----		
CFIA 1009	<i>Solanum tuberosum</i>	Canada		JF926796	JF926766	----- NZ_JPSN00000000* -----		
Ecbr8	<i>Solanum tuberosum</i>	Brésil		JF926798				
Ecbr371	<i>Solanum tuberosum</i>	Brésil		JF926800				
Ecbr1692	<i>Solanum tuberosum</i>	Brésil		EF550786				
Ecbr1695	<i>Solanum tuberosum</i>	Brésil		EF550787				
HNA2	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY747994				
HNA8	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY747995				
HNA9	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY747996	MF509854	MF509860	MF509866	MF509872
HNA15	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY747997				
HNA26	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie	KY751954	KY747998				
HNA27	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY747999	MF509858	MF509864	MF509870	MF509876
Pcbm-3	<i>Solanum tuberosum</i>	Japon		LC145732				
WPP165	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550795				
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>								
ICMP 5702 ^T	<i>Solanum tuberosum</i>	Danemark		GQ144372	GQ144392	JF311488	JF311601	JF311714
B-P2	<i>Cichoriumintybus</i>	Japon		AB744170				
DAPP-PG 752	<i>Solanum tuberosum</i>	Liban		KP151644	MF984399	KR558755	KR558756	KR558757
Ecc21	<i>Solanum tuberosum</i>	Pays Bas		EF550779				
Ecc71	<i>Solanum tuberosum</i>	Pays Bas		EF550780				
Ecc193	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550782				
Ecc380	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550810				
HNA1	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748000				
HNA3	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748001				
HNA4	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748002				
HNA5	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748003	MF509853	MF509859	MF509865	MF509871
HNA6	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748004				
HNA11	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748005				
HNA12	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748006	MF509855	MF509861	MF509867	MF509873
HNA13	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748007				
HNA17	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748008				
HNA18	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie	KY751953	KY748009	MF509856	MF509862	MF509868	MF509874
HNA19	<i>Solanum tuberosum</i>	Algerie		KY748010				

Tableau 21 (Suite)

Souche	Hôte	Origine	Numero d'accension					
			16S	<i>mdh</i>	<i>acnA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>								
HNA20	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748011				
HNA21	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748012				
HNA22	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748013	MF509857	MF509863	MF509869	MF509875
HNA24	<i>Solanum tuberosum</i>	Algérie		KY748014				
NZEC 118	<i>Solanum tuberosum</i>	Nouvelle Zelande		GQ144384				
WPP 14	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550761	AY429004	----- ABVY01000000* -----		
WPP 17	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		AY428983				
WPP 127	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EU250368				
WPP 236	<i>Arctiumminus</i>	USA		EF550808				
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>								
ICMP 11533 ^T	<i>Cichoriumintybus</i>	France		GQ144370				
NCPPB 3841	<i>Cichoriumintybus</i>	France			----- NZ_JQOF00000000* -----			
<i>Pectobacterium wasabiae</i>								
WPP 19	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550760				
WPP 172	<i>Solanum tuberosum</i>	USA		EF550809				
<i>Yersiniapestis</i>								
CO92	-	-		YP03516	YPO2221	YPO4121	YPO4094	YPO3496

Des isolats de référence publiés dans la banque de gène NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) et dont les cinq gènes séquencés ont été intégrés à notre analyse.

DAPP-PG, Département des Sciences de l'Agriculture, de l'Alimentation et de l'Environnement, Unité de la protection des végétaux, Université de Perugia (Italie) ; ICMP, Collection internationale de micro-organismes provenant de plantes, Landcare Research, Nouvelle-Zélande ; JKI, Institut Julius Kühn, Dossenheim et Quedlinburg, Allemagne ; LMG, BCCM / LMG Collection de bactéries, Belgique ; SCRI, Scottish Crop Research Institute, Dundee, Royaume-Uni.

Les séquences des isolats Algériens d'HNA ont été déterminées dans le cadre de cette étude.

* Les chiffres indiquent les numéros d'accension du génome complet.

III.5. Activités enzymatiques dégradatives des tissus de pomme de terre

Les bactéries responsables de la maladie de pourriture molle disposent d'un arsenal d'enzymes extracellulaires (pectine méthylestérases, pectine lyases, polygalacturonases, cellulases et protéases) indispensables à la dégradation des polysaccharides et des composants de la paroi des cellules végétales permettant ainsi des infections qui entraînent des symptômes de pourriture et de flétrissement (Sjöblom, 2009 ; Panda, 2014).

III.5.1. Activité pectinolytique

L'activité pectinolytique a été testée sur milieu PGA, elle se manifeste par l'apparition d'un halo blanchâtre sur fond bleu autour des colonies (figure 18).

Tous les isolats testés présentent des activités dégradatives de l'acide polygalacturonique (PGA).

Une étude précédente a déjà corrélié la pathogénicité et les activités pectinolytiques comme un rôle vital dans la macération des tissus végétaux pendant l'infection causée par les micro-organismes (Yong et *al.*, 2009).

III.5.2. Activité cellulasique

L'activité de cellulase a été testée sur milieu M63 contenant le CMC comme seule source de carbone et d'énergie.

Après 48h d'incubation, tous les isolats apparus cellulase +, ils se trouvent entourés d'un halo de couleur orange témoignant la dégradation de CMC via leur enzymes cellulase (figure 18), ce qui est en concordance avec les résultats trouvés par Dees (2017) et Waleron et *al.* (2018).

III.5.3. Activité protéasique

L'activité protéasique a été testée sur milieu gélose au lait et qui est traduite par l'apparition d'une zone claire autour des colonies après 48h d'incubation à 30°C (figure 18).

Le rôle majeur de cette enzyme a été démontré par plusieurs expériences dans la phytopathogénicité, montrant une virulence réduite par rapport à la souche sauvage des

mutants de gène prtW, lorsqu'elles sont inoculées sur des tubercules de pommes de terre (Salmond et al., 1992).

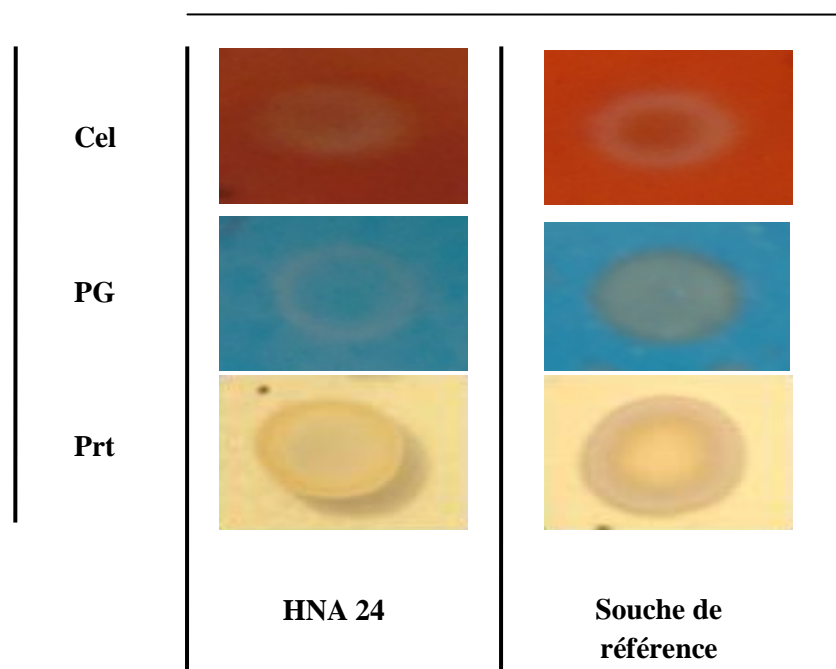


Figure 18: Révélation des activités cellulase (Cel), polygalacturonase (PG) et protéase (Prt) de l'isolat HNA24.

III.6. Test de pathogénicité sur tubercules de pommes de terre

La capacité des isolats à provoquer les symptômes de la maladie de la pourriture molle sur les tubercules de trois variétés de pomme de terre *Spunta*, *Fabula* et *Agata* a été testée par la pesée des tissus macérés après 4 jours d'incubation des tubercules inoculés. Les valeurs du poids de pourritures mesurées de chaque isolat pour chaque variété de pomme de terre sont présentées dans le tableau 22.

Tableau 22: Valeurs des poids de pourritures des tubercules des cultivars *Spunta*, *Fabula* et *Agata* de la pomme de terre.

Cultivar Isolat	<i>Spunta</i>	<i>Fabula</i>	<i>Agata</i>
HNA1	11.8abc	4.5abc	14.1 abc
HNA2	23.4ab	6.6abc	3.8 ab
HNA3	21.6abc	14.1a	24.4 c
HNA4	5.7bc	3.8c	11.6 abc
HNA5	21abc	4.5abc	13.2 abc
HNA6	17.8abc	6.2abc	24.9 c
HNA8	24.8ab	6.3abc	15.2 abc
HNA9	17.7abc	4.5abc	12.9 abc
HNA11	29.1a	7.1abc	2.7 a
HNA12	26ab	13.8ab	4.7 abc
HNA13	30.5a	6.9abc	12.2 abc
HNA15	22.2abc	4.4abc	23.9 c
HNA17	24.2ab	9.2abc	16.7 abc
HNA18	4.5c	4.5abc	5.7 abc
HNA19	10bc	3.6c	10.8 abc
HNA20	23.2abc	8.1abc	15.2 abc
HNA21	9.9bc	4bc	12.1 abc
HNA22	15.1abc	4bc	29.3 c
HNA24	16abc	8.5abc	9.1 abc
HNA26	12.7abc	4bc	18.3 bc
HNA27	8.3bc	2.3c	16.3 abc

Le pouvoir pathogène des isolats testés sur les tubercules de pomme de terre est exprimé en g de tissu pourri (4 jours après l'inoculation). Chaque valeur est la moyenne de trois répétitions. Les valeurs suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Tukey HSD ($p = 0.05$).

Il ressort de l'analyse des résultats du tableau 22 que tous les isolats testés ont été capables d'induire des symptômes de la maladie de la pourriture molle chez les trois cultivars *Spunta*, *Fabula* et *Agata* (figures 19), cependant, la capacité de macération était différente d'un isolat à un autre, mais aussi d'une variété de pomme de terre à une autre, comme détaillée ci-dessous.

III.6.1. Effet du facteur isolat

D'après l'analyse de la variance, le résultat du test de comparaison des moyennes des valeurs du pouvoir pathogène pour le facteur isolat montre qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) de la pathogénicité entre les différents isolats vis à vis des trois variétés de pommes de terre *Agata*, *Fabula* et *Spunta* (figure 19 et tableau 22).

Dans l'ensemble, nos isolats ont montré une différence d'activités pectinolytiques, entre formes modérées et sévères, qui peut être corrélée aux pommes de terre à partir desquelles ils ont été isolés. Les isolats les plus virulents étaient HNA13, HNA3, et HNA22, avec 30.5g, 14,1g et 29.3g de poids macéré, sur les variétés *Spunta*, *Fabula* et *Agata*, respectivement. Ces isolats ont tous été isolés des tubercules de la variété *Spunta* et ont révélé des activités de 6 à 11 fois supérieures à celles des moins virulents HNA18, HNA27 et HNA 11, qui ont été isolés du cultivar *Désirée*.

Ces différences dans l'agressivité de nos isolats suggèrent qu'ils sont très diversifiés, même s'ils ont été isolés à partir de la même région ou du même cultivar de pomme de terre. De telles différences ont été signalées par de nombreux auteurs (Smith et Bartz, 1990 ; Priou et *al.*, 1992 ; Yahiaoui-Zaidi et *al.*, 2010), et ont été attribuées à des facteurs intrinsèques (déterminants génétiques de la bactérie) et extrinsèques, telles que les conditions climatiques et les plantes hôtes (Kersey et *al.*, 2012).

Bien que la capacité de macération des tubercules de pomme de terre est une caractéristique de toutes les bactéries pectinolytiques, cependant il est bien établi que cette

activité est influencée par les niches écologiques, les conditions climatiques et les plantes hôtes, et varie aussi bien entre les espèces qu'entre les souches au sein de la même espèce ou sous-espèce (Pérombelon 2002 ; Pitman et *al.*, 2010 ; Charkowski, 2018).

Trois souches de Pcb (HNA9, 26, 27) étaient moins agressives que Pcc sur la variété *Spunta*, à l'exception des souches HNA2 et HNA8 qui étaient plus agressives sur la variété *Spunta*, et HNA15 sur les deux variétés *Spunta* et *Agata*.

On a aussi noté que six (50%) des isolats provenant de la variété de pomme de terre *Spunta* (HNA5, 8, 12, 13, 15 et 17) avaient une capacité de macération plus élevée sur le même cultivar à partir duquel ils ont été isolés (*Spunta*).

Plusieurs travaux ont mis en évidence que la température était l'un des facteurs externes les plus importants influant sur la survie de *D. dadantii* dans l'environnement, augmentant également le taux de croissance et l'activité métabolique et, par conséquent, sa capacité à provoquer des maladies (Hugovieux-Cotte-Pattat et *al.* 1996). Ainsi, il a été démontré que les souches de Pcb se comportent différemment selon la région, des souches de Pcb isolées au Brésil et en Afrique du Sud sont très virulentes et présentent une macération élevée sur tubercule (Duarte et *al.*, 2004 ; van der Merwe et *al.*, 2010). Tandis que des souches de Pcb isolées au Canada étaient beaucoup moins agressives (De Boer et *al.*, 2012).

Dans le même sens, il a été reporté que des souches appartenant au genre *Dickeya* provenant de Pologne et de Finlande, avec des conditions climatiques différentes, et malgré qu'elles soient très proches au niveau génotypique, elles se comportent très différemment dans certaines conditions environnementales, particulièrement la température d'incubation (Golanowska, 2015).

III.6.2. Effet du facteur variété de pomme de terre

Les résultats des tests de pathogénicité ont montré une interaction significative ($p < 0,001$) entre nos isolats et les trois cultivars, ce qui indique que la virulence dépend de la variété de pomme de terre (figure 19 et tableau 22).

Au regard des résultats obtenus par la mesure des poids des macérâts, on a constaté que les trois cultivars, *Agata*, *Fabula* et *Spunta*, ont présenté différents niveaux de sensibilité

vis-à-vis des isolats. On a remarqué que dans la plupart des cas, le cultivar *Fabula* est le plus résistant à la pourriture molle, alors que le cultivar *Spunta* est le plus sensible, avec un poids de macérât 2 fois supérieur à celui de *Fabula*.

Il a été reporté que la résistance variétale peut varier selon l'âge des tubercules de pommes de terre. Les variétés à maturation tardive sont généralement plus résistantes à la pourriture molle que les variétés à maturation précoce (Lapwood et Read, 1985 ; Rabot et al., 1994). Cette résistance peut être due à la présence de grandes quantités de pectines méthylées, qui ne sont pas facilement dégradables par les pectinases de bactéries pectinolytiques (Dorel et al., 1996).

Dans d'autres études, la résistance à la pourriture molle semble être liée à la concentration de calcium dans les tubercules de semence. Cependant, les résultats varient en fonction des cultivars utilisés (Pagel et Heitefuss, 1989).

Néanmoins, aucun cultivar de pomme de terre ne semble complètement résistant actuellement aux espèces de *Dickeya* et de *Pectobacterium* (Czajkowski et al., 2011 ; Gerardin et al., 2013).

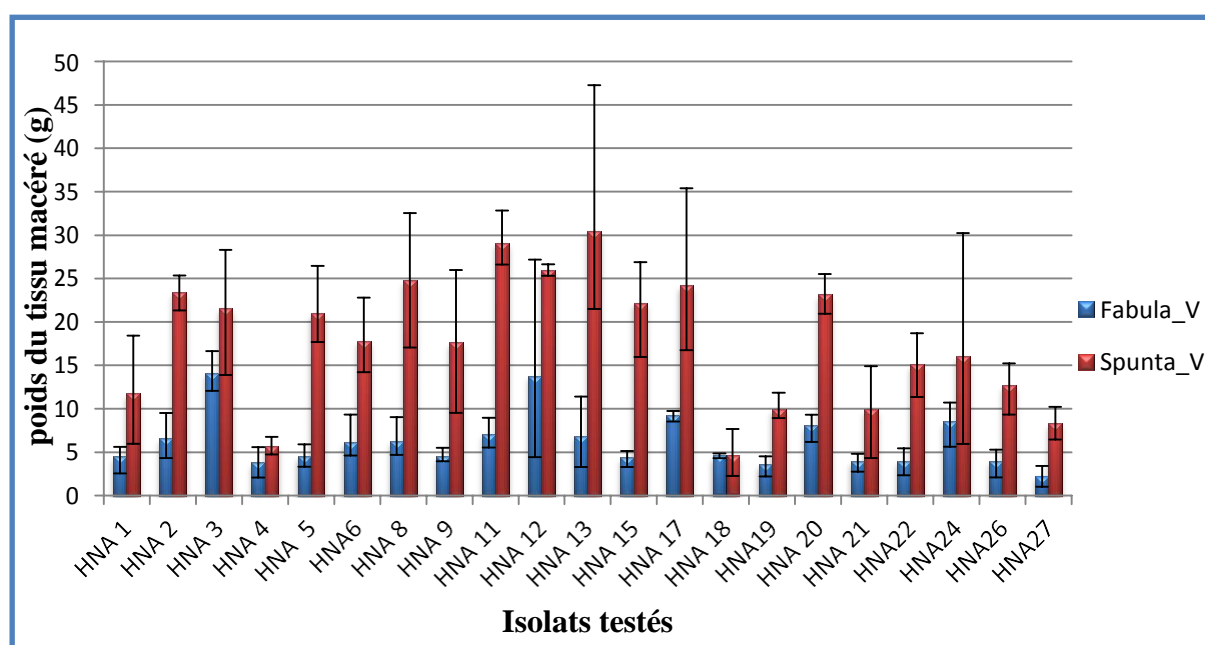


Figure 19: Pouvoir pathogène des isolats testés sur deux cultivars de pommes de terre (*Spunta* et *Fabula*) mesuré en pesant le tissu macéré.

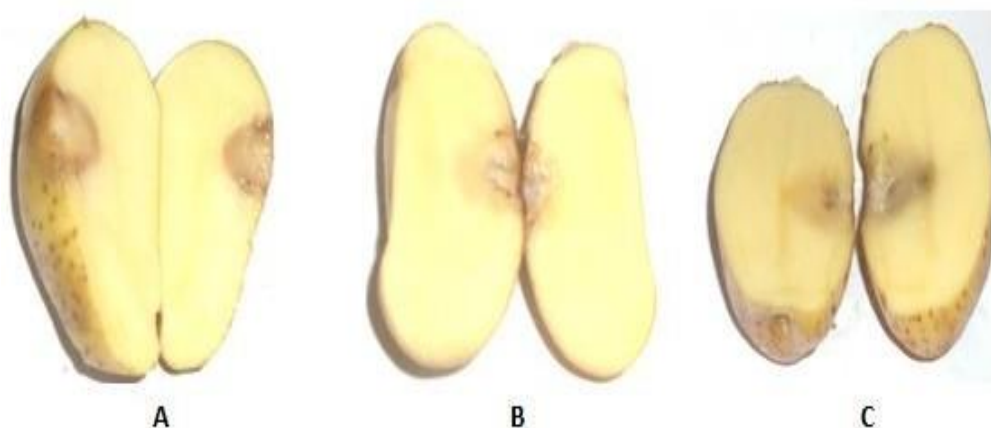


Figure 20: Résultats du test de pathogénicité sur tubercules de pomme de terre de la variété *Fabula*, inoculés par quelques isolats testés.

A: HNA24 ; B: HNA12 ; C: HNA13

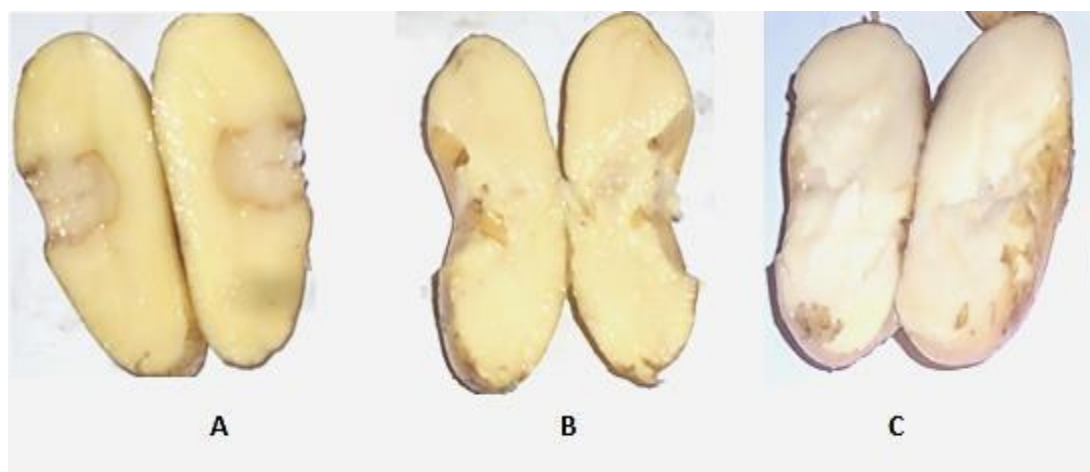


Figure 21: Résultats du test de pathogénicité sur tubercules de pomme de terre de la variété *Spunta*, inoculés par quelques isolats testés.

A: HNA24 ; B: HNA22 ; C: HNA17

III.7. Test d'hypersensibilité

Pectobacterium spp. provoque l'expression de la maladie chez les plantes hôtes ou sensibles, mais induit une réaction d'hypersensibilité (RH) chez les plantes non hôtes ou résistantes comme le tabac (Büttner et He, 2009). Une réponse d'hypersensibilité positive est

une réaction rapide de défense de la plante, caractérisée par une nécrose des tissus au point d'infection, et une mort programmée des cellules (Naessens, 2016), avec la production de divers agents antimicrobiens bloquant ainsi la progression du pathogène (Klement, 1982).

Comme montré dans les figures 22 et 23, tous les isolats testés ont engendré, avec des degrés variables, une réponse hypersensible sur les feuilles de tabac et de géranium, de la même manière que la souche utilisée comme contrôle positif Pcc (DAPP-PG 764) ; tandis qu'aucune réponse hypersensible n'a été observée avec le témoin négatif Pw (DAPP-PG 749).

Ceci confirme d'autres travaux qui ont établi l'existence de réactions HR chez les bactéries pectinolytiques (Glasner et *al.* 2008 ; Dadaşođlu et Kotan, 2017). Cette réaction, se produit par l'intermédiaire du système de sécrétion de type III (T3SS), qui est un facteur de virulence important chez de nombreuses bactéries Gram négatif (Salmond 1994). L'incapacité de certaines souches telle que Pw (témoin négatif) à provoquer une réaction d'hypersensibilité est liée à l'absence du système T3SS (Ma et *al.*, 2007 ; Kim et *al.*, 2009 ; Pitman et *al.*, 2010).

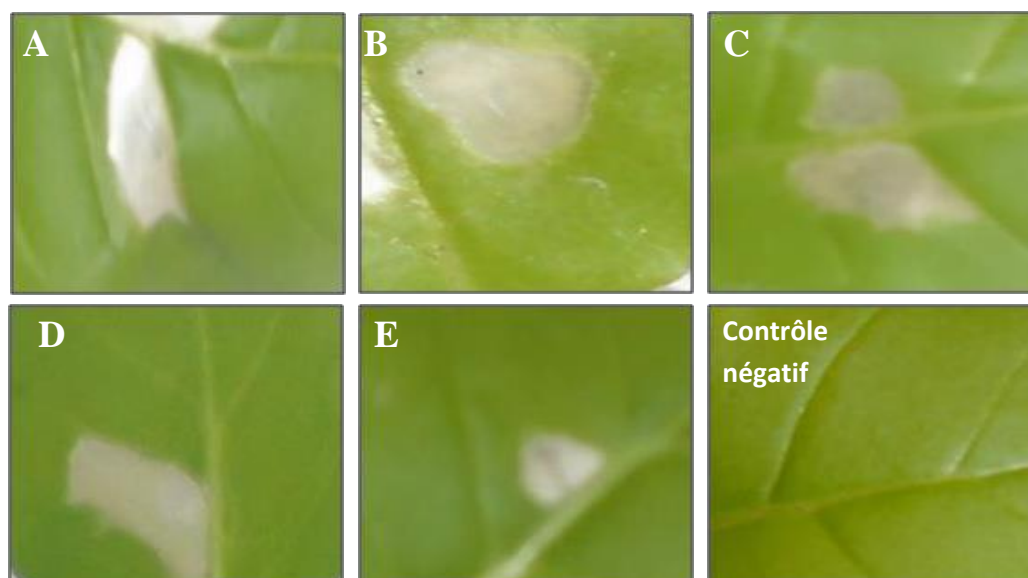


Figure 22: Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de tabac.

A: HNA24, B: HNA1, C: HNA22, D: HNA12, E: souche de référence Pcc (DAPP-PG 764),
contrôle négatif : EDS.

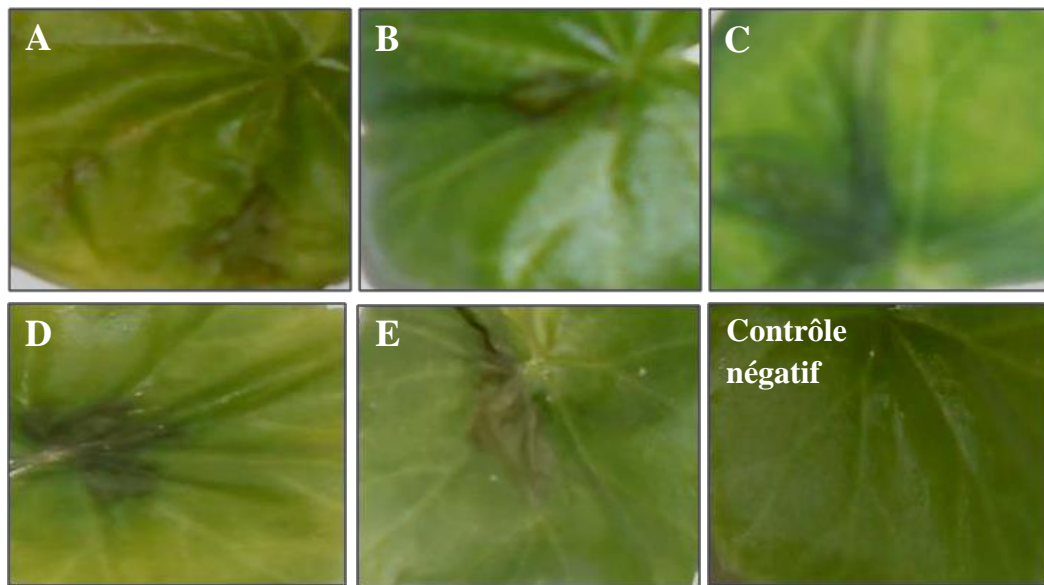


Figure 23: Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles géranium.

A: HNA24, B: HNA1, C: HNA22, D: HNA12, E: souche de référence Pcc (DAPP-PG 764),
contrôle négatif : EDS.

Conclusion et Perspectives

Les maladies de la jambe noire et de la pourriture molle de la pomme de terre, causées par les bactéries pectinolytiques, sont des maladies très destructrices pour les cultures de pomme de terre, que ce soit aux champs ou en stockage, occasionnant des pertes économiques importantes à travers le monde. En dépit de nombreuses recherches effectuées depuis longtemps, les mesures de contrôle existantes demeurent inefficaces contre ces maladies. Ainsi, l'identification précise de ces pathogènes, la compréhension de leurs caractéristiques génétiques et pathogéniques et leurs interactions avec les plantes hôtes sont nécessaires pour le développement de mesures de contrôle efficaces.

L'objectif de ce travail était d'isoler et de caractériser au niveau microbiologique, biochimique et moléculaire des isolats de bactéries pectinolytiques responsables de la jambe noire et de la pourriture molle de tubercules de pommes de terre, collectés aux champs et aux chambres de stockage au niveau de quelques régions du Nord d'Algérie.

Les tests physiologiques et moléculaires ont confirmé la présence de 21 bactéries pectinolytiques du genre *Pectobacterium*, réparties entre les deux sous espèces Pcc (n=15, 71%) et Pcb (n=6, 29%), sur les 247 échantillons de tubercules analysés. À notre connaissance, c'est la première signalisation de la présence de Pcb en Algérie. Du point de vue épidémiologique, la détection de Pcb est une importante observation, car compte tenu de son agressivité et sa dissémination rapide à travers le monde, Pcb est en train de devenir un pathogène de plus en plus important, qui, parmi les *Pectobacterium*, peut présenter le plus grand risque sur la production de pommes de terre en Algérie.

La diversité des souches a été estimée à l'aide de différents outils moléculaires (PCR, MLSA et séquençage). Ces études ont établi l'existence d'une diversité génétique parmi les souches de Pcc, même au sein de celles isolées de la même région, durant la même saison et de la même variété de pomme de terre. Ceci confirme la très grande diversité existante chez les bactéries pectinolytiques, qui contribue en grande partie à l'échec ou le peu d'efficacité des méthodes de diagnostic.

Les résultats de cette étude constituent une contribution positive à l'état des connaissances actuel sur les bactéries pectinolytiques qui peuvent affecter la culture de la pomme de terre en Algérie ; et au vu de ces données il est important de mettre en œuvre des systèmes de contrôle et de surveillance continus de tous les potentiels de contaminations de la pomme de terre, que ce soit au niveau des ports d'entrées (pour limiter l'introduction des pathogènes transmis par des semences de tubercules importées), aux champs ou lors du stockage. Un effort particulier doit être aussi investi pour l'implémentation des méthodes de diagnostic moléculaires, qui permettent la détection spécifique, rapide et reproductible de ces pathogènes dans leurs différents réservoirs potentiels (semence, plante, eau, sol, ...), et même lors des infections latentes et asymptomatiques, afin d'assurer une prédiction précoce de la maladie. L'Algérie doit aussi mettre au point une stratégie de lutte intégrée, reposant sur un transfert régulier de connaissances entre les producteurs, les agronomes et les scientifiques.

En perspective à cette étude, il serait intéressant de :

- (i) mener une enquête plus élargie, en augmentant le nombre d'échantillons et leurs répartitions géographiques, afin de mieux estimer la prévalence réelle des maladies liées aux bactéries pectinolytiques en Algérie.
- (ii) déterminer avec beaucoup plus de précision si les souches de bactéries pectinolytiques locales sont d'origine endémique ou exotique.
- (iii) évaluer la gamme d'hôtes et l'agressivité des souches appartenant à cette population Algérienne de bactéries pectinolytiques.
- (iv) identifier les facteurs associés à la virulence de nos isolats, pour cela le séquençage d'un génome représentatif, suivi par des approches de la génomique fonctionnelle, sont envisageables.
- (v) évaluer l'efficacité des méthodes de lutte biologique basées sur l'utilisation de bactéries antagonistes ou leurs produits.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Acquaah G. (2007).** Breeding wheat in Principles of Plant Genetics and Breeding. Blackwell Publishing.
- **Agrios GN. (1997).** Plant Pathology. *Elsevier academic Press*, 4th ed. New York.
- **Andro T, Charnbost JP, Kotoujansky A, Cattaneo J, Bettreau Y, Barras F, Van Gijsegem F et Coleno A. (1984).** Mutants of *Erwinia chrysanthemi* defective in secretion of pectinase and cellulase. *J Bacteriol* ,**160**: 1199-1203.
- **Anwar D, Shabbir D, Shahid MH et Samreen W. (2015).** Determinants of potato prices and its forecasting: A case study of Punjab, Pakistan. Université Library de Munich. Allemagne.
- **Arora RK et Khurana SMP .(2004).** Major fungal and bacterial diseases of potato and their management. *In Fruit and Vegetable Diseases, K.G. Mukerji, ed.* (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 189-231.
- **Avrova AO, Hyman LJ, Toth RL et Toth IK. (2002).** Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 1499–1508.

B

- **Bain RA, Perombelon MCM, Tsor L et Nachmias A. (1990).** Blackleg development and tuber yield in relation to numbers of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on seed potatoes. *Plant Pathology*, **39**: 125-33.
- **Barras F, Van Gijsegem F et Chatterje AK. (1994).** Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, **32**: 201-34.
- **Baz M, Lahbabi D, Samri S, Val F, Hamelin G, Madore I, Bouarab K, Beaulieu C, Ennaji MM et Barakate M. (2012).** Control of potato soft rot caused by

Pectobacterium carotovorum and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**: 303-311.

• **Belguendouz A. (2012)**. Essai de substitution des milieux de culture en micropropagation et la physiologie de la microtubérisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L). Mémoire de Magister. Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen. Algérie. P184 p.

• **Bell A, Mück O, Schuler B (2000)**. Les plantes à racines et tubercules en Afrique: Une contribution au développement des technologies de récolte et d'après-récolte. Les richesses du sol. *Deutsche Stiftung für internationale Entwicklung* (DSE), Feldafing, Germany, 330.

• **Bell KS, Sebahia M, Pritchard L, Holden MT, Hyman LJ. et al. (2004)**. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 11105–11110. doi: 10.1073/pnas.0402424101

• **Bernhards U. (1998)**. La pomme de terre *Solanum tuberosum* L. Monographie. Institut National Agronomique Paris - Grignon.

• **Blot N, Berrier C, Cotte-Pattat NH, Ghazi A et Condemine G. (2002)**. The oligogalacturonate-specific porin KdgM of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new porin famil. *J Biol Chem*, **277** : (10), 7936-7944.

• **Bonierbale M, Zapata GB, Zum Felde T et Sosa P. (2010)**. Composition nutritionnelle des pommes de terre. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, **45**(6): S28-S36.

• **Boufares K. (2012)**. Comportement de trois variétés de pommes de terre (*Spunta*, *Désirée* et *Chubaek*) entre deux milieux de culture substrat et hydroponique. Mémoire de Magister. Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen. Algérie. P108.

• **Boussemart G. (2010)**. Rôle des glucanes périplasmiques osmorégulés dans la perception du signal par les systèmes à deux composants chez *Dickeya dadantii*. Thèse de Doctorat. Université Lille 1 sciences et technologies. France. P159.

• **Boyd C, Keen N T. (1993)**. Characterization of the prtA and prtB genes of *Erwinia chrysanthemi* EC 16. *Gene*, **133**(1): 115-118.

- **Boyer MH, Chambost JP, Magnan M et Cattaneo J. (1984).** Carboxymethyl-cellulase from *Erwinia chrysanthemi*. I. Production and regulation of extracellular carboxymethyl-cellulase. *Journal of Biotechnology*, **1**(3-4): 229-239.
- **Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Vancanneyt M, Swings J et Coutinho T. (2008).** Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, **31**: 447- 460.
- **Buonaurio R, Caglioti C, Pires MM, Moretti Ch et Innocenti M. (2002).** Occurrence of a soft rot of calla (*Zantedeschia aethiopica*) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in central Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, **41**: 152-156.
- **Bustan A, Sagia M, De Malach Y et Pasternak D. (2004):** Effects of saline irrigation water and heat waves on potato production in an arid environment. *Field Crops Research*, **90**: 275-285.
- **Büttner D et He S.Y. (2009).** Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiology*, **150**:1656-1664.

C

- **Cahill G, Fraser K, Kowalewska MJ, Kenyon DM et Saddler GS. (2010).** Recent findings from the *Dickeya* survey and monitoring programme. In: *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*, Dundee, UK, 171-6.
- **Centre National de Contrôle et Certification des Semences et Plants, Alger (CNCC). (2013).** L'Agriculture : 50 ans de labour et de labour (Semences de pomme de terre). 1-8.
- **Charkowski AO. (2018).** The changing face of bacterial soft-rot diseases. *Annual review of phytopathology*, **56**: 269-288.
- **Charkowski AO, Lind J et Rubio-Salazar I. (2014)** .Genomics of Plant-Associated Bacteria: The Soft Rot Enterobacteriaceae. In, Gross,D.C., Lichens-Park,A., and Kole,C. (eds), *Genomics of Plant-Associated Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 37–58.

- **Charkowski A, Blanco C, Condemine G, Expert D, Franza T, Hayes C et Pirhonen, M. (2012).** The role of secretion systems and small molecules in soft-rot Enterobacteriaceae pathogenicity. *Annual review of phytopathology*, **50**:425-449.
- **Charkowski AO. (2006).** The soft rot *Erwinia*. In: Plant-Associated Bacteria. Ed. Gnanamanickam, S.S. Dordrecht. *The Netherlands: Springer*, 423-505.
- **Chaumeton H, Jutier S, et Frangnaud C. (2006).** La culture des pommes de terre. 93p.
- **Chibane A. (1999).** Techniques de production de la pomme de terre au Maroc. Bull. Mens. De liaison et d'information du PNTTA ; MADRPM/ DERD. Institut d'Agronomie de Hassan II, Rabat. Maroc. P52.
- **Choi O et Kim J. (2013).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on paprika in Korea. *Journal of Phytopathology*, **161**:125-127.
- **Cladera-Olivera F, Caron GR, Motta AS, Souto AA et Brandelli A. (2006).** Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology*, **52**: 533-539.
- **Compant S, Brion D, Jerzy N, Christophe C et Ait Barka E. (2005).** Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol*, **71**(9): 4951-4959.
- **Condemine G, Castillo A, Passeri F et Enard C. (1999).** The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 45-52.
- **Costa AB, Eloy M, Cruz L, Janse JD et Oliveira H. (2006).** Studies on *Pectobacteria* spp. in Portugal reveal unusual strains of *E. carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Plant Pathology*, **88** (2):161-169.
- **Craig L, Pique ME, Tainer JA. (2004).** Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 363–378.
- **Crosnier JC. (1987)** .Pomme de terre: importance économique, plante, techniques culturales. *Tech. Agric*, 2080-2081.
- **Cuppels D et Kelman A. (1974).** Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology*, **64**(4): 468-475.
- **Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S , Lojkowska E , Potrykus M, Van Der Wolf JM et Sledz W. (2015).** Detection, identification and differentiation of

Pectobacterium and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*, **166**(1):18-38.

• **Czajkowski R, De Boer WJ, Van Veen JA, Van Der Wolf JM, (2012).** Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta. *Plant Pathology*, **61**:169–82.

• **Czajkowski R, Pérombelon MCM, Van Veen JA et Van Der Wolf JM. (2011).** Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology Journal*, **60**: 999-1013.

• **Czajkowski R, Grabe GJ et Van Der Wolf JM. (2009).** Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *European Journal of Plant Pathology*, **125**:263-275.

D

• **Dadaşoğlu F et Kotan R. (2017).** Identification and characterization of *Pectobacterium carotovorum*. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, **27**(2): 647-654.

• **Darpoux R et Debelley M. (1967).** Les plantes sarclées. Edition. J.B. Baillière et fils france. Collection d'Enseignement Agricole, 307p.

• **Darrasse A, Priou S, Kotoujansky A et Bertheau Y. (1994).** PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 1437-1443.

• **De Boer SH, Li X et Ward LJ. (2012).** *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, **102**: 937-947.

• **De Boer SH. (2002).** Relative incidence of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in stolon end and peridermal tissue of potato tubers in Canada. *Plant disease*, **86**(9), 960-964.

• **De Boer SH et Ward LJ. (1995).** PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. *Phytopathology*, **85**: 854-858.

- **De Boer SH., Copeman RJ, Vrugink H. (1979).** Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens. *Phytopathology*, **69**: 316–319.
- **De Haan E, T Dekker-Nooren G, Van Den Bovenkamp A, Speksnijder P, Van Der Zouwen J et Van Der Wolf. (2008).** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology*, **122**:561-9.
- **De Werra P, Bussereau F, Ziegler D et Keiser A. (2015).** First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Disease*, **99**: 551-551.
- **Dees M W, Lebecka R, Perminow J IS, Czajkowski R, Grupa A, Motyka A, Zoledowska S, Sliwka J, Lojkowska E et Brurberg MB. (2017).** Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. *European Journal of Plant Pathology*, **148**: 839-851.
- **Degefu Y, Potrykus M, Golanowska M, Virtanen E, Lojkowska E. (2013).** A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland. *Annals of Applied Biology*, **162**: 231–241.
- **Delepelaire P et Wandersman C. (1990).** Proteinsecretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *Journal of Biological Chemistry*, **265(28)**:17118-17125.
- **Des Essarts Y. (2015).** Pathogénie de *Dickeya dianthicola* et *Dickeya solani* chez *Solanum tuberosum*, développement et évaluation de stratégie de lutte biologique. Thèse de Doctorat. Université Paris sud. France, P153.
- **Diallo S, Latour X, Groboillot A, Smadja B, Copin P, Orange N, Feuilloy MGJ, Chevalier S. (2009)** Simultaneous and selective detection of two major soft rot pathogens of potato: *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* subsp. *atrosepticum*) and *Dickeya* spp. (*Erwinia chrysanthemi*). *European Journal of Plant Pathology*, **125**: 349–354.
- **Dictionnaire Larousse. (2002).** La pomme de terre. In Larousse agricole, (Larousse), pp443-448

- **Direction des services agricoles de la wilaya de Chlef (DSA), 2019.** Service des statistiques agricoles
- **Dorel C, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Robert-Baudouy J et Lojkowska E. (1996):** Production of *Erwinia chrysanthemi* pectinases in potato tubers showing high or low level of resistance to soft-rot. *European Journal of Plant Pathology* ,**102**: 511-517.
- **Doumbouya M. (2015).** Diagnostic de sol et recommandations potassiques pour la culture de pomme de terre en sol minéral. Mémoire de Master. Université Laval. Canada. P77.
- **Duarte V, De Boer SH, Ward TL et Oliveora AMR. (2004).** Characterisation of atypical *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, **96**: 535-545.
- **Dupuis B, Michelante D, Garcia-Albeniz N et Nimal C. (2005).** Le point sur les infections par *Erwinia* spp. en plant de pommes de terre. Journée d'étude Pomme de terre-CRA-W Gembloux 1-7.
- **Duraffourd C et Lapraz JC. (2002).** Traité de phytothérapie clinique, Médecine et Endobiogénie. Edition Masson, Paris (FR), 204 p.
- **Dye DW. (1968).** A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The "amylovora" group. *New Zealand Journal of Science*, **11**: 590–607

E

- **Elander R P. (2003).** Industrial production of β -lactamantibiotics. *Appliedmicrobiology and biotechnology*, **61(5-6)**: 385-392.
- **Elphinstone JG, Parkinson NM, Bertrand V, Pritchard L et Toth IK, (2011).** Development of real time quantitative PCR assays for detection and identification of *Dickeya* species pathogenic to potato. *Potato Research* ,**54**: 97.
- **Elphinstone, J et Toth IK. (2007).** *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya* spp.) The Facts. British Potato Council Publications.
- **Elphinstone, JG.(1987).** Soft rot and blackleg of potato: *Erwinia* spp. Technical Information Bulletin, 21. International Potato Center, Lima, Peru, 18.
- **Elphinstone JG et Perombelon MCM. (1986).** Contamination of potatoes by *Erwinia carotovora* during grading. *Plant Pathology*, **35**: 25-33.

• **Expert D.(1999)**. Withholding and exchanging iron: interactions between *Erwinia* spp. and their plant hosts. *Annualreview of phytopathology*, **37(1)**: 307-334.

F

• **FAOSTAT. (2019)** : Statistiques de la FAO. <http://faostat.fao.org/>

• **FAOSTAT. (2015)** : Statistiques de la FAO. <http://faostat.fao.org/>

• **FAO. (2008)**. Organisation des nations pour l'Alimentation et l'agriculture. Année international de la pomme de terre (en ligne). Rouen, Parmentier, Mustel et la pomme de terre « Communication du Dr Karl Feltgen lors de la séance du 25 octobre 1995 du Groupe Histoire Des Hôpitaux De Rouen ». <http://www.potato2008.org/fr/>.

• **FAOSTAT. (2008)** : Statistiques de la FAO. <http://faostat.fao.org/>

• **Faquihi H, Terta M , Amdan M, Achbani EH, Ennaji MM et Mhand RA. (2015)**. Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum subsp carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco. *European journal of plant pathology*, **143(4)**: 801-811.

• **Faure D et Dessaux Y. (2007)**. Quorum sensing as a target for developing control strategies for the plant pathogen *Pectobacterium*. *European journal of plant pathology*, **119(3)**: 353-365.

• **Fessehaie A, De Boer SH, et Levesque CA. (2003)**. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology*, **93**:262-269.

• **Fiche produit pomme de terre Algérienne. (2013)**: Direction Analyse des produits ALGEX, Ed : Ministère du commerce « Agence national de développement et de l'investissement ». P12

• **Franza T, Mahe B et Expert D. (2005)**. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Mol Microbiol*, **55**: 261-275.

• **Frechon, D, Exbrayat P, Helias V, Hyman LJ, Jouan B, Llop P et Van Beckhoven JR. (1998)**. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* on potato tubers. *Potato research*, **41(2)**:163-173.

• **Fujimoto T, Yasuoka S, Aono Y, Nakayama T, Ohki T, Sayama M et Maoka T. (2017).** First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Japan. *Plant Disease*, **101**: 241-241.

G

• **Galán JE et Collmer A. (1999).** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284(5418)**: 1322-1328.

• **Galfout A. (2014).** Contribution à l'étude des nématodes du genre *Globodera* (Skarbilovich, 1959) sur pomme de terre et Gestion intégrée contre ce bio-agresseur. Mémoire de Magister. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El -Harrach- Alger. Algérie. P 100.

• **Gallais A et Bannerot H. (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées. Objectifs et critères de selection. Mieux Comprendre. Paris, FRA : INRA Editions, 768 p.

• **Gardan L, Gouy C, Christen R et Samson R. (2003).** Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp nov., *Pectobacterium betavasculorum* pnov and *Pectobacterium wasabiae* sp nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**: 381-391.

• **Garlant L. (2015).** Ecology and genomics of *Dickeya solani*, a new soft rot bacterium infecting potatoes.

• **Gerardin D, Rouffiange J, Kellenberger I, Schaerer S et Dupuis B. (2013).** Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp. *Recherche Agronomique Suisse*, **4**: 288-295.

• **Gerayeli N, Baghaee-Ravari S et Tarighi S. (2017).** Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology*, **150(4)**: 1049-1063.

• **Ghigo J M et Wandersman C. (1992).** A fourth metallo protease gene in *Erwinia chrysanthemi*. *Research in microbiology*, **143(9)**: 857-867.

• **Glasner JD, Yang CH, Reverchon S, Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Bohin J P et Plunkett G. (2011).** Genome sequence of the plant-pathogenic bacterium *Dickeya dadantii* 3937.

• **Glasner JD, Marquez-Villavicencio M, Kim HS, Jahn CE, Ma B, Biehl BS, Rissman AI, Mole B, Yi X, Yang CH, Dangl JL, Grant SR, Perma NT et Charkowski AO. (2008).** Niche specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 1549-1560.

• **Golanowska M, Kielar J et Lojkowska E. (2017)** . The effect of temperature on the phenotypic features and the maceration ability of *Dickeya solani* strains isolated in Finland, and Poland. *European Journal of Plant Pathology*, **147(4)**, 803-817.

• **Golanowska M. (2016).** Caractérisation de souches de *Dickeya solani* et identification de signaux bactériens ou végétaux impliqués dans l'induction de gènes de virulence. Thèse de Doctorat. University of Gdansk, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France. P169.

• **Goulet-Fortin J. (2009).** Modélisation des rendements de la pomme de terre par réseau de neurones. Thèse de Doctorat. Université Laval. Québec. P158.

• **Grenier AM, Duport G, Pages S, Condemine G et Rahbe Y. (2006).** The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 1956-1965

• **Gurib-Fakim A. (2006):** Medicinal plants. Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**: 1-93.

• **Gutell RR, Larsen N, Woese CR. (1994).** Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev*, **58**:10-26.

H

• **Hauben L et Swings J. (2005).** Family I. Enterobacteriaceae Genus XIII. *Erwinia Winslow*, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920, 209^{AL} emend.

- **Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L et Swings J. (1998).** Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. *Systematic and Applied Microbiology*, **21**: 384-397
- **Hawkes J-G. (1990).** The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. *Belhaven Press*, London. P 259.
- **Hélias V, Hamon P, Huchet E, Wolf JVD et Andrivon D. (2012).** Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology*, **61**: 339-345.
- **Hélias V. (2008).** *Pectobacterium spp* et *Dickeya spp.* de la pomme de terre: nouvelle nomenclature pour *Erwinia spp* symptomatologie épidémiologie et prophylaxie. *Cahiers Agricultures*, **17(4)**, 349-354.
- **Hélias V, Andrivon D et Jouan B. (2000).** Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* under field conditions and influence of their effects on the yield of individual potato plants. *Plant pathology*, **49**: 23-32.
- **Hélias V, Le Roux AC, Bertheau Y, Andrivon D, Gauthier JP et Jouan B. (1998).** Characterisation of *Erwinia carotovora* subspecies and detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in potato plants, soil and water extracts with PCR-based methods. *European journal of plant pathology*, **104**: 685-699.
- **Hellmers E. (1959).** *Pectobacterium carotovorum* var. *Atrosepticum* (van Hall) Dowson the correct name of the potato black leg pathogen; A historical and critical review. *European Potato Journal* **2**:251-271. "Potatoes - black leg and soft rot"
- **Hibar K., Daami-Remadi M et El Mahjoub M. (2007).** First report of ***Pectobacterium carotovorum* subsp. carotovorum** on tomato plants in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, **2(1)**, 1-6.
- **Holland IB, Schmitt L, Young J. (2005).** Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol. Memb. Biol.* **22**: 29e39
- **Hollande F, Shulkes A et Baldwin G S.(2005).** Signaling the junctions in gut epithelium. *Science Signaling*, **(277)**, pe13-pe13.
- **Hossain M, Shibata S, Aizawa S-I et Tsuyumu S. (2005).** Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiological and molecular plant pathology*, **66**: 134-43.

• **Howard RJ, Garland JA, Seaman WL. (1994).** Diseases and pests of vegetable crops in Canada. *Canadian Phytopathological Society and Entomological Society of Canada.*

• **Hugh R et Leifson E. (1953).** The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol*, **66(1)**: 24-26.

• **Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G et Shevchik VE. (2014).** Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity. *Environmental microbiology reports*, **6(5)**, 427-440.

• **Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W et Reverchon S. (1996).** Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annu. Rev. Microbiol*, **50**: 213-257.

• **Humphris SN, Cahill G, Elphinstone JG, Kell R, Parkinson NM, Pritchard L, Toth IK et Saddler GS. (2015).** Detection of the Bacterial Potato Pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. Using Conventional and Real-Time PCR. *Plant Pathology*, **1302**, 1-16.

• **Hyman LJ, Toth IK et Pérombelon MCM .(2002).** Isolation and identification. In: Methods for the Detection and Quantification of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*) on Potatoes: a Laboratory Manual, pp. 66–77. (Ed. Pérombelon MCM & Van der Wolf JM) Scottish Crop Research Institute. Occasional Publishers no. 10

• **Hyman L J, Toth IK ,Pérombelon MC.M et Van Der Wolf JM .(1998).** Isolation and identification in Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum*) on potatoes : a laboratory manual, Scottish Crop Research Institute Annual Report, Dundee, Scotland, The United Kingdom, pp. 64–71.

I

• **Ignatov AN, Egorova MS, Khodykina MV. (2015).** Spreading of bacterial and phytoplasma diseases in Russia. *Zashchita i karantin rastenii*, **5**: 6-9.

- Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles (ITCMI), (1989). Fiche technique des variétés de pomme de terre cultivées en Algérie.

J

- **Jackson, G. V. H. (2010).** Information from Diseases of vegetable crops in Australia from Bacterial rots of potato tubers. *The Food and Environment Research Agency*, Sand Hutton, York, UK. http://www.pestnet.org/fact_sheets/potato_soft_rot_296.htm
- **Josenhans C et Suerbaum S. (2002).** The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*, **291**: 605-614.
- **Kang HW, Kwon SW et Go SJ. (2003).** PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* spp. *carotovorum* by primers generated from URPPCR fingerprinting-derived polymorphic band. *Plant Pathology*, **52**: 127-133.

K

- **Kashyap DR., Vohra PK, Chopra S et Tewari R. (2001).** Applications of pectinases in the commercial sector. *Bioresourcetechnology*, **77(3)**:215-227.
- **Kechid M. (2005).** Physiologie et Biotechnologie de la microtuberisation de la pomme de terre *Solanum tuberosum*. L. Mémoire de Magister. Université Mentouri de Constantine. Algérie. P128.
- **Kersey C. M, Agyemang P. A, et Dumenyo, C. K. (2012).** CorA, the magnesium / nickel/cobalt transporter, affects virulence and extracellular enzyme production in the soft rot pathogen *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular plant pathology*, **13(1)**: 58-71.
- **Kettani-Halabi M. (2012).** Etude de la diversité de *Pectobacterium* spp. et des effets induits par les lipopolysaccharides chez les plantes. Thèse de Doctorat en Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI. France. P219.
- **Khayi S. (2015).** Génomique comparative des bactéries *Dickeya solani* et *Pectobacterium wasabiae*, pathogènes émergents chez *Solanum tuberosum*. Thèse de Doctorat en Sciences agricoles. Université Moulay Ismail. Maroc. P137.

- **Khayi S, Des Essarts YR, Quéту-Laurent A, Moumni M., Hélias V et Faure D. (2015).** Genomic overview of the phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* strain RNS 08.42. 1A suggests horizontal acquisition of quorum-sensing genes. *Genetica*, **143(2)**: 241-252.
- **Khayi S, Mondy S, Beury-Cirou A, Moumni M, Hélias Vet Faure, D. (2014).** Genome sequence of the emerging plant pathogen *Dickeya solani* strain RNS 08.23. 3.1 A. *Genome Announc.*, **2(1)**: e01270-13.
- **Kim HS, Thammarat P, Lommel SA, Hogan CS et Charkowski AO. (2011).** *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant-microbe interactions. *Molecular plant microbe interactions*, **24**: 773-86.
- **Kim HS, Ma B, Perna NT et Charkowski A.O.(2009).** Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**: 4539-4549.
- **Kim JF, Ham JH, Bauer DW, Collmer A et Beer SV. (1998).** The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*, **11**: 563-567.
- **Kleinkopf GE. (1983).** Potato in crop-Water relation. *TEARE ID*, 287-305.
- **Klement, Z (1982).** Hypersensitivity [Defense reaction of plants to pathogens].
- **Kõiv, V, Roosaare M, Vedler E, Kivistik PA, Toppi K, Schryer DW et Mäe A. (2015).** Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers. *Scientific reports*, **5**:11606.
- **Kõiv V, Andresen L, Broberg M, Frolova J, Somervuo P, Auvinen P et Mäe, A. (2013).** Lack of RsmA-mediated control results in constant hypervirulence, cell elongation, and hyperflagellation in *Pectobacterium wasabiae*. *PloS one*, **8(1)** : 54248.
- **Krzyzanowska DM, Potrykus M, Golanowska M, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A, Lojkowska E et Jafra S. (2012).** Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *pectobacterium* and *dickeya* spp. Strains. *Journal of PlantPathology*, **94 (2)**: 367-378.

• **Kumar S, Stecher G et Tamura K. (2016).** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, **33**: 1870-1874.

• **Kwasiborski A, Mondy S, Beury-Cirou A, Faure D .(2013).** Genome sequence of the *Pectobacterium atrosepticum* strain CFBP6276, causing blackleg and soft rot diseases on potato plants and tubers. *GenomeAnnouncement* 1: e00374–13.

• **Kyöstiö SR., Cramer CL et Lacy GH. (1991).** *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* extracellular protease: characterization and nucleotide sequence of the gene. *Journal of bacteriology*, **173(20)**: 6537-6546.

L

• **Lacroix M, Vezina L, Desjardins S et Beaulieu C .(1995).** Comparison of identification methods for *Erwinia* and *Pseudomonas* species causing soft rot diseases. *Phytoprotection*, **76(1)**: 27-37.

• **Lamara R. (2015).** Bioécologie de la teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* Zeller (lepidoptera : gelechiidae) sur trois variétés de pomme de terre (la Spunta, la Désirée et la Burren) dans les régions des Issers et Draa ben khedda et inventaire de l'entomofaune au niveau de parcelles des Issers. Mémoire de Magister. Université Mouloud Mammeri. Tizi-Ouzou. Algérie. P133.

• **Lapwood DH, Read PJ et Spokes J. (1985):** Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora*. *Plant Pathology*, **33**: 13-20.

• **Latour X, Faure D, Diallo S, Cirou A, Smadja B, Dessaux Y et Orange N. (2008).** Lutte contre les maladies bactériennes de la pomme de terre dues aux *Pectobacterium* spp. (*Erwinia carotovora*). *Cahiers Agricultures*, **17**: 355-360.

• **Laurent P, Buchon L, Guespin-Michel JF et Orange N. (2000).** Production of pectatylases and cellulases by the bacterium *Chryseomonas luteola* strain MFCL0 depends on the growth temperature and the nature of the culture medium: evidence for two critical temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 1538-1543.

- **Laurila J, Hannukkala A, Nykyri J, Pasanen M, Hélias V, Garland L et Pirhonen M. (2010).** Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya spp.* strains isolated from potato and river water in Finland. *Eur J Plant Pathol*, **126**: 249-262.
- **Laurila J, Ahola V et Lehtinen A. (2008).** Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, **122**: 213-25.
- **Laurila J, Lehtinen A, Ahola V, Pasanen M, Hannukkala A et Pirhonen M. (2007).** Characterisation of *Dickeya (Erwinia chrysanthemi)* strains causing potato blackleg and soft rot in Finland. In: Hannukkala A., Segerstedt M. (eds.). New and old pathogens of potato in changing climate, Proceedings of the EAPR Pathology Section seminar. Hattula : MTT Agrifood Research Finland.
- **Lautier T. (2007).** Rôle de la protéine associée au nucléoïde Fis dans le contrôle de la virulence chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. France. P200.
- **Lee DH, Kim JB, Lim JA, Han SW et Heu S. (2014).** Genetic diversity of *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* isolated in Korea. *The plant pathology journal*, **30(2)**: 117.
- **Lelliott RA et Dickey RS. (1984).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 (Krieg, NR and JG Holt, eds.).
- **Li X, Yuan K, Cullis J, Lévesque CA, Chen W, Lewis CT et De Boer S H. (2015).** Draft genome sequences for Canadian isolates of *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* with weak virulence on potato. *Genome Announcements*, **3(2)**: e00240-e00215.
- **Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Humphris S, Burr T, Takle G, Brurberg MB, Birch PR, Salmond GP et Toth IK. (2008).** Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogen*. **4**:e1000093.
- **Liu Q, Tarn R, Lynch D et Skjoldt NM. (2007).** Physicochemical properties of dry matter and starch from potatoes grown in Canada. *Food Chemistry*, **11**.

M

- **Ma B, Hibbing ME, Kim HS, Reedy RM, Yedidia L, Breuer J, Glasner JD, Perna NT, Kelman A et Charkowski AO. (2007).** Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, **97**: 1150-1163.
- **MADR. (2013).** Services de statistiques des cultures du Ministère d'Agriculture et du Développement Rural.
- **MADRP-DRDPA. (2017).** Direction de la Régulation et du Développement de la Production. Services de statistiques des cultures du Ministère d'Agriculture et du Développement Rural.
- **Mae A, Heikinheimo R et Palva T. (1995).** *Structure and regulation of the Erwinia carotovora subspecies carotovora SCC3193S cellulose gene celVI and the role of cellulose in phytopathogenicity.* *Molecular and General Genetics*, **247**: 17-26.
- **Maisuria VB et Nerurkar AS. (2012).** Characterisation and differentiation of soft rot causing *Pectobacterium carotovorum* of Indian origin. *Eur J Plant Pathol*, **136(1)**: 87-102.
- **Majeed A et Muhammad Z. (2018).** Potato production in pakistan: challenges and prospective management strategies-a review. *Pakistan Journal of Botany*, **50(5)** : 2077-2084.
- **Mantsebo CC, Mazarura U, Goss M et Ngadze, E. (2014).** The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens. *African Journal of Agricultural Research*, **9(19)**:1509-1515.
- **Marits R, Tshuikina M, Pirhonen M, Laasik E, Mäe A, (2002).** Regulation of the expression of prtW::gusA fusions in *Erwinia carotovora subsp. carotovora*. *Microbiology*, **148(3)**, 835–842.
- **Marits R, Koiv V, laasik E et Mae A. (1999).** Isolation of an extracellular protease gene of *Erwinia carotovora subsp. carotovora* strain Scc3193 by transposon mutagenesis and the role of protease in phytopathogenicity. *Microbiology*, **145**: 1959-1966.

- **Matsumoto H, Jitareerat P, Baba Y et Tsuyumu S. (2003).** Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, **3**: 226-37.
- **Matthew H.T., McGowan S.J., Bycroft B.W., Stewart G.S., Williams P., et Salmond G.P. (1998).** Cryptic carbapenem antibiotic production genes are widespread in *Erwinia carotovora*: facile trans activation by the *carR* transcriptional regulator. *Microbiology*, **144**(6):1495-1508.
- **Mayans O, Scott M, Connerton I, Gravesen T, Benen J, Visser J, Pickersgill R, Jenkins J.(1997).** Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus niger* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure* **5**, 677-689.
- **McGowan SJ, Sebahia M, O’Leary S, Hardie KR, Williams P et Stewart G.S. (1997)** Analysis of the carbapenem gene cluster of *Erwinia carotovora*: definition of the antibiotic biosynthetic genes and evidence for a novel beta-lactam resistance mechanism. *Mol Microbiol*, **26**: 545–556.
- **McNally RR, Curland RD, Webster BT, Robinson AP et Ishimaru CA. (2017).** First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg and stem rot in commercial and seed potato fields in Minnesota and North Dakota. *Plant Disease*, **101**: 1672-1672.
- **Mergaert J, Verdonck L, Kersters K, Swings J, Boeufgras JM et De Ley J. (1984).** Numerical Taxonomy of *Erwinia* species using API systems. *Microbiology*, **130**: 1893-1910.
- **Merrell DS, Hava DL et Camilli A. (2002).** Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, **43**:1471-1491.
- **Midoune A. (2015).** Recherche sur *Rhizoctonia solani* J.G.Kühn, agent du rhizoctone brun de la pomme de terre. Caractérisation morphologique, identification des groupes d’anastomose et comportement variétal. Mémoire de Magister. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach. Alger. Algérie. P85.
- **Mills AAS, Platt HW et Hurta RAR. (2006).** Sensitivity of *Erwinia* spp. To salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage. *Postharvest Biology and Technology*, **41**: 208-214.

- **Mitrophanov AY et Groisman EA. (2008).** Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development* **22**:2601-2611.
- **Moh AA. (2012).** Etude des facteurs écologiques influençant la croissance et le développement des *Pectobacterium* spp. infectant les tubercules de pomme de terre. Thèse de Doctorat. Université de Liège. Belgique. P137.
- **Mole B M, Baltrus DA, Dangi JL et Grant SR. (2007).** Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends in microbiology*, **15(8)**:363-371.
- **Moleleki LN, Onkending EM, Mongae A et Kubheka GC. (2013).** Characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, **135**: 279-88.
- **Moretti C, Fakhr R, Cortese C, De Vos P, Cerri M, Geagea L, Cleenwerck I et Buonauro R. (2016).** *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Lebanon. *Plant Pathology*, **144**: 205-211.
- **Motyka, A, Zoledowska S, Sledz W et Lojkowska E. (2017).** Molecular methods as tools to control plant diseases caused by *Dickeya* and *Pectobacterium* spp. A minireview. *New biotechnology*, **39**:181-189.
- **Moule C. (1972).** Plantes sarclées et déverses. J-B. Ballière et Fils. Editeur. Paris. 246 p.
- **Muniz C., Jaillard D., Lemaitre B., et Bocard F. (2007).** *Erwinia carotovora* Evf antagonizes the elimination of bacteria in the gut of *Drosophila* larvae. *Cell. Microbiol*, **9**: 106–119.

N

- **Nabhan AS, De Boer HS, Maiss E et Wydra K. (2012a).** Taxonomic relatedness among *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, **113**: 904-913.
- **Nabhan S, Wydra K, Linde M et Debener T. (2012b).** The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic

studies of pectolytic enterobacterial strains, with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathology*, **61**: 498-508.

• **Naessens E. (2016)**. Rôle des cytokines MIF dans l'interaction entre le puceron et sa plante hôte. Thèse de Doctorat. Université Côte d'Azur. France. P159.

• **Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R et Bertheau Y. (1996)**. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 2228-2235.

• **Nayak CA, Suguna K, Narasimhamurthy K et Rastogi NK. (2007)**. Effect of gamma irradiation on histological and textural properties of carrot, potato and beetroot. *Journal of Food Engineering*, **79**: 765-770.

• **Newman MA, Dow JM et Daniels MJ. (2001)**. Bacterial Lipopolysaccharides and Plant - pathogen Interactions. *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 95-102.

• **Ngadze E. (2018)**. Calcium soil amendment increases resistance of potato to blackleg and soft rot pathogens. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, **18(1)**: 12975-12991.

• **Ngadze E, Brady CL, Coutinho TA et Van Der Waals JE. (2012)**. Pectinolytic bacteria associated with potato soft rot and blackleg in South Africa and Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology*, **134**: 533-549.

• **Nunes Leite L, De Haan EG, Krijger M, Kastelein P, Van Der Zouwen PS, Bovenkamp GW et Van Der Wolf JM. (2014)**. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands. *New Disease Reports*, **29**: 24-24.

• **Nyabyenda P.(2005)**. Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitudes d'Afrique. *Presses Agronomiques de Gembloux*. Ed lavoisier, 253.

• **Nykyri J, Niemi O, Koskinen P, Nokso-Koivisto J, Pasanen M et Broberg M. (2012)** Revised Phylogeny and Novel Horizontally Acquired Virulence Determinants of the Model Soft Rot Phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathogens*. **8**: e1003013.

O

• **Oliveira AMR, Duarte V, Silveira JRP et Moraes MG. (2003).** Incidence of pectolytic *Erwinias* associated with blackleg of potato in Rio Grande do Sul. *Fitopatologia Brasileira*, **28**: 49-53.

• **Omari C. (2009).** La filière pomme de terre en Algérie". In Revue Filaha-innove. Ed. Magvet. n°1111-4762. p.19. Alger. Palmer et Smith ,1969.

• **Onkendi E M, Ramesh AM, Kwenda S, Naidoo S et Moleleki L. (2016).** Draft genome sequence of a virulent *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* isolate causing soft rot of cucumber. *Genome Announc*, **4(1)**: e01530-15.

• **Onkendi EM et Moleleki LN.(2014).** Characterization of *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*, **139**: 557-566.

• **Onkendi E, Maluleke N et Moleleki LN. (2013).** First report of *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* causing soft rot and blackleg diseases of potatoes in Kenya. *Plant Disease*, doi:10.1094/PDIS-09-13-0988-PDN

• **Oulghazi, S, Khayi S, Lafkih N, Massaoudi Y, El Karkouri A, El Hassouni M et Moumni M. (2017).** First Report of *Dickeya dianthicola* Causing Blackleg Disease on Potato in Morocco. *Plant Disease*, **101(9)**:1671-1672.

• **Ozturk M et Aksoy HM. (2016).** First report of *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliensis* causing blackleg and soft rot of potato in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, **98**: 677-697.

P

• **Pagel, W et Heitefuss R. (1989).** Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **35(1)**: 11-21.

• **Palacio-Bielsa A, Mosquera MER, Álvarez MAC, Rodríguez IMB, López-Solanilla E et Rodríguez Palenzuela P. (2010).** Phenotypic diversity, host range and

molecular phylogeny of *Dickeya* isolates from Spain. *European Journal of Plant Pathology*, **127**: 311-324.

• **Panda P. (2014)**. The role of genomic islands in virulence of *Pectobacterium carotovorum* subspecies *brasiliensis* on potatoes. Thèse de Doctorat. Université de Lincoln. Nouvelle Zélande. P315.

• **Panda P, Fiers MAWJ, Armstrong K et Pitman AR. (2012)**. First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Disease Reports*, **26**: 15-15.

• **Parent JG , Lacroix M, Page D , Vezina L. (1996)** Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Disease*, **80**: 494–499

• **Parker WL, Rathnum ML, Wells JS, Trejo WH, Principe PA et Sykes RB. (1982)**, A simple carbapenem produced by species of *Serratia* and *Erwinia*, SQ27860. *Journal of Antibiotics* ,**35**: 653–660.

• **Patel N et Rajput TBS. (2007)**. Effect of drip tape placement depth and irrigation level on yield of potato. *Agricultural Water Management*, **88**: 209-223.

• **Pérombelon MCM .(2002)**. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, **51**: 1-12

• **Pérombelon MCM et Van Der Wolf JM. (2002)**. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: A laboratory manual. Invergowrie, Dundee, Scotland: Scottish Crop Research Institute.

• **Pérombelon, MCM. et Salmond GPC. (1995)**. Bacterial soft rots. In: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases, Vol. 1. Prokaryotes (Singh, U.S., Singh, R.P. and Kohmoto, K., eds), pp. 1–20. Oxford, UK: Pergamon.

• **Pérombelon MCM .(1992)**. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. Netherlands *.Journal of Plant Pathology*, **98(2)**, 135-146.

• **Pérombelon MCM et Hyman LJ. (1992)**. Control of potato blackleg: Production of healthy seed. *Aspects of Applied Biology*, **33**: 77-84.

• **Pérombelon MCM et Hyman LJ. (1989)**. Survival of soft rot coliforms, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *E. carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. *Journal of Applied Bacteriology*, **66**: 95-106

- **Pérombelon MCM et Hyman L J. (1987)**. Frequency of *Erwinia carotovora* in the Alyth Burn in eastern Scotland and the sources of the bacterium. *The Journal of Applied Bacteriology*, **63**: 281–291
- **Pérombelon MCM et Kelman A. (1987)**. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot *Erwinias*; proposal for revision of terminology. *Plant Disease*, **71**: 283-5.
- **Pérombelon MCM et Kelman A. (1980)**. Ecology of soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, **18**: 361-387.
- **Péron JY. (2006)**. Références productions légumières, 2ème édition. Synthèse Agricole p 538-547.
- **Pilnic W et Rombouts FM. (1981)** .Pectic enzymes. In: G. G. Ž .Birch, N. Blakebrough, & K. J. Parker, Enzymes and foodprocessingŽ , London. *Applied Science Publishers*, **(105)**128.
- **Pitman AR, Harrow SA et Visnovsky SB. (2010)**. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, **126**:423-435.
- **Pitman AR, Wright PJ, Gailbraith MD, Harrow SA. (2008)**. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, **37**: 559-568.
- **Plener L. (2010)**. Etude des mécanismes d'activation transcriptionnelle des gènes de virulence et des fonctions d'adaptation in planta chez la bactérie *Ralstonia solanacearum*. Thèse de Doctorat. Université Toulouse 3 Paul Sabatier. France. P317.
- **Polese. (2006)**. La culture des pommes de terre, 44p.
- **Pöllumaa L, Alamäe Tet Mäe A. (2012)**. Quorum Sensing and Expression of Virulence in Pectobacteria. *Sensors*, **12(3)**:3327-3349.
- **Potrykus M , Sledz, W, Golanowska M, Slawiak M, Binek A, Motyka A et Lojkowska E. (2014)**. Simultaneous detection of major blackleg and soft rot bacterial pathogens in potato by multiplex polymerase chain reaction. *Annals of applied biology*, **165(3)**: 474-487.
- **Priou S et El Mahjoub ME. (1999)**. Bacterial and fungal diseases in the major potato, growing areas of Tunisia. *EPPO Bulletin*, **29(102)**:167-171

• **Priou S et Jouan B. (1996).** Les maladies provoquées par les bactéries pathogènes du genre *Erwinia*. In : Rousselle P, Robert Y, Crosnier JC, eds. Mieux comprendre la pomme de terre. Paris (France : Inra éditions).

• **Priou, S et El Mahjoub M. (1994).** Incidence of bacterial and fungal diseases of potato in Tunisia. In Proceedings of the Third Triennial Conference of Potato African Association (APA)(pp. 9-13).

• **Priou S, Ani K et Jouan B. (1992).** Comparaison of the effectiveness of two methods of screening potato to soft rot induced by *Erwinia carotovora ssp. atroseptica*. in: Proceeding of the joint conference of the EAPR breeding and varietal assessment section and the EUCARPIA potato section, Landerneau, France, 139-140

• **Pritchard L, Humphris S, Saddler G S, Parkinson NM, Bertrand V, Elphinstone JG et Toth I K, (2013).** Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences. *Plant Pathology*, **62 (3)**: 587–596

R

• **Rabot B, Pasco C et Schmidt J. (1994).** Assessing six Austrian potato cultivars for resistance to *Erwinia carotovorum* subsp. *atroseptica*. *Potato Research*, **37**: 197-203.

• **Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK. (2011).** Developing stress tolerant plants through in vitro selection-An overview of the recent progress. *Environ Exp. Bot*, **71**: 89-98.

• **Ratcliffe RW et Albers-Schonberg G. (1982).** The chemistry of thienamycin and other carbapenem antibiotics. *Chemistry and biology of β -lactam antibiotics*, **2**: 227-313.

• **Reddy B J. (2018).** A Review on Potato (*Solanum tuberosum* L.) and its Genetic Diversity. *International Journal of Genetics*, ISSN: 0975- 2862 & EISSN: 0975-9158, **10(2)**: 360-364.

• **Réseau d'avertissements phytosanitaires (RAP). (2017).** Jambe noire de la pomme de terre et pourriture molle bactérienne : le point sur *Pectobacterium* sp. et *Dickeya* sp. N° 2, bulletin d'information pomme de terre.

- **Reverchon S et Nasser W. (2013).** *Dickeya* ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environmental Microbiology Reports*, **5**: 622-636.
- **Reverchon S, Van Gijsegem F, Rouve M, Kotoujansky A et Robert-Baudouy J. (1986)** Organisation of a pectate lyase gene family in *Erwinia chrysanthemi*. *Gene*, **49**: 215-224.
- **Romdhani MS et El-Mahjoub M. (1990).** Latent infection of potato tubers with *Erwinia spp.* in Tunisia. Latent infection of potato tubers with *Erwinia spp.* in Tunisia, *55(3a)*: 1119-1123.
- **Rousselle P, Robert Y et Crosnier JC. (1996).** La pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisations. Paris : INRA Editions. France, pp: 557.
- **Ryu E. (1940).** A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. *Kitasato Arch.Exp.Med*, **17**: 58-63

S

- **Sadeghi-Seraji J, Khodakaramian G et Rouhrazi K. (2018).** First report of garlic soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Iran. *Journal of plant pathology*, **100(1)**: 125-125.
- **Sadek Ch. (2018).** Amélioration de l'aptitude à la callogenèse chez la pomme de terre *Solanum tuberosum* L somatique de la pomme de terre par la sélection de meilleurs équilibres hormonaux. Thèse de Doctorat. Université de Mentouri-Constantine1. Algérie. P142.
- **Salmond G.P.C. (1994).** Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*, **32**:181-200.
- **Šalplachta J, Kubesová A, Horký J, Matoušková H., Tesařová M et Horká M. (2015).** Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* species by capillary electrophoretic techniques and MALDI-TOF MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **407(25)**:7625-7635.
- **Samson R, Legendre JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W et Gardan L. (2005).** Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov.as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov.and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species,

Dickeya dadantii sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**: 1415-1427.

• **Samson R, Ngwira N, Rivera N. (1990)**. Biochemical and serological diversity of *Erwinia chrysanthemi*. Proceedings of the seventh International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Z. Klement ed Hungary. *Plant Pathogenic Bacteria*, 895-900.

• **Sarfraz S, Riaz K, Oulghazi S, Cigna J, Sahi ST, Khan SH, Faure D. (2018)**. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **68(11)**: 3551-3556.

• **Sharga BM et Lyon GD. (1998)**. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, **44**: 777-783.

• **Shevchik VE, Condemine G, Robert-Baudouy J et Hugouvieux-Cotte-Pattat N. (1999)**. The exopolygalacturonate lyase PelW and the oligogalacturonatylase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J Bacteriol*, **181**: 3912-3919.

• **Shevchik VE et Hugouvieux-Cotte-Pattat N. (1997)**. Identification of a bacterial pectin acetyl esterase in *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Molecular microbiology*, **24(6)**: 1285-1301.

• **Sjöblom S. (2009)**. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Thèse de Doctorat. Université de Helsinki. Finlande. P68.

• **Smadja B, Latour X, Trigui S, Burini J.F, Chevalier S et Orange N. (2004)**. Thermodependence of growth and enzymatic activities implicated in pathogenicity of two *Erwinia carotovora* subspecies (*Pectobacterium* spp). *Canadian journal of microbiology*, **50**: 19-27.

• **Smith C et Bartz JA. (1990)**: Variation in the pathogenicity and aggressiveness of strains of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* isolated from different hosts. *Plant Disease*, **74**: 505-509.

• **Sofya NS, Knirel YA, Shashkov AS, Ahmed M, Mavridis A et Rudolph K. (2003)**. Structure of the O-polysaccharide of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Carbohydrate Research*, **338**: 2025-2027.

• **Soltner D. (2005)**. Les grandes productions végétales, phytotechnie spéciale céréales-plantes sarclées-prairies . Collection sciences et techniques agricoles, 20eme édition, P 472.

• **Soltner D. (1999)**. Les grandes productions végétales. *Collection sciences et technique agricoles*, 20 éme édition, Angers, 472 p. Ed. CSTA.

• **Soltner D. (1988)**. Les grandes productions végétales la pomme de terre Tomme II col. *Scien et tech Agri*, pp 240-247.

• **Spire D et Rousselle P. (1996)**. Origine socio-historique. in: P. Rousselle, Robert, Y. et J.C. Crosnier (Eds), la pomme de terre : production, amélioration, ennemis et maladies, utilisation. Editions INRA-ITCF, 607p.

• **Stevenson WA, Loria R, Franc GD et Weingartner DP. (2001)**. Compendium of potato diseases. American phytopathological society. 2e éd. St-Paul, Minnesota. P106.

T

• **Tamura K et Nei M (1993)**. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol*, **10**: 512-526.

• **Terta M, Azelmat S, M'hand RA, Achbani EH, Barakate M, Bouteau F et Ennaji MM. (2011)**. Molecular typing of *Pectobacterium carotovorum* isolated from potato tuber soft rot in Morocco. *Ann Microbiol*, **62**: 1411-1417.

• **Terta M, El Karkouri A, M'hand R A, Achbani E, Barakate M, Amdan M et Ennaji MM. (2010)**. Occurrence of *Pectobacterium carotovorum* strains isolated from potato soft rot in Morocco. *Cellular and Molecular Biology*, **56(3)**, 1324-33.

• **Toth IK, Van Der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Helias E, Pirhonen M, Tsrer L, Elphistone JG. (2011)**. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, **60**: 385-399.

• **Toth IK, Bell KS, Holeva MC et Birch PRJ. (2003)**. Soft rot *Erwiniae*: From genes to genomes. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 17-30.

• **Toth IK, Newton JA et Hyman L. (2001)**. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer PCR

and restriction enzyme fragment polymorphism analyses. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 4070-4076.

• **Tria M. (2009)**. Analyse de la compétitivité de la filière pomme de terre en Algérie. Mémoire de Magister. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach. Alger. Algérie. P147.

• **Tseng, TT, Tyler B M et Setubal J C. (2009)**. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC microbiology*, **9(1)**: S2.

V

• **Val F, Barzic MR, Desender S, Hamelin G, Andrivon D.(2006)**. Stockage des pommes de terre Un lipopolysaccharide bactérien anti-bactérien . Évaluation d'un candidat pour la protection biologique des tubercules de pomme de terre contre les bactérioses. *Phytoma : la défense des végétaux* **596**: 33-36.

• **Van Der Wolf JM, De Haan EG, Kastelein P, Krijger M , De Haas BH, Velvis H et Van Der Zouwen PS. (2017)**. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. *Plant pathology*, **66(4)**: 571-583.

• **Van Der Wolf JM, Nijhuis EH, Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N, Elphinstone JG, Pritchard L, Toth I K, Lojkowska E, Potrykus M, Waleron M, De Vos P, Cleenwerck I, Pirhonen M, Garland L, Helias V, Pothier JF, Pfluger V, Duffy B, Tsror L et Manulis S. (2014)**. *Dickeya solani* sp nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **64**: 768-774.

• **Van der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, Van Der Waals JE. (2010)**. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, **126**: 175-185.

• **Van Der Wolf JM et De Boer S. (2007)**. Bacterial pathogens of potato. *Potato Biology and Biotechnology*, 619-641.

- **Van Vuurde JWL, De Vries PM. (1994).** Population dynamics of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on the surface of intact and wounded seed potatoes during storage. *Journal of Applied Bacteriology*, **76**: 568-575.
- **Vannetzel E. (2011).** Cultiver la pomme de terre de plein champ en agriculture biologique : Repères technico-économiques. ARVALIS – Institut du végétal. CAS DAR N°9016. 6P.
- **Verhees J. (2002).** Cell cycle and storage related gene expression in potato tubers. Thèse de Doctorat. Université d'Agriculture de Wageningen. Les pays bas. P133.
- **Von Bodman SB, Bauer WD et Coplin DL. (2003).** Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, **41(1)**: 455-482.
- **Voronina M V, Kabanova AP, Shneider M M., Korzhenkov AA, Toschakov SV, Miroshnikov KK et Ignatov AN. (2019).** First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Stem Rot Disease of Potato in Russia. *Plant Disease*, **103(2)**: 364-364.
- **Vreugdenhil D, Bradshaw J, Gebhardt C, Govers F, Taylor MA, Mackerroun KL, Ross HA. (2007).** Potato biology and biotechnology. *Elsevier*, P856.

W

- **Waldee EL. (1945).** Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria. *Iowa State Coll. J. Sci*, **19**: 435–484
- **Waleron M, Misztak A, Waleron M, Franczuk, M, Jońca J, Wielgomas B et Waleron K. (2019).** *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Systematic and applied microbiology*, **42(3)**: 275-283.
- **Waleron M, Misztak AE, Jonca J et Waleron KF. (2018).** First Report of *Pectobacterium polaris* Causing Soft Rot of Potato in Poland. *Plant Disease*.
- **Waleron M, Misztak A, Waleron M, Franczuk M, Wielgomas B et Waleron K. (2017).** Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruvienne* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*.

- **Waleron M, Waleron K et Lojkowska E. (2015).** First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. *Plant Disease*, **99**: 1271-1271.
- **Waleron M, Waleron K, Lojkowska E. (2014)** .Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables. *European Journal of Plant Pathology*, **139**: 457–469.
- **Waleron M, Waleron K et Lojkowska E. (2013).** Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *European Journal of Plant Pathology*, **137**: 149-158.
- **Waleron M, Waleron K, Podhajska AJ et Lojkowska E. (2002).** Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology*, **148**: 583-595
- **Whitehead N A, Barnard A M, Slater H, Simpson N J et Salmond G P. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, **25(4)**, 365-404.
- **Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede Jr C, Rogers L Aet Smith GH. (1917).** The families and genera of the bacteria: preliminary report of the committee of the society of american bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. *Journal of bacteriology*, **2(5)**: 505.
- **Wojciechowski C L et Fall R. (1996).** A continuous fluorometric assay for pectin methylesterase. *Analytical biochemistry*, **237(1)**, 103-108.

Y

- **Yaganza ES. (2005).** Utilisation post-récolte de sels organiques et inorganiques pour lutter contre la pourriture molle de la pomme de terre: base physico-chimique. Thèse de Doctorat. Université Laval. Canada. P188.
- **Yahiaoui-Zaidi R, Ladjouzi R et Benallaoua S. (2010).** Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, **1**: 1-9.

- **Yahiaoui-Zaidi R. (2004).** Contribution à l'étude des *Erwinia* pectinolytiques isolées chez *Solanum tuberosum* L. en Algérie. Thèse Doctorat. Université de Sétif, Algérie. P187.
- **Yahiaoui-Zaidi R, Jouan B et Andrivon D. (2003).** Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, **52**: 28-40.
- **Yap MN, Barak JD et Charkowski AO. (2004).** Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 3013-3023.
- **Yishay M, Burdman S, Valverde A, Luzzatto T, Ophir R, Yedidia I. (2008)** Differential pathogenicity and genetic diversity among *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* isolates from monocot and dicot hosts support early genomic divergence within this taxon. *Environmental Microbiology*, **10**: 2746–2759
- **Yong JJ, Bao ZF, Wen XS et Xiu GZ. (2009).** Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions. *Journal of Phytopathology*, **157**: 585-591

Z

- **Zaheer K. and. Akhtar MH .(2016).** Potato production, usage, and nutrition-a review. *Crit Rev Food Sci Nut*, **56(5)**: 711-721.
- **ZHANG H, Fen X, Yu W, HU HH et DAI XF. (2017).** Progress of potato staple food research and industry development in China. *Journal of integrative agriculture*, **16(12)**, 2924-2932.
- **Zhao Y, Jian G, Guomin T, Yanli F, Jiaqin L, Xiang H, Baishi .(2018).** First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Stem Rot on Potato in China. *Plant Disease*.
- **Zhou S et Ingram LO. (2000).** Synergistichydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (celz and cely) from *erwinia chrysanthemi* . *Journal of bacteriology*, **182(20)**, 5676-5682.

Annexes

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

A. Article Scientifique International

Naas H, Sebahia M, Orfei B, Rezzonico F, Buonauro R et Moretti C. (2018). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, **151(4)**:1027-1034.

B. Communication Affichée

Naas H et Sebahia M. Isolement et identification des espèces d'*Erwinia*, à partir de plusieurs champs de pomme de terre. Séminaire international : « La protection des cultures stratégiques en Algérie : situation et perspectives » du 28 et 30 mai 2013 à l'Université Hassiba Ben Bouali de Chlef, Algérie.

C. Publication à GenBank (NCBI) de 47 séquences des gènes du *Pectobacterium carotovorum*

Naas, H., Sebahia, M., Orfei, B., Rezzonico, F., Buonauro, R., Moretti, C., *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria.

-
- 1. [Pectobacterium carotovorum translation initiation factor IF-2 \(infB\) gene, partial cds.](#)
phylogenetic study, 6 sequences
UID: 1369007480
[Protein](#) [Taxonomy](#)
 - 2. [Pectobacterium carotovorum DNA gyrase B subunit \(gyrB\) gene, partial cds.](#)
phylogenetic study, 6 sequences
UID: 1369007154
[Protein](#) [Taxonomy](#)
 - 3. [Pectobacterium carotovorum ATP synthase subunit beta \(atpD\) gene, partial cds.](#)
phylogenetic study, 6 sequences
UID: 1369006784
[Protein](#) [Taxonomy](#)
 - 4. [Pectobacterium carotovorum aconitase \(acnA\) gene, partial cds.](#)
phylogenetic study, 6 sequences
UID: 1369006444
[Protein](#) [Taxonomy](#)
 - 5. [Pectobacterium carotovorum malate dehydrogenase \(mdh\) gene, partial cds.](#)
phylogenetic study, 21 sequences
UID: 1276624984
[Protein](#) [Taxonomy](#)
 - 6. [Pectobacterium carotovorum 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.](#)
ecological sample study, 2 sequences
UID: 1158626964
[Taxonomy](#)
- Summary - 20 per page -



European Journal of Plant Pathology

August 2018, Volume 151, Issue 8, pp 1027–1034 | [Cite as](#)

Pectobacterium carotovorum subsp. *brasilense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria

Authors Authors and affiliations

Hiba Nass, Mohammad Sabaïha, Benedetta Orfei, Fabio Razzonico, Roberto Burrenno, Chiara Luca Moretti

Article
First Online: 23 February 2018

150
Downloads

Abstract

During surveys carried out in 2014 and 2015 in Algerian potato fields, severe bacterial tuber soft rot was observed. Twenty-one Gram-negative pectinolytic bacterial isolates were obtained from diseased potato tubers. These induced a hypersensitive reaction and soft rot symptoms when inoculated in tobacco leaves and potato tubers, respectively. PCR amplification using the Y1/Y2 primers demonstrated that all of the bacterial isolates belonged to the genus *Pectobacterium*. Phylogenetic analysis using partial malate dehydrogenase (*mdh*) gene sequences revealed that six and 15 isolates grouped with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasilense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* reference strains,

respectively. Multilocus sequence analysis of concatenated partial sequences of the *acvA*, *atpD*, *gyrB* and *infB* genes carried out on selected bacterial isolates confirmed the results obtained with the *mdh* gene sequences. PCR amplification with the BR1/L1r primers that are specific for *P. carotovorum* subsp. *brasilense* confirmed that six of the Algerian isolates belonged to this taxon.

Keywords

Algeria Soft-rotting bacteria *Solanum tuberosum* *Pectobacterium*

Electronic supplementary material

The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1438-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

This is a preview of subscription content, [log in](#) to check access.

Notes

Acknowledgements

The authors thank Luca Bonciarelli (Perugia University), Melkhaneg, and all of the staff members of the Regional Station of Plant Protection (Chlef, Algeria) for technical assistance. This study was supported financially by DSA3 research funds to CM and RB, and by MESRS DGRDT.



Pectobacterium carotovorum subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria

Hiba Naas · Mohammed Sebahia · Benedetta Orfei ·
Fabio Rezzonico · Roberto Buonauro ·
Chiaraluce Moretti 

Accepted: 11 February 2018
© Koninklijke Nederlandse Planteziektenkundige Vereniging 2018

Abstract During surveys carried out in 2014 and 2015 in Algerian potato fields, severe bacterial tuber soft rot was observed. Twenty-one Gram-negative pectinolytic bacterial isolates were obtained from diseased potato tubers. These induced a hypersensitive reaction and soft rot symptoms when inoculated in tobacco leaves and potato tubers, respectively. PCR amplification using the Y1/Y2 primers demonstrated that all of the bacterial isolates belonged to the genus *Pectobacterium*. Phylogenetic analysis using partial malate dehydrogenase (*mdh*) gene sequences revealed that six and 15 isolates grouped with *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* reference strains, respectively. Multilocus sequence analysis of concatenated partial sequences of

the *acnA*, *atpD*, *gyrB* and *infB* genes carried out on selected bacterial isolates confirmed the results obtained with the *mdh* gene sequences. PCR amplification with the BR1f/L1r primers that are specific for *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* confirmed that six of the Algerian isolates belonged to this taxon.

Keywords Algeria · Soft-rotting bacteria · *Solanum tuberosum* · *Pectobacterium*

Introduction

Each year, viral, bacterial, oomycete and fungal diseases and pests worldwide cause severe potato (*Solanum tuberosum* L.) yield losses that have been estimated at 22% of the total production, which corresponds to over 65 million tonnes (Czajkowski et al. 2011). In 2014, Algeria was in the 16th top potato producer worldwide, with the production of 4,673,516 t on 156,176 ha (FAOSTAT 2014). However, a number of potato diseases have been reported for Algeria, including potato leaf roll virus, common scab, late blight, dry rot and soft rot (Nassan and Fettouche 1991; Yahiaoui-Zaidi et al. 2003).

Bacteria belonging to the *Pectobacterium* and *Dickeya* genera are the main causal agents of potato tuber soft rot and/or blackleg (Pérombelon and Kelman 1980; Pérombelon 2002; Czajkowski et al. 2011). Pectolytic Pseudomonads can also sometimes cause potato soft-rot (Aremu and Babalola 2015). Five taxa of the genus *Pectobacterium* are involved in potato

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10658-018-1438-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

H. Naas · M. Sebahia
Laboratory of Molecular Biology, Genomics and Bioinformatics,
Department of Biology, Faculty of Nature and Life Sciences,
Hassiba Benbouali University of Chlef, BP. 151, 02000 Chlef,
Algeria

B. Orfei · R. Buonauro · C. Moretti (✉)
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali
(DSA3), Università di Perugia, Via Borgo XX Giugno 74,
06121 Perugia, Italy
e-mail: chiaraluce.moretti@unipg.it

F. Rezzonico
Environmental Genomics and Systems Biology Research Group,
Institute of Natural Resource Sciences, Zurich University of
Applied Sciences (ZHAW), 8820 Wädenswil, Switzerland

tuber soft rot and/or blackleg: *Pectobacterium atrosepticum* is mainly spread through temperate regions, and it almost exclusively infects potatoes; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* has a broad host range worldwide; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* was initially reported in Brazil and has now spread to several other countries; *Pectobacterium aroidearum* has been reported in Lebanon; and *Pectobacterium wasabiae* has been reported in a number of countries (Duarte et al. 2004; Czajkowski et al. 2011; Nabhan et al. 2012a, b; Nykyri et al. 2012; Moleleki et al. 2013; Waleron et al. 2013; Moretti et al. 2016; Zhang et al. 2016; Dees et al. 2017; Zoledowska et al. 2018). Recently, strains of *P. wasabie* were isolated from potato and were reclassified as *P. parmentieri* (Khayri et al. 2016). Consensus now indicates that *P. wasabie* isolated from horseradish is not a potato pathogen (Goto and Matsumoto 1987). *Dickeya dadantii*, *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* are the main pathogens that cause potato blackleg and soft rot (van der Wolf et al. 2014; Potrykus et al. 2017).

During surveys carried out in 2014 and 2015 in potato fields in five provinces in north-west Algeria (i.e., Ain Defla, Chlef, Mostaganem, Relizane, Tiaret) severe and typical bacterial soft rot of tubers were observed. The aim of the present study was to define the aetiology of this disease.

Materials and methods

Bacterial isolation

To isolate the causal agent(s) of this potato bacterial soft rot in Algeria, small amounts of tuber samples from the margins of diseased tissue were macerated in sterile water. Loopfuls of these homogenates were streaked onto nutrient agar and incubated at 27 ± 1 °C. The bacterial colonies that formed were purified in nutrient agar supplemented with 5% sucrose, and were stored in 15% glycerol solution at -80 °C.

Biochemical, physiological, pathogenicity and virulence tests

The ability of these purified bacterial isolates to degrade pectin was tested using crystal violet medium that was prepared according to Helias et al. (2012), and pectin

(Dipecta, type AG366; Agdia Biofords, 91,030 Evry cedex, France).

The bacterial isolates were tested for induction of a hypersensitive reaction (HR) in tobacco leaves and for disease symptoms when inoculated into potato tubers. For the HR test, tobacco leaves (cv. Havana 425) were infiltrated with bacterial suspensions at 10^8 cfu mL⁻¹, using a syringe without a needle, while potato tubers of cv. Agata were inoculated as described by Laurila et al. (2008).

The bacterial isolates were also subjected to basic microbiological tests according to procedures described by Schaad et al. (2001) and Sands (1990), which included KOH solubility, oxidative/ fermentative metabolism, and growth at 37 °C.

DNA extraction and molecular characterisation

For DNA extraction, the bacterial isolates were cultivated in Luria–Bertani broth and incubated overnight at 27 ± 1 °C in an orbital shaker (130 rpm). The DNA was extracted using kits (GenElute Bacterial Genomic DNA kits; Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), following the manufacturer instructions. The Y1/Y2 primers that are specific for *Pectobacterium* genus were used (Supplementary Table 1), as reported by Darrasse et al. (1994). The PCR amplicons were electrophoresed through 1.5% (w/v) agarose gels in 0.5× TAE buffer (20 min, 100 V), and visualised under UV light.

The bacterial isolates were characterised at the molecular level using sequencing of the malate dehydrogenase (*mdh*) gene. The PCR reactions were performed in a total volume of 50 µL, which consisted of PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 0.2 µM of each primer, 2 U Taq DNA polymerase and 50 ng bacterial DNA. The PCR temperature profile comprised an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were separated by gel electrophoresis using 1.5% (w/v) agarose in 0.5× TAE buffer (45 min, 100 V), and were visualised under UV light. The PCR products were sequenced by Macrogen Europe (The Netherlands). For phylogenetic comparisons, partial *mdh* sequences from enterobacteria that are related to soft rot bacteria were retrieved from the GenBank database. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGA 7 (Kumar et al. 2016) and the maximum parsimony

method. Clade stability was assessed by 1000 bootstrap replications. *Yersinia pestis* CO92 was used as outgroup. All of the sequences have been deposited in GenBank under the accession numbers reported in Supplementary Table 2.

PCR amplification with the BR1f/L1r primers that are specific for *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Supplementary Table 1) were carried out as described by Duarte et al. (2004). The 16S rDNA was amplified using the P0 and P6 primers (Supplementary Table 1). PCR was performed in 20 µL reaction mixture that consisting of PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 0.2 µM of each primer, 2 U Taq DNA polymerase and 25 ng bacterial DNA. The PCR temperature profile (MyCycler Thermal Cycler; Bio-Rad, CA, USA) comprised an initial denaturation step at 95 °C for 1.5 min, 5 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 4.5 min, 5 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 4.5 min,

25 cycles at 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s and 72 °C for 4.5 min, and final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were separated by gel electrophoresis using 1.2% (w/v) agarose in 0.5× TAE buffer (1 h, 100 V) and were visualised under UV light. The PCR products of 16S rDNA were sequenced by MacroGen Europe (The Netherlands), and were compared with those in GenBank using BlastN.

Multilocus sequence analysis (MLSA) was used for identification of *Pectobacterium* species, using partial sequences of the aconitase hydratase 1 (*acnA*), ATP synthase F1, β subunit (*atpD*), DNA gyrase B subunit (*gyrB*), and initiation translation factor 2 (*infB*) genes. Partial fragments of the *acnA*, *atpD*, *gyrB* and *infB* genes were amplified using the protocol of Brady et al. (2008). The PCR products were sequenced by MacroGen Europe (The Netherlands). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted as reported above.

Table 1 Soft-rot bacterial strains isolated from potato tubers in different Algerian locations and selected tests for their identification

Bacterial species	Strain	Location	Cultivar	Virulence on potato ^a	BR1f/L1r amplification
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	HNA 1	Ain Defla	Spunta	14.1 abc	–
	HNA 11	Ain Defla	Désirée	2.7 a	–
	HNA 12	Ain Defla	Spunta	4.7 abc	–
	HNA 13	Ain Defla	Spunta	12.2 abc	–
	HNA 20	Ain Defla	Condor	15.2 abc	–
	HNA 21	Ain Defla	Spunta	12.1 abc	–
	HNA 22	Ain Defla	Spunta	29.3 c	–
	HNA 6	Ain Defla	Spunta	24.9 c	–
	HNA 17	Chlef	Spunta	16.7 abc	–
	HNA 3	Chlef	Spunta	24.4 c	–
	HNA 4	Chlef	Condor	11.6 abc	–
	HNA 18	Mostaganem (Debdaba)	Désirée	5.7 abc	–
	HNA 24	Relizane	Spunta	9.1 abc	–
	HNA 5	Relizane (Hmadna)	Spunta	13.2 abc	–
	HNA 19	Tyaret	Désirée	10.8 abc	–
	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliensis</i>	HNA 8	Ain Defla	Spunta	15.2 abc
HNA 15		Ain Defla	Spunta	23.9 c	+
HNA 9		Chlef	Condor	12.9 abc	+
HNA 26		Chlef (Mejaja)	Désirée	18.3 bc	+
HNA 2		Tyaret	Désirée	3.8 ab	+
HNA 27		Tyaret	Désirée	16.3 abc	+

^a Virulence on potato tubers is expressed as g of rotted tissue (3 days after the inoculation). Each value is the mean of three replicates. Values followed by the same letter are not significantly different according to Tukey HSD test (p= 0.05)

Results and discussion

Twenty-one Algerian bacterial isolates that degraded pectin were investigated in the present study (Table 1). All of them induced HR in tobacco leaves that were evident from 24 h after inoculation, and were also pathogenic on potato tubers. The isolates, that cause the most severe disease symptoms were isolated from potato tubers of cv. Spunta sampled in the Algerian provinces of Ain Defla (isolates HNA 6, 15, 22) and Chlef (isolate HNA 3) (Table 1). Koch's postulates were fulfilled, as the isolates

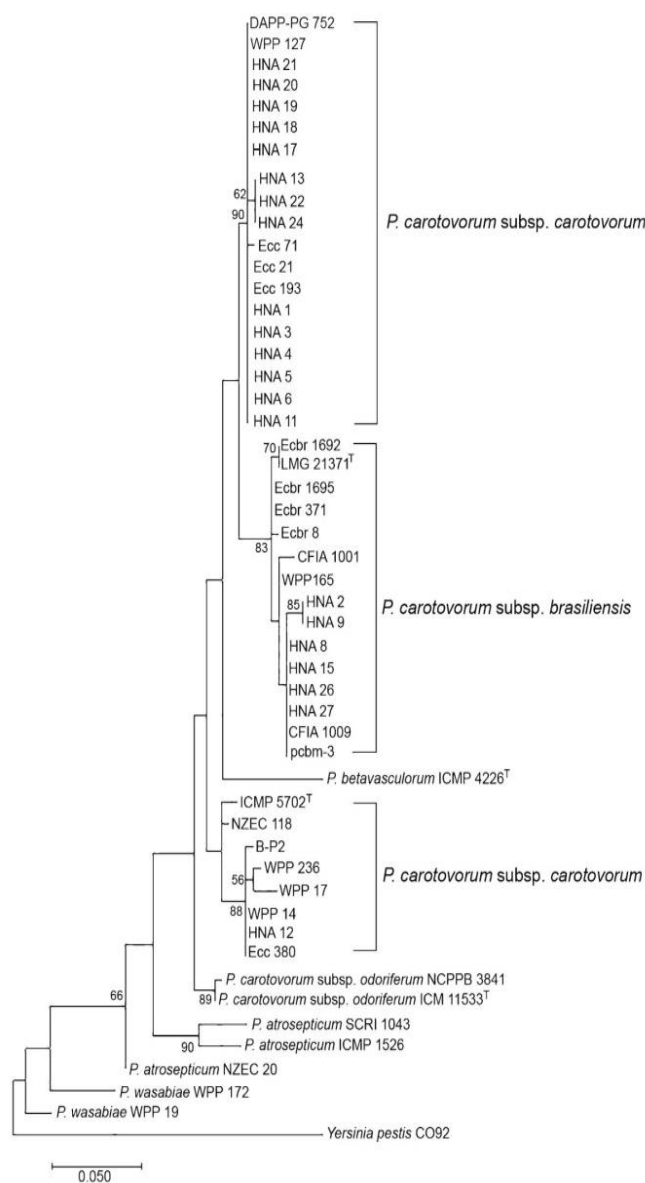
from the inoculated tubers had the same culture characteristics as the inoculated isolates.

All of the isolates were soluble in KOH, and were therefore Gram negative; they had oxidative/ fermentative metabolism, and grew at 37 °C.

All 21 of these isolates generated a 434 bp PCR product with the Y1/Y2 primers; therefore they belong to the *Pectobacterium* genus (Table 1).

To refine the identification of these Algerian isolates of *Pectobacterium*, partial *mdh* sequences were obtained, as these have been reported to be phylogenetically informative for species of the genus *Pectobacterium*

Fig. 1 Maximum likelihood tree based on partial *mdh* gene sequences (229 nt) showing the phylogenetic position of the 21 Algerian isolates (HNA) from potato tubers with soft rot symptoms within the genus *Pectobacterium*. Bar, 5% nucleotide substitutions. Numbers at branching points are bootstrap percentages based on 1000 replications. Only values $\geq 50\%$ are shown. Strains marked with a superscript "T" represent the type strains of the species or subspecies



(Pitman et al. 2010; Yap et al. 2004; Moretti et al. 2016). These were compared with sequences of *Pectobacterium* spp. deposited in GenBank. The phylogenetic tree for *mdh* sequences is shown in Fig. 1, and this reveals that six of these Algerian isolates (HNA 2, 8, 9, 15, 26, 27) formed a cluster with all of the strains of *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* considered in the present study, including the LMG 21371^T type strain. In particular, isolates HNA 8, 15, 26 and 27 have an *mdh* sequence identical to the Canadian CFIA 1009 strain, the genome of which has been sequenced recently (Li et al. 2015), and the Japanese pcbm-3 strain (Fujimoto et al. 2017).

The other 15 Algerian isolates grouped in a cluster that included strains of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. In particular, 11 of these isolates (HNA 1, 3, 4, 5, 6, 11, 17, 18, 19, 20, 21) have an *mdh* sequence identical to the Lebanese DAPP-PG 752 strain (Moretti et al. 2016), the US WPP 127, Ecc21 strains, and the Ecc 193 from The Netherlands (Ma et al. 2007).

To confirm that the six Algerian isolates belong to *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, PCR amplification was carried out with the subspecies-specific BR1f/L1r

primers. All six of these isolates generated a 690-bp product, which confirmed that they belong to *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Table 1); no such PCR product was observed when the other 15 isolates were analysed.

To confirm the identity of the tested isolates as *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* or *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, the 16S rRNA sequences of one representative isolate of each subspecies (HNA 18, 26, respectively) were obtained. The 16S rRNA sequences of isolates HNA 18 and HNA 26 show similarity to the RY29 and RY13 strains and the FM3 and FM4 strains of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, respectively.

Identification was also carried out by MLSA by sequencing of representative Algerian isolates that belonged to the subspecies *brasiliense* (HNA 9, 27) and *carotovorum* (HNA 5, 12, 18, 22), which were selected on the basis of the *mdh* phylogram, using the housekeeping genes *acnA*, *atpD*, *gyrB* and *infB* (Yap et al. 2004; Ma et al. 2007; Kim et al. 2009; Pitman et al. 2010; Baghaee-Ravari et al. 2011; Moretti et al. 2016). The phylogenetic tree obtained with the concatenated

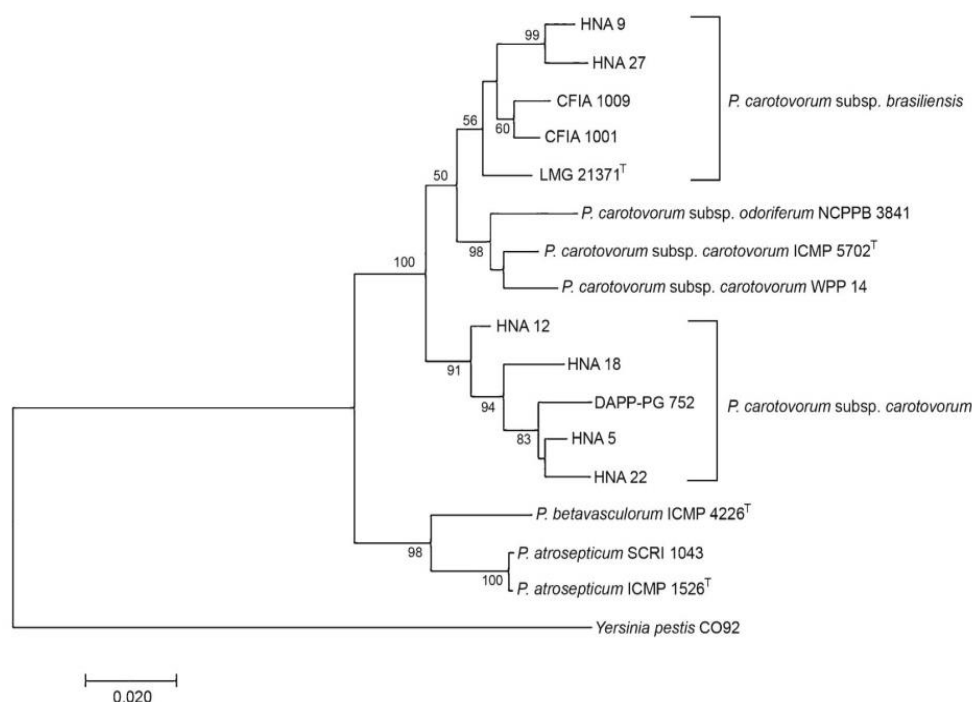


Fig. 2 Maximum likelihood tree based on concatenated partial *atpD*, *gyrB*, *infB* and *rpoB* gene sequences (*atpD*, 642 nt; *gyrB*, 747 nt; *infB*, 615 nt; *rpoB*, 605–637 nt) showing the phylogenetic position of the Algerian isolates (HNA) from potato tubers with

soft rot symptoms within the genus *Pectobacterium*. Bar, 2% nucleotide substitutions. Numbers at branching points are bootstrap percentages based on 1000 replications. Only values >50% are shown

acnA, *atpD*, *gyrB* and *infB* partial nucleotide sequences were examined implementing the maximum likelihood method (Fig. 2), which confirmed that the Algerian isolates HNA 9 and 27 grouped with *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, and that isolates HNA 5, 12, 18 and 22 grouped with the Lebanese DAPP-PG 752 strain that belongs to *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. Of note, the ICMP 5702^T subspecies type strain of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* clustered in a separate clade (Fig. 2).

The present study thus characterises at the molecular level a number of bacterial isolates that cause potato tuber soft rot in Algeria, and demonstrates that they belong to both *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*. To the best of our knowledge, the present study represents the first occurrence of *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* in Algeria as the causal agent of potato tuber soft rot, while the presence of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* on potato has been reported previously (Yahiaoui-Zaidi et al. 2003, 2010).

After the first description of *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Duarte et al. 2004), it was later reported on potato in Canada (De Boer et al. 2012), Kenya (Onkendi and Moleleki 2014), Japan (Fujimoto et al. 2017), New Zealand (Panda et al. 2012), Peru (Nabhan et al. 2012a, b), Poland (Waleron et al. 2015), South Africa (van der Merwe et al. 2010), Switzerland (de Werra et al. 2015), Syria (Nabhan et al. 2012b), Turkey (Ozturk and Aksoy 2016) and the USA (McNally et al. 2017). *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* can also cause mainly soft rot symptoms on artichoke (Cariddi and Bubici 2016), cucumber (Meng et al. 2017), pepper (Gillis et al. 2017; Choi and Kim 2013), tobacco (Wang et al. 2017), tomato (Caruso et al. 2016; Rosskopf and Hong 2016; Jaramillo et al. 2017), sugar beet (Secor et al. 2016) and courgettes (Moraes et al. 2017).

Among the four *P. carotovorum* subspecies *carotovorum*, *odoriferum*, *brasiliense* and *actinidiae*, only the first two have valid publication. However, a plethora of different approaches strongly suggests that subsp. *brasiliense* should be allocated to a separate species from *P. carotovorum*, which have included sequencing of 16S rRNA and intergenic spacer regions and biochemical analysis (Duarte et al. 2004), MLSA (Ma et al. 2007), a pan-genomic approach (Glasner et al. 2008), average nucleotide identity (ANI), and *in-silico* DNA-DNA hybridisation analysis (Zhang et al. 2016). Using whole-genome sequencing data from 83

Pectobacterium strains, Zhang et al. (2016) also demonstrated that the clade that contained all of the *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* strains showed significant genetic diversity.

Acknowledgements The authors thank Luca Bonciarelli (Perugia University), Mekhaneg, and all of the staff members of the Regional Station of Plant Protection (Chlef, Algeria) for technical assistance. This study was supported financially by DSA3 research funds to CM and RB, and by MESRS DGRDT.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicts of interest.

Human and animal rights This study does not include any studies with human participants or animals (vertebrates) performed by any of the authors.

Informed consent Informed consent was obtained from all of the individual participants included in the study.

References

- Aremu, B. R., & Babalola, O. O. (2015). Classification and taxonomy of vegetable macergens. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1–11.
- Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antunez-Lamas, M., & Rodriguez-Palenzuela, P. (2011). Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 413–425.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., & Coutinho, T. (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 447–460.
- Cariddi, C., & Bubici, G. (2016). First report of bacterial pith soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* on artichoke in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 98, 563–568.
- Caruso, G., Gomez, L. D., Ferriello, F., Andolfi, A., Borgonuovo, C., Evidente, A., Simister, R., McQueen-Mason, S. J., Carpato, D., Frusciant, L., & Ercolano, M. R. (2016). Exploring tomato *Solanum pennellii* introgression lines for residual biomass and enzymatic digestibility traits. *BMC Genetics*, 17, 1–13.
- Choi, O., & Kim, J. (2013). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on paprika in Korea. *Journal of Phytopathology*, 161, 125–127.

- Czajkowski, R., Pérombelon, M. C. M., Van Veen, J. A., & Van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology Journal*, *60*, 999–1013.
- Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A., & Bertheau, Y. (1994). PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 1437–1443.
- De Boer, S. H., Li, X., & Ward, L. J. (2012). *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada. *Phytopathology*, *102*, 937–947.
- de Werra, P., Bussereau, F., Ziegler, D., & Keiser, A. (2015). First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland. *Plant Disease*, *99*, 551–551.
- Dees, M. W., Lebecka, R., Perminow, J. I. S., Czajkowski, R., Grupa, A., Motyka, A., Zoledowska, S., Sliwka, J., Lojkowska, E., & Brurberg, M. B. (2017). Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* strains obtained from diseased potato plants in different climatic conditions of Norway and Poland. *European Journal of Plant Pathology*, *148*, 839–851.
- Duarte, V., De Boer, S. H., Ward, L. J., & De Oliveira, A. M. (2004). Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, *96*, 535–545.
- FAOSTAT (2014). FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Fujimoto, T., Yasuoka, S., Aono, Y., Nakayama, T., Ohki, T., Sayama, M., & Maoka, T. (2017). First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Japan. *Plant Disease*, *101*, 241–241.
- Gillis, A., Santana, M. A., Rodriguez, M., & Romay, G. (2017). First report of bell pepper soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Venezuela. *Plant Disease*, *101*, 1671–1671.
- Glasner, J. D., Marquez-Villavicencio, M., Kim, H. S., Jahn, C. E., Ma, B., Biehl, B. S., Rissman, A. I., Mole, B., Yi, X., Yang, C. H., Dangel, J. L., Grant, S. R., Perna, N. T., & Charkowski, A. O. (2008). Niche specificity and the variable fraction of the *Pectobacterium* pan-genome. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*, 1549–1560.
- Goto, M., & Matsumoto, K. (1987). *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* maxim.) *International Journal of Systematic Bacteriology*, *37*, 130–135.
- Helias, V., Hamon, P., Huchet, E., Wolf, J. V. D., & Andrivon, D. (2012). Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Plant Pathology*, *61*, 339–345.
- Jaramillo, A., Huertas, C. A., & Gómez, E. D. (2017). First report of bacterial stem rot of tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Colombia. *Plant Disease*, *101*, 830.
- Khayri, S., Cigna, J., Chong, T. M., Quéto-Laurent, A., Chan, K. G., Hélias, V., & Faure, D. (2016). Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*, 5379–5383.
- Kim, H. S., Ma, B., Perna, N. T., & Charkowski, A. O. (2009). Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*, 4539–4549.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874.
- Laurila, J., Ahola, V., Lehtinen, A., Joutsjoki, T., Hannukkala, A., Rahkonen, A., & Pirhonen, M. (2008). Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. *European Journal of Plant Pathology*, *122*, 213–225.
- Li, X., Yuan, K., Cullis, J., Lévesque, C. A., Chen, W., Lewis, C. T., & De Boer, S. H. (2015). Draft genome sequences for Canadian isolates of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* with weak virulence on potato. *Genome Announcements*, *3*(2), e00240–e00215.
- Ma, B., Hibbing, M. E., Kim, H. S., Reedy, R. M., Yedidia, I., Breuer, J., Breuer, J., Glasner, J. D., Perna, N. T., Kelman, A., & Charkowski, A. O. (2007). Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, *97*, 1150–1163.
- McNally, R. R., Curland, R. D., Webster, B. T., Robinson, A. P., & Ishimaru, C. A. (2017). First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg and stem rot in commercial and seed potato fields in Minnesota and North Dakota. *Plant Disease*, *101*, 1672–1672.
- Meng, X. N., Chen, Q. M., Fan, H. Y., Song, T. F., Cui, N., Zhao, J. Y., Jia, S. M., & Meng, K. X. (2017). Molecular characterization, expression analysis and heterologous expression of two translationally controlled tumor protein genes from *Cucumis sativus*. *PLoS One*, *12*, 1–17.
- Moleleki, L. N., Onkendi, E. M., Mongae, A., & Kubheka, G. C. (2013). Characterization of *Pectobacterium wasabiae* causing blackleg and soft rot diseases in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, *135*, 279–288.
- Moraes, A. J. G., Souza, E. B., Mariano, R. L. R., Silva, A. M. F., & Lima, N. B. (2017). First report of *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing soft rot of *Cucurbita pepo* in Brazil. *Plant Disease*, *101*, 379–380.
- Moretti, C., Fakhr, R., Cortese, C., De Vos, P., Cerri, M., Geagea, L., Cleenwerck, I., & Buonauro, R. (2016). *Pectobacterium aroidearum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Lebanon. *Plant Pathology*, *144*, 205–211.
- Nabhan, A. S., De Boer, H. S., Maiss, E., & Wydra, K. (2012a). Taxonomic relatedness among *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, *113*, 904–913.
- Nabhan, S., Wydra, K., Linde, M., & Debener, T. (2012b). The use of two complementary DNA assays, AFLP and MLSA, for epidemic and phylogenetic studies of pectolytic enterobacterial strains, with focus on the heterogeneous species *Pectobacterium carotovorum*. *Plant Pathology*, *61*, 498–508.

- Nassan, N., & Fettoche, F. (1991). Recherche des bactéries de la pomme de terre dans le littoral algérois. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 21, 723–726.
- Nykyri, J., Niemi, O., Koskinen, P., Nokso-Koivisto, J., Pasanen, M., Broberg, M., Plyusnin, I., Törönen, P., Holm, L., Pirhonen, M., & Palva, T. (2012). Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen *Pectobacterium wasabiae* SCC3193. *PLoS Pathogens*, 8(11), e1003013.
- Onkendi, E. M., & Moleleki, L. N. (2014). Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *brasiliense* from diseased potatoes in Kenya. *European Journal of Plant Pathology*, 139, 557–566.
- Ozturk, M., & Aksoy, H. M. (2016). First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg and soft rot of potato in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 98, 677–697.
- Panda, P., Fiers, M. A. W. J., Armstrong, K., & Pitman, A. R. (2012). First report of blackleg and soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in New Zealand. *New Disease Reports*, 26, 15–15.
- Pérombelon, M. C. M. (2002). Potato disease caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis. *Plant Pathology*, 51, 1–12.
- Pérombelon, M. C. M., & Kelman, A. (1980). Ecology of soft rot *Erwinias*. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 361–387.
- Pitman, A. R., Harrow, S. A., & Visnovsky, S. B. (2010). Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 423–435.
- Potrykus, M., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., & Lojkowska, E. (2017). Interplay of classic Exp and specific Vfm quorum sensing systems on the phenotypic features of *Dickeya solani* strains exhibiting different virulence levels. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12614>.
- Roskopf, E., & Hong, J. (2016). First report of bacterial stem rot of “Heirloom” tomatoes caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in Florida. *Plant Disease*, 100, 1233–1233.
- Sands, D. C. (1990). Physiological criteria-determinative tests. In Z. Klement, K. Rudolph, & D. C. Sands (Eds.), *Methods in Phytobacteriology* (pp. 133–143). Budapest: Akademiai Kiado.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Initial identification of common genera. In N. W. Schaad, J. B. Jones, & W. Chun (Eds.), *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria Third edition* (pp. 84–120). St. Paul: APS PRESS.
- Secor, G. A., Rivera-Varas, V. V., Brueggeman, R. S., Metzger, M. S., Rengifo, J., & Richards, J. K. (2016). First report of field decay of sugar beet caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in North America. *Plant Disease*, 100, 2160–2160.
- van der Merwe, J. J., Coutinho, T. A., Korsten, L., & van der Waals, J. E. (2010). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 175–185.
- van der Wolf, J. M., Nijhuis, E. H., Kowalewska, M. J., Saddler, G. S., Parkinson, N., Elphinstone, J. G., Pritchard, L., Toth, I. K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., de Vos, P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garland, L., Hélias, V., Pothier, J. F., Pflüger, V., Duffy, B., Tsrör, L., & Manulis, S. (2014). *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 64, 768–774.
- Waleron, M., Waleron, K., & Lojkowska, E. (2013). Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 149–158.
- Waleron, M., Waleron, K., & Lojkowska, E. (2015). First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing soft rot on potato and other vegetables in Poland. *Plant Disease*, 99, 1271–1271.
- Wang, L., Li, H., Zhao, C., Li, S., Kong, L., Wu, W., Kong, W., Liu, Y., Wei, Y., Zhu, J. K., & Zhang, H. (2017). The inhibition of protein translation mediated by AtGCN1 is essential for cold tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell & Environment*, 40, 56–68.
- Yahiaoui-Zaidi, R., Jouan, B., & Andrivon, D. (2003). Biochemical and molecular diversity among *Erwinia* isolates from potato in Algeria. *Plant Pathology*, 52, 28–40.
- Yahiaoui-Zaidi, R., Ladjouzi, R., & Benallaoua, S. (2010). Pathogenic variability within biochemical groups of *Pectobacterium carotovorum* isolated in Algeria from seed potato tubers. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, 1, 1–9.
- Yap, M. N., Barak, J. D., & Charkowski, A. O. (2004). Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3013–3023.
- Zhang, Y., Fanb, Q., & Loria, R. (2016). A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data. *Systematic and Applied Microbiology*, 39, 252–259.
- Zoledowska, S., Motyka, A., Zukowska, D., Sledz, W., & Lojkowska, E. (2018). Population structure and biodiversity of *Pectobacterium parmentieri* isolated from potato fields in temperate climate. *Plant Disease*, 102(1), 154–164.

Supplementary Table 1. Primers used in the present study.

Primername	Primersequence
Y1	5'-TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT-3'
Y2	5'-CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT-3'
BR1f	5'-GCGTGCCGGGTTTATGCACT-3'
L1r	5'-CAAGGCATCCACCGT-3'
P0 (6-27f <i>E. coli</i>)	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
P6 (1515-1495r <i>E. coli</i>)	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'
mdh86F	5'-CCCAGCTTCCTTCAGGTTTCAGA-3'
mdh628R	5'-CTGCATTCTGAATACGTTTGGTCA-3'
acnA1	5'-GCCTCGCCGCCGCTGGTGGT-3'
acnA2	5'-CCGCGCATCATCACTTCATG-3'
atpD-01-F	5'-RTAATYGGMGCSGTRGTNGAYGT-3'
atpD-02-R	5'-TCATCCGCMGGWACRTAWAYNGCCTG-3'
gyrB-01-F	5'-TAARTTYGAYGAYAACTCYTAYAAAGT-3'
gyrB-02-R	5'-CMCCYTCCACCARGTAMAGTT-3'
infB-01-F	5'-ATYATGGGHCAYGTHGAYCA-3'
infB-02-R	5'-ACKGAGTARTAACGCAGATCCA-3'

Annexes

Supplementary Table 2. Bacterial strains investigated in this study, including strains for which sequences were taken from GenBank.

Strain	Host	Origin	Accessionnumber					
			16S	<i>mdh</i>	<i>acnA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>
<i>Pectobacteriumatrosepticum</i>								
ICMP 1526 ^T	<i>Solanumtuberosum</i>	UK		GQ144373	JN600333	JF311476	JF311589	JF311702
NZEC20	<i>Solanumtuberosum</i>	New Zealand		GQ144374				
SCRI 1043	<i>Solanumtuberosum</i>	UK		EF550788	EF550630	ECA4512	ECA4438	ECA0712
<i>Pectobacteriumbetavascolorum</i>								
ICMP 4226 ^T	<i>Beta vulgaris</i>	USA		GQ144369				
<i>Pectobacteriumcarotovorum</i> subsp. <i>brasilienis</i>								
LMG 21371 ^T	<i>Solanumtuberosum</i>	Brazil		JF926799	JF926769	JF311492	JF311605	JF311718
CFIA 1001	<i>Solanumtuberosum</i>	Canada		JF926797	JF926767	----- NZ_JPSM00000000* -----		
CFIA 1009	<i>Solanumtuberosum</i>	Canada		JF926796	JF926766	----- NZ_JPSN00000000* -----		
Ecbr8	<i>Solanumtuberosum</i>	Brazil		JF926798				
Ecbr371	<i>Solanumtuberosum</i>	Brazil		JF926800				
Ecbr1692	<i>Solanumtuberosum</i>	Brazil		EF550786				
Ecbr1695	<i>Solanumtuberosum</i>	Brazil		EF550787				
HNA 2	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY747994				
HNA 8	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY747995				
HNA 9	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY747996	MF509854	MF509860	MF509866	MF509872
HNA 15	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY747997				
HNA 26	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria	KY751954	KY747998				
HNA 27	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY747999	MF509858	MF509864	MF509870	MF509876
pcbm-3	<i>Solanumtuberosum</i>	Japan		LC145732				
WPP165	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550795				
<i>Pectobacteriumcarotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>								
ICMP 5702 ^T	<i>Solanumtuberosum</i>	Denmark		GQ144372	GQ144392	JF311488	JF311601	JF311714
B-P2	<i>Cichoriumintybus</i>	Japan		AB744170				
DAPP-PG 752	<i>Solanumtuberosum</i>	Lebanon		KP151644	MF984399	KR558755	KR558756	KR558757
Ecc21	<i>Solanumtuberosum</i>	The Netherlands		EF550779				
Ecc71	<i>Solanumtuberosum</i>	The Netherlands		EF550780				
Ecc193	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550782				
Ecc380	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550810				
HNA 1	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748000				
HNA 3	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748001				
HNA 4	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748002				
HNA 5	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748003	MF509853	MF509859	MF509865	MF509871
HNA 6	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748004				
HNA 11	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748005				
HNA 12	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748006	MF509855	MF509861	MF509867	MF509873
HNA 13	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748007				
HNA 17	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748008				
HNA 18	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria	KY751953	KY748009	MF509856	MF509862	MF509868	MF509874
HNA 19	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748010				

Annexes

Supplementary Table 2. Continued.

Strain	Host	Origin	Accessionnumber					
			16S	<i>mdh</i>	<i>acnA</i>	<i>atpD</i>	<i>gyrB</i>	<i>infB</i>
<i>Pectobacteriumcarotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>								
HNA 20	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748011				
HNA 21	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748012				
HNA 22	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748013	MF509857	MF509863	MF509869	MF509875
HNA 24	<i>Solanumtuberosum</i>	Algeria		KY748014				
NZEC 118	<i>Solanumtuberosum</i>	New Zealand		GQ144384				
WPP 14	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550761	AY429004	----- ABVY01000000* -----		
WPP 17	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		AY428983				
WPP 127	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EU250368				
WPP 236	<i>Arctiumminus</i>	USA		EF550808				
<i>Pectobacteriumcarotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>								
ICMP 11533 ^T	<i>Cichoriumintybus</i>	France		GQ144370				
NCPBP 3841	<i>Cichoriumintybus</i>	France		----- NZ_JQOF00000000* -----				
<i>Pectobacteriumwasabiae</i>								
WPP 19	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550760				
WPP 172	<i>Solanumtuberosum</i>	USA		EF550809				
<i>Yersiniapestis</i>								
CO92	-	-		YP03516	YPO2221	YPO4121	YPO4094	YPO3496

DAPP-PG, Department of Agricultural, Food and Environmental Sciences, Plant Protection Unit, University of Perugia (Italy); ICMP, International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, New Zealand; JKI, Julius Kühn-Institute, Dossenheim and Quedlinburg, Germany; LMG, BCCM/LMG Bacteria Collection, Belgium; SCRI, Scottish Crop Research Institute, Dundee, UK.

Sequences of the HNA isolates from Algeria were determined in the frame of this study.

*Numbers indicate the whole genome accessions.

Annexe II

Séquences nucléotidiques partielles des gènes du
***Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* et**
***Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* séquencés**
pour cette étude

Séquences partielles du gène *infB*1. *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* strain HNA 27 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509876.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTTCAGGCAACGGATATCGTGGTACTGGTAGTCGCAGCGGATGA
 TGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCGGTTG
 TTGTGTCAGTCAACAAAATCGATAAACCTGACTCTGATCCAGATCGTGAAAAACCGAACTGT
 CTCAGTACGGCATCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCGAATCTCAGTTTGTTCACGTATCTGCT
 AAAGCCGGTCCCAGTATCGTTCGAACTGCTGGATGCGATTCTGCTGCAGGCCGAAGTTCTGGA
 ACTGAAAGCGGTCCGTAGCGGCATGGCGAACGGTGTCTGATCGAATCCTTGCGGGATAAAG
 GTCGTGGCCCGGTGGCAACCGTACTGGTTCGTGAAGGTAATCTGAATAAAGGCGATATCGTT
 CTGTGCGGCTTCGGATATGGCCGTGTTCTGTCGATGCGTGATGAATTTGGTCTGAAATCAC
 GTCCGCGGGTCATTCTATTCCGGTAGAAATTCTCGGTATATCCGGT

2. *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* strain HNA 22 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509875.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTGTCTCAGGCTACGGATATCGTGGTACTGGTGTGGCGGCGGATGA
 TGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCCTGTTG
 TTGTGGCAGTAACAAAATCGATAAGCCTGATGCCGATCCAGATCGTGTGAAAACCGAGCTG
 TCTCATTACGGCTTCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGTGAATCTCAGTTTGTTCACGTATCCGC
 TAAAGCCGGTACGGGGATCGTTCGAACTGCTGGATTCGATTCTGTGGCAGGCCGAAGTTCTGG
 AACTGAAAGCGGTCCGTAGCGGCATGGCGAACGGTGTGATCGAATCCTTCCCTGGATAAA
 GGCCGTGTCCCGGTGGCAACCGTACTGGTGCCTGAAGGTAATTTGAATAAAGGCGACTTCGT
 TCTGTGCGGCTTTGAATATGGCCGTGTCCGTGCATGCGTGATGAATGGGTCTGAGAGCA
 CGTCCGCGAGGTCCTTCTATTCTGTAGAAATTCTCGGTATGTCCGGT

3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509874.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTGCTCAGGCAACGGATATCGTGGTACTGGTTGTGGCGGCAGATGATGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCGGTTGTTGTTGCAGTAAACAAAATCGATAAGCCTGATGCCGATCCAGATCGTGTGAAAACCGAACTGTCTCAGTACGGCATCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCCAATCTCAGTTTGTCCCCGTATCCGCTAAAGCGGGTACGGGTATCGACGACCTGCTGGATGCGATTCTGCTGCAGGCGGAAGTTCTGGAAGTAAAGCGGTCCGTA GCGCTATGGCGAACGGTGTCTGTGATCGAATCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGCCCGTTGCAACCGTACTGGTGGCGTGAAGGGACCTTGAATAAGGGCGATATCGTTCTGTGCGGCTTTGAATATGGCTGTGTTCTGTGCGATGCGTAATGAACTGGGTCTGAGATCACGTCGCCAGGTCCTTCTGTTCTGTAGAAATTCTCGGTTTTTCCGGT

4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 12 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509873.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTGCTCAGGCAACGGATATCGTGGTACTGGTTGTCCGGCGGATGATGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCGGTTGTTGTCGCAGTAAACAAAATCGATAAGCCTGACTCTGATCCAGATCGTGTGAAAACCGAACTGTCTCAGTACGGCATCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCCAATCTCAGTTTGTCCACGTATCCGCTAAAGCGGGTACCGGTATCGACGAACTGCTGGATGCGATTCTGTTGCAGGCGGAAGTTCTGGAAGTAAAGCGGTCCGTA GCGGCATGGCGAACGGTGTCTGTGATCGAATCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGGCCCGTTGCAACCGTACTGGTTCGTGAAGGTA CTCTGAATAAAGGCGATATCGTTCTGTGCGGCTTTGAATATGGCCGTGTTCTGTGCGATGCGTGATGAGTTGGTCTGAGATCACGTCGCCGGGTCCTTCTATTCTGTAGAAATTCTCGGTATGTCCGGT

5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 9 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509872.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTGCTCAGGCAACGGATATCGTGGTACTGGTTGTCCGAGCGGATGATGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCGGTTGTTGTTGCAGTCAACAAAATCGATAAACCTGACTCTGATCCAGATCGTGTGAAAACCGAACTGTCTCAGTACGGCTTCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGCCAATCTCAGTTTGTCCCCGTATCTGCTAAAGCCGGTACCGGTATCGACGAACTGCTGGATTTCGATTCTGCTGCAGGCGGAAGTTCTGGAAGTAAAGCGGTCCGTA GCGGCATGGCGAACGGTGTCTGTGATCGAATCCTTCCTGGATAAAGGTCGTGTCCCGTTGCAACCGTACTGGTTCGTGAAGGTA CTCTGAATAAAGGCGATATCGTTCTGTGCGGCTTCGGATATGGCCGTGTTCTGTGCGATGCGTGATGAACTGGTCTGAGATCACGTCGCCAGGTCCTTCTATTCTGTAGAAATTCTCGGTTATTCCGGT

6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 5 translation initiation factor IF-2 (*infB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509871.1

GCAATGCGTGCTCGTGGTGCTCAGGCTACGGATATCGTGGTACTGGTTGTGGCGGCGGATGATGGCGTGATGCCTCAGACCATCGAAGCGATCCAGCATGCGAAAGCAGCTCAGGTTCCCTGTTGTTGTCGCAGTAAACAAAATCGATAAGCCTGATGCCGATCCAGATCGTGTGAAAACCGAGCTGTCTCAGTACGGCTTCATGCCGGAAGAGTGGGGCGGTGAATCTCAGTTTGTTCACGTATCCGC TAAAGCAGGTACGGGGATCGACGAACTGCTGGATTCGATTCTGTTGCAGGCCGAAGTTCTGGA AACTGAAAGCGGTCCGTA GCGGCATGGCGAACGGTGTGTGATCGAATCCTTGCTGGATAAA GGCCGTGGCCCGTTGCAACCGTACTGGTGCCTGAAGGTACGTTGAATAAAGCGCACATCGT TCTGTGCGGCTTTGAATATGGCCGTGTCCGTGCGATGCGTGATGAATTGGGTGCTGAGATCA CGTCCGCAGGTCCTTCTATTCTGTAGAAATTCTCGGTATGTCCGGT

Séquences partielles du gène *gyrB*

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 27 DNA gyrase B subunit (*gyrB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509870.1

AAAGATAAAGCCGATCATTACCATTATGACGGCGGTATCAAGGCGTTTGTGATTACCTGAAC CGTATCAAGACGCCAATCCACCCGAACGTTTATTTCTCGACGGTGAAAGATGACATCGG CGTGGAAGTGGCATCGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA ACATTCCACAGCGCGACGGTGGTACGCACCTGGCCGGTTTCCGTGCCGCGATGACCCGTACG CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAAGTCAGCGCCACCGGTGA CGATGTGCGTGAAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT CGGAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACGGCGGTTGAATCGCTGGTAAAC GAGAAGCTGGTGGATTATCTGATGAAAATCCGTACAGACGCCAAAATCGTGGTCCGGTAAAAT TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 22 DNA gyrase B subunit (*gyrB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509869.1

AAAGATAAAGCCGATCATTATCATTATGAAGGCGGTATCAAGGCGTTTGTGATTACCTGAAC CGTAACAAGACGCCAATCCACCCGAACGCGTTTTATTTCTCGATGACGAAAGACGACATCGG CGTTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA ACATTCCGCAGCGTGACGGTGGCACACACCTGGCCGGTTTCCGTGCCGCGATGACCCGTACG CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAATTAGCGCCACCGGTGA CGATGCGCGTGAAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT CGCAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACCGCGGTTGAATCGCTGGTAAAC GAAAAGCTGGTGGATTATCTGATGAAAATCCATCGGATGCCAAAATCGTGGTCCGGTAAAAT TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 DNA gyrase B subunit (*gyrB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509868.1

AAAGATAAAGCCGACCATTATCATTATGAAGGCGGTATCAAGGCGTTTGTGATTACCTGAAC
CGTAACAAGACGCCAATCCACCCGAACGTGTTTTATTTCTCGATGACGAAAGACGACATTGG
CGTTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA
ACATTCCGCAGCGTGACGGTGGTACTCACCTGGCCGTTTCCGTGCCGCATGACCCGTACG
CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAATCAGCGCCACCGGTGA
CGATGCGCGTGAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT
CGCAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACGGCGGTTGAATCGCTGGTAAAC
GAAAAGCTTGTGGATTATCTGCTGGAAAATCCATCGGATGCCAAAATCGTGGTCGGTAAAAT
TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 12 DNA gyrase B subunit (*gyrB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509867.1

AAAGATAAAGCCGACCATTATCATTATGAAGGCGGTATCAAGGCGTTTGTGATTACCTGAAC
CGTAACAAGACGCCAATCCACCCGAACGTGTTTTATTTCTCGATGACGAAAGACGACATCGG
CGTTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA
ACATTCCGCAGCGTGACGGTGGTACGCACTTGGCCGTTTCCGTGCCGCATGACCCGTACG
CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAATCAGCGCCACCGGTGA
CGATGCGCGTGAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT
CGCAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACGGCGGTTGAATCGCTGGTAAAC
GAAAAGCTGGTGGATTATCTGATGAAAATCCATCGGATGCCAAAATCGTGGTCGGTAAAAT
TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 9 DNA gyrase B subunit (*gyrB*) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509866.1

AAAGATAAAGCCGATCATTACCATTATGACGGCGGTATCAAGGCGTTTGTGATTACCTGAAC
CGTATCAAGACGCCAATCCACCCGAACGTGTTTTATTTCTCGACGGTGAAAGATGACATCGG
CGTGAAGTGGCATTGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA
ACATTCCACAGCGCGACGGTGGTACGCACTTGGCCGTTTCCGTGCCGCATGACCCGTACG
CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAAGTCAGCGCCACCGGTGA
CGATGCGCGTGAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT
CGGAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACGGCGGTTGAATCGCTGGTAAAC
GAGAAGCTGGTGGATTATCTGATGAAAATCCGTCAGACGCCAAAATCGTGGTCGGTAAAAT
TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 5 DNA gyrase B subunit (gyrB) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509865.1

AAAGATAAAGCCGATCATTATCATTATGAAGGCGGTATCAAGGC GTTGTGATTACCTGAAC
CGTAACAAGACGCCAATCCACCCGAACGTGTTTTATTTCTCGATGACGAAAGACGACATTGG
CGTTGAAGTGGCGTTGCAGTGGAACGATGGTTTCCAGGAAAACATTTACTGCTTTACCAACA
ACATTCCGCAGCGTGACGGTGGACCGCACTTGCCCGTTTTCTGCGCCGATGACCCGTACG
CTGAATACCTACATGGATAAAGAAGGCTACAGCAAGAAAAGCCAAAATCAGCGCCACCGGTGA
CGATGCGCGTGAAGGGCTGATTGCCGTGGTGTCCGTGAAAAGTACCGGATCCGAAATTCTCCT
CGCAGACCAAAGACAAGCTGGTTTCTTCCGAAGTGAAAACCGCTGTTGAATCGCTGGTAAAC
GAAAAGCTGGTGGATTATCTGCTGGAAAATCCATCGGATGCCAAAATCGTGGTCCGGTAAAAT
TATTGATGCCGCACGTGCCCGTGAA

Séquences partielles du gène atpD

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 27 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509864.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGGTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGTGACCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCTATTACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAAC TACAGGAACTGCTGAAAACCGGCATCAAGGTTATC GACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTTGCAGGGCGTAGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGTAAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC
GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTACTGCTGTTCTCGATAA
CATCTACCGTTAT

2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 22 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509863.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGTTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGCGATCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCTATTACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAAC TACAGGAACTGCTGAAAACCGGCATCAAGGTTATC GACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTTGCAGGTGTTGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGTCAAGATGAACGAGCCGCCGGGTAAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC
GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTACTGCTGTTCTCGATAA
CATCTACCGTTAT

3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509862.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGGTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGCGATCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCTATTACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAACCTCACAGGAACTGCTGGAAAACCGGCATCAAAGTTATCGACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTG CAGGTGTTGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGTCAGATGAACGAGCCGCCGGGTAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC
GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTA CTGCTGTTCTCGATAA
CATCTACCGTTAT

4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 12 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509861.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGGTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGCGATCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCTATTACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAACCTCACAGGAACTGCTGGAAAACCGGCATCAAAGTTATCGACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTG CAGGTGTTGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGTCAGATGAACGAGCCGCCGGGTAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC
GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTA CTGCTGTTCTCGATAA
CATCTACCGTTAT

5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 9 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509860.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGGTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGTGACCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGCGAAGAAGAGCGTTGGGCTATTACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAACCTCACAGGAACTGCTGGAAAACCGGCATCAAAGTTATCGACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTG CAGGGCGTAGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGCCAGATGAACGAGCCGCCGGGTAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC

GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTACTGCTGTTCGTCGATAA
CATCTACCGTTAT

6. *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* strain HNA 5 ATP synthase subunit beta (atpD) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509859.1

TCTTCTGACGGCCTGCGTCGCGGGTTGAACGTGAATAACCTGGACCACCCGATCGAAGTGCC
GGTAGGTAAGCAACGCTGGGTCGTATCATGAACGTATTGGGCGATCCAATCGACATGAAAG
GCGACATCGGC GAAGAAGAGCGTTGGGCTATTCACCGTTCA GCTCCGAGCTATGAA GAGCTG
TCAAAC TACAGGAACTGCTGGAAAACCGGCATCAAGGTTATCGACCTGATGTGTCCGTTTGC
CAAGGGCGGTAAAGTGGGTCTGTTCCGGTGGTGC GGGCGTAGGTAAAACCGTAAACATGATG
GAGCTGATCCGTAACATCGCGATCGAGCACTCCGGTACTCCGTGTTTGCAGGTGTTGGTGA
GCGTACCCGTGAAGGTAACGACTTCTACCACGAAATGACCGACTCCAACGTAATCGATAAAG
TATCACTGGTGTATGGTCAGATGAACGAGCCGCCGGGTAACCGTCTGCGCGTAGCATTGACC
GGTCTGACCATGGCGGAAAAATTCCGTGATGAAGGCCGTGACGTACTGCTGTTCGTCGATAA
CATCTACCGTTAT

Séquences partielles du gène acnA

1. *Pectobacterium carotovorum subsp. brasiliense* strain HNA 27 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509858.1

CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGACGGAAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATTTGGCCGTC
GACGAAAGCGGTGGCGGACGCGGTATTGAACGTGACGCGGGCATGTTCCACAAACAGTAT
GCCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATTGAGGTCGACAACAATCCTACCTA
TCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTTGATATGGGGAAAAG
AGCCTGAGCCGTTT CAGGATATCCACAACGCACGTATTCTGGCGATGCTGGGCGATTCCGGTG
ACAACCGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGACAGCCCGGCAGGGAAATATTT
G

2. *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* strain HNA 22 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509857.1

CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGATGGGAAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATCTGGCCGTC
GACTAAAGCGGTGGCGGATGCGGTATTGAACGTGACGCGGGCATGTTCCACAAACAGTATG
CCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATTGA GGTCGACGACAATCCTACCTAT
CAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTTGATATGGGGAAAAGA
ACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTTCTGGCGATGCTGGGCGATTCCGGTGA
CAACGGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGATAGCCCGGCAGGAAAATATTTG

3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509856.1

```
CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGATGGGAAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATCTGGCCGTC
GACTAAAGCGGTGGCGGATGCGGTATTAACGTTAGCGCTGGCATGTTCCACAAACAGTATG
CCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTCGACGACAATCCTACCTAT
CAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTTGATATGGGGAAAAGA
ACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGCTGGGCGATTTCGGTGA
CAACGGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGATAGCCCAGGAAAATATTG
```

4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 12 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509855.1

```
CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGACGGGAAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATCTGGCCGTC
GACTAAAGCGGTGGCGGACGCAGTATTGAACGTCAGCGCGGGCATGTTCCACAAACAGTATG
CCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATCGAGGTCGACAACAACCCACCTAT
CAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTTGATATGGGGAAAAGA
GCCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAATGCACGTATTCTGGCGATGCTGGGCGATTTCGGTCA
CAACGGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGATAGCCCAGGAAAATATTG
```

5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 9 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509854.1

```
CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGACGGGAAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATCTGGCCGTC
GACGAAAGCGGTGGCGGACGCAGTATTGAACGTCAGCGCGGGCATGTTCCACAAACAGTAT
GCCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATTGAGGTCGACAACAATCCTACCTA
TCAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTTGATATGGGGAAAAG
AGCCTGAGCCGTTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGCTGGGCGATTTCGGTG
ACAACCGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGACAGCCCAGGAAAATATTG
G
```

6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 5 aconitase (acnA) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: MF509853.1

CAAGAACCGCTGGGTGAAGATCGTGATGGGAAAGCCGTCTACCTGAAAGATATCTGGCCGTC
 GACTAAAGCGGTGGCGGATGCGGTATTAACGTTAGCGCGGGCATGTTCCACAAACAGTATG
 CCGCCGTGTTTGAAGGCACGCAGGAGTGGCAAGATATTGAGGTCGACGACAATCCTACCTAT
 CAATGGCCGGAAGAATCGACCTATATCCGCCAGACGCCTTTCTTCTGATATGGGGAAAGA
 ACCTGAGCCAGTTCAGGATATCCACAACGCGCGCATTCTGGCGATGCTGGGGGATTCGGTGA
 CAACGGACCATATCTCACCAGCAGGCAACATCAAGCGCGATAGCCCGGCAGGGAAATATTG

Séquences partielles du gène mdh

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 24 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748014.1

TGGTATGGATCGTTCGGATCTGTTCAACGTTAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
 AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
 TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
 GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 22 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748013.1

TGGTATGGATCGTTCGGATCTGTTCAACGTTAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
 AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
 TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
 GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

3. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 21 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748012.1

TGGTATGGATCGTTCGGATCTGTTCAACGTTAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
 AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
 TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
 GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

4. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 20 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748011.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

5. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 19 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748010.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

6. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748009.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

7. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 17 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748008.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

8. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 13 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748007.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTTAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

9. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 12 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748006.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAATGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCAGTGAACACGACCG
TTGCGATTGCGGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGTGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

10. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 11 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748005.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

11. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 6 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748004.1

```
TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC
```

12. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 5 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748003.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

13. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 4 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748002.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

14. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 3 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748001.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

15. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 1 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY748000.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACCG
TTGCCATCGCAGCAGAAGTGCTGAAAAAAGCTGGCGTATATGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACAACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTCGTTGCTCC

16. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 27 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747999.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACATTCGTTGCTCC

17. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 26 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747998.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACATTCGTTGCT

18. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 15 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747997.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTGTGCT

19. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 9 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747996.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTGTGCT

20. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 8 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747995.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACATTCGTTGCTCC

21. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 2 malate dehydrogenase (mdh) gene, partial cds

Numéro d'accèsion: KY747994.1

TGGTATGGATCGTTCCGATCTGTTCAACGTCAATGCTGGCATTGTGCGTAATCTGGTTGAGCA
AATTGCGGTTACTTGCCCGAAAGCCTGTATCGGTATCATCACCAACCCGGTGAATACGACTG
TTGCCATTGCAGCCGAAGTGCTGAAAAAAGCGGGCGTATACGACAAAAACAACTGTTCCGGC
GTCACCACGCTGGATATCATCCGTTCCAACACGTTTGTGCTCC

Séquences partielles du gène 16S ribosomal RNA

1. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain HNA 26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Numéro d'accèsion: KY751954.1

CGATGTAGCGCTAGATACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAAGAGCTTGCTCTGTTGGGT
GACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAAAGAGGGGGACCTTCAGGCCTCTC
GCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCTAGGCGACG
ATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCG
TGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAAGGCGGTAAGGTTAA
TAACCTTATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGT
CTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGAGAGGC
TAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAG
GAATACCGGTGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGATCGCTCAGGTGCCAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTGGAGGT
GTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGA

2. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain HNA 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Numéro d'accèsion: KY751953.1

GGTGTAGCGGCATAGATACACATGCAGTCGAGCGGTAGCACAGAAGA GCTTGCTCTTTGGG
TGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGA GGGGGATAACTAC
TGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACCTCGCAAGAGCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
CGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGTGGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGAC
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGC
GTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAA GGCGGTAAGGTTA
ATAACCTTATCGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCG
CGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATGACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGG
TCTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGCTTAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAGG
CTAGAGTCTTGTAAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGA
GGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTG
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGATTTGGAGGTT
GTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTCGGTAGAGATAC

Annexe III

Travaux réalisés dans le cadre de la thèse

Tableau 23 : Présentation de l'ensemble des échantillons prélevés

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
1	<i>Kondor</i>	Mars. 2012	Chlef
2	<i>Kondor</i>	Mars. 2012	Chlef
3	<i>Spunta</i>	Mars. 2012	Chlef
4	<i>Kondor</i>	Mars. 2012	Chlef
5	<i>Spunta</i>	Mars. 2012	Chlef
6	<i>Spunta</i>	Mars. 2012	Chlef
7	<i>Spunta</i>	Mars. 2012	Chlef (Harchoune)
8	<i>Spunta</i>	Avril. 2012	Chlef (Touagrit)
9	<i>Spunta</i>	Avril. 2012	Chlef (Quasmia)
10	<i>Spunta</i>	Avril. 2012	Chlef (Mejaja)
11	<i>Spunta</i>	Mai. 2012	Ain defla (Bourached)
12	<i>Spunta</i>	Mai. 2012	Ain defla
13	<i>Spunta</i>	Mai. 2012	Ain defla
14	<i>Spunta</i>	Mai. 2012	Ain defla
15	<i>Désirée</i>	Mai. 2012	Ain defla
16	<i>Spunta</i>	Mai. 2012	Ain defla (Amra)
17	<i>Kondor</i>	Mai. 2012	Ain defla (Daya)
18	<i>Désirée</i>	Juin. 2012	Ain Defla
19	<i>Kondor</i>	Juin. 2012	Chlef
20	<i>Désirée</i>	Juin. 2012	Ain defla (Sidi lakhder)
21	<i>Spunta</i>	Juil. 2012	Chlef
22	<i>Spunta</i>	Juil. 2012	Chlef
23	<i>Spunta</i>	Juil. 2012	Chlef
24	<i>Spunta</i>	Oct. 2012	Chlef
25	<i>Spunta</i>	Oct. 2012	Chlef
26	<i>Spunta</i>	Oct. 2012	Chlef
27	<i>Spunta</i>	Oct. 2012	Chlef (Mejaja)
28	<i>Spunta</i>	Oct. 2012	Chlef (Mejaja)
29	<i>Spunta</i>	Nov. 2012	Chlef (Mejaja)
30	<i>Spunta</i>	Nov. 2012	Chlef (Mejaja)
31	<i>Spunta</i>	Nov. 2012	Chlef (Mejaja)
32	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef
33	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef
34	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef
35	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
36	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
37	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
38	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
39	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef Karimia
40	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)

Tableau 23 (Suite 1)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
41	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
42	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
43	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef (Karimia)
44	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Harchoune)
45	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef (Karimia)
46	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef (Karimia)
47	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
48	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
49	<i>Kondor</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
50	<i>Désirée</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
51	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
52	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
53	<i>Spunta</i>	Déc. 2012	Chlef (Mejaja)
54	<i>Kondor</i>	Janv. 2013	Ain defla
55	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
56	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
57	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
58	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef
59	<i>Kondor</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
60	<i>Désirée</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
61	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
62	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
63	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
64	<i>Spunta</i>	Janv. 2013	Chlef (Mejaja)
65	<i>Spunta</i>	Mars. 2013	Chlef
66	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef
67	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
68	<i>Désirée</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
69	<i>Kondor</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
70	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef
71	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef
72	<i>Kondor</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
73	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
74	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
75	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
76	<i>Désirée</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
77	<i>Désirée</i>	Mai. 2013	Chlef (Mejaja)
78	<i>Kondor</i>	Mai. 2013	CHLEF UHBC
79	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Ain defla
80	<i>Spunta</i>	Mai. 2013	Ain defla

Tableau 23 (Suite 2)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
81	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Mascara
82	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Mascara
83	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Mascara
84	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Mascara
85	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Mascara
86	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Mascara
87	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Mascara
88	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Mascara
89	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Mascara
90	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Mascara
91	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Mascara
92	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Relizne
93	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Relizne
94	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Relizne
95	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Relizne
96	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef
97	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Chlef
98	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Chlef
99	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Chlef
100	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Chlef
101	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Relizane
102	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef
103	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef
104	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Chlef
105	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
106	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
107	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Relizane (Hmadna)
108	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
109	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
110	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
111	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
112	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
113	<i>Désirée</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
114	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
115	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Chlef (Tegagra)
116	<i>Bartina</i>	Juin. 2013	Relizane (Hmadna)
117	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Relizane
118	<i>Kondor</i>	Juin. 2013	Chlef (Mejaja)
119	<i>Spunta</i>	Juin. 2013	Ain defla (Attaf)
120	<i>Kondor</i>	Juil. 2013	Chlef

Tableau 23 (Suite 3)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
121	<i>Désirée</i>	Juil. 2013	Ain Defla
122	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef
123	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef
124	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef
125	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef
126	<i>Désirée</i>	Juil. 2013	Ain Defla
127	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef
128	<i>Desirée</i>	Juil. 2013	Ain defla (Djendel)
129	<i>Spunta</i>	Juil. 2013	Chlef (Abou Ihacene)
130	<i>Kondor</i>	Sept. 2013	Chlef
131	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Chlef
132	<i>Vivaldi</i>	Sept. 2013	Chlef
133	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Chlef
134	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Ain Defla
135	<i>Désirée</i>	Sept. 2013	Ain Defla
136	<i>Bartina</i>	Sept. 2013	Chlef (Mejaja)
137	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Chlef (Mejaja)
138	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Chlef (Mejaja)
139	<i>Spunta</i>	Sept. 2013	Chlef (Mejaja)
140	<i>Spunta</i>	Nov. 2013	Ain Defla
141	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
142	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
143	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
144	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
145	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
146	<i>Désirée</i>	Nov. 2013	Ain Defla
147	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Tiaret
148	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Tiaret
149	<i>Spunta</i>	Déc. 2013	Tiaret
150	<i>Spunta</i>	Déc. 2013	Tiaret
151	<i>Spunta</i>	Déc. 2013	Tiaret
152	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Tiaret
153	<i>Spunta</i>	Déc. 2013	Tiaret
154	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
155	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
156	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
157	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
158	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
159	<i>Désirée</i>	Déc. 2013	Ain defla (Abadia)
160	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Chlef
161	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Chlef

Tableau 23 (Suite 4)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
162	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Chlef
163	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Mostaganem
164	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Mostaganem
165	<i>Kondor</i>	Janv. 2014	Mostaganem
166	<i>Désirée</i>	Janv. 2014	Tiaret
167	<i>Spunta</i>	Janv. 2014	Chlef (Karimia)
168	<i>Kondor</i>	Janv. 2014	Chlef (Mejaja)
169	<i>Kondor</i>	Janv. 2014	Mostaganem
170	<i>Kondor</i>	Janv. 2014	Mostaganem (Masra)
171	<i>Kondor</i>	Janv. 2014	Mostaganem (Masra)
172	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef
173	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef
174	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef (Chettia)
175	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef (Chettia)
176	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef (Harchoune)
177	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef (Ouled Abbas)
178	<i>Spunta</i>	Fév. 2014	Chlef (Chettia)
179	<i>Spunta</i>	Mars.2014	Chlef
180	<i>Spunta</i>	Mars.2014	Chlef (Harchoune)
181	<i>Bartina</i>	Mars.2014	Ain defla
182	<i>Spunta</i>	Juin. 2014	Ain defla
183	<i>Spunta</i>	Juin. 2014	Ain defla
184	<i>Désirée</i>	Juin. 2014	Chlef (Mejaja)
185	<i>Spunta</i>	Juin. 2014	Chlef (Mejaja)
186	<i>Spunta</i>	Juin. 2014	Chlef (Mejaja)
187	<i>Kondor</i>	Juin. 2014	Chlef (Mejaja)
188	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Chlef
189	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain Defla
190	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Chlef
191	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla (Arib)
192	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla
193	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla
194	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla
195	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla
196	<i>Désirée</i>	Juil. 2014	Ain defla
197	<i>Spunta</i>	Juil. 2014	Ain defla
198	<i>Spunta</i>	Sept. 2014	Ain defla (Amra)
199	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla
200	<i>Désirée</i>	Oct. 2014	Chlef (Mejaja)
201	<i>Desirée</i>	Oct. 2014	Chlef (Mejaja)
202	<i>Desirée</i>	Oct. 2014	Chlef (Mejaja)

Tableau 23 (Suite 5)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
203	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
204	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
205	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
206	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
207	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
208	<i>Spunta</i>	Oct. 2014	Ain defla (Abadia)
209	<i>Spunta</i>	Janv. 2015	Chlef (Boukadir)
210	<i>Spunta</i>	Fèvr. 2015	Ain defla (Ataf)
211	<i>Spunta</i>	Mars. 2015	Ain defla (Abadia)
212	<i>Spunta</i>	Mars. 2015	Chlef (Karimia)
213	<i>Kondor</i>	Mars. 2015	Ain defla
214	<i>Spunta</i>	Mars. 2015	Ain defla
215	<i>Spunta</i>	Mars. 2015	Ain defla
216	<i>Spunta</i>	Mars. 2015	Ain defla
217	<i>Spunta</i>	Mai. 2015	Ain defla (Arib)
218	<i>Kondor</i>	Juil. 2015	Chlef (Mwafkia)
219	<i>Desirée</i>	Juil. 2015	Ain defla
220	<i>Kondor</i>	Juil. 2015	Ain defla
221	<i>Spunta</i>	Juil. 2015	Ain defla
222	<i>Kondor</i>	Aout. 2015	Relizane (Hmadna)
223	<i>Spunta</i>	Aout. 2015	Relizane (Hmadna)
224	<i>Kondor</i>	Aout. 2015	Relizane (Hmadna)
225	<i>Spunta</i>	Aout. 2015	Relizane (Hmadna)
226	<i>Désirée</i>	Aout. 2015	Relizane (Hmadna)
227	<i>Désirée</i>	Aout. 2015	Tiaret
228	<i>Désirée</i>	Sept. 2015	Tiaret
229	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
230	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Chlef (Oued sli)
231	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Ain defla (Djelida)
232	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Ain defla (Beni rached)
233	<i>Désirée</i>	Sept. 2015	Tiaret
234	<i>Kondor</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
235	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
236	<i>Desirée</i>	Sept. 2015	Tiaret
237	<i>Kondor</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
238	<i>Kondor</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
239	<i>Spunta</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
240	<i>Desirée</i>	Sept. 2015	Relizane (Hmadna)
241	<i>Kondor</i>	Oct. 2015	Chlef (Boukadir)

Tableau 23 (Suite 6)

Echantillon	Cultivar	Date d'échantillonnage	Lieu d'échantillonnage
242	<i>Spunta</i>	Oct. 2015	Ain defla (Dawia)
243	<i>Desirée</i>	Oct. 2015	Mostaganem (Debdaba)
244	<i>Spunta</i>	Nov. 2015	Chlef (Karimia)
245	<i>Spunta</i>	Nov. 2015	Chlef (Zebouja)
246	<i>Spunta</i>	Nov. 2015	Relizane (Oued Djem3a)
247	<i>Spunta</i>	Janv. 2016	Tiaret

Annexes

Tableau 24 : Mesure des poids de pourritures des tubercules de pomme de terre pour les variétés *Spunta* et *Fabula*.

souche	Poids de pourritures Var- <i>Spunta</i>				Poids de pourritures Var- <i>Fabula</i>			
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moy	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Moy
HNA 1	11,08	18,4	5,94	11.8abc	5,6	5,39	2,55	4.5abc
HNA 2	21,33	25,33	23,64	23.4ab	4,34	9,54	5,89	6.6abc
HNA 3	28,3	13,87	22,68	21.6abc	16,62	13,63	12,08	14.1a
HNA 4	4,72	6,76		5.7bc	5,58	3,62	2,08	3.8c
HNA 5	18,75	17,66	26,44	21abc	3,32	5,91	4,27	4.5abc
HNA6	16,39	14,22	22,79	17.8abc	4,63	9,35	4,65	6.2abc
HNA 8	24,81	17,04	32,54	24.8ab	4,69	9,03	5,05	6.3abc
HNA 9	9,52	17,53	25,97	17.7abc	4,15	3,97	5,52	4.5abc
HNA 11	26,59	27,95	32,82	29.1a	8,96	6,84	5,55	7.1abc
HNA 12	25,3	26,62		26ab	9,76	4,43	27,17	13.8ab
HNA 13	31,16	38,97	21,5	30.5a	3,29	11,4	6,06	6.9abc
HNA 15	26,88	23,81	15,96	22.2abc	4,68	3,3	5,12	4.4abc
HNA 17	20,58	35,41	16,74	24.2ab	9,73	9,33	8,54	9.2abc
HNA 18	7,69	3,47	2,26	4.5c	4,3	4,83	4,33	4.5abc
HNA19	11,85	9,34	8,93	10bc	4,51	3,98	2,2	3.6c
HNA 20	20,95	25,52		23.2abc	6,18	8,86	9,3	8.1abc
HNA 21	4,34	10,52	14,91	9.9bc	2,74	4,8	4,45	4bc
HNA22	15,29	11,37	18,69	15.1abc	2,34	4,19	5,44	4bc
HNA24	30,25	5,96	11,83	16abc	10,72	9,09	5,63	8.5abc
HNA26	9,32	13,56	15,24	12.7abc	4,71	5,28	2,09	4bc
HNA27	8,36	6,45	10,21	8.3bc	2,5	1,02	3,4	2.3c



Figure 24 : Résultats du test d'hypersensibilité sur feuilles de tabac

Annexe IV

Milieux de cultures utilisés

La plupart des milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave, à une température de 120°C pendant 20 minutes.

1. Milieu King B ; pH 7.2

Composition	Par litre
Peptone	20 g
K ₂ HPO ₄	1.145 g
MgSO ₄	1.5 g
Glycérol	15 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

2 .Milieu gélose nutritive (GN)

Composition	Par litre
Agar nutritive	13.00 g
Agar	15.00 g
Eau distillée	1000 ml

3. Milieux Luria Bertani ; pH 7.2

Composition	Par litre
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

4. Milieu crystal violet pectate (CVP) :

Composition	Par litre
Mélange A	
CaCl ₂ , 2H ₂ O (10%)	1 g
Tryptone	5 g
Tri-sodium citrate	2 g
NaNO ₃	2 g
Crystal Violet (0,075%)	2 ml
Agar	4 g
Eau distillée	500 ml
Mélange B	
NaOH (5M)	2 ml
Pectine	18 g
Eau distillée	500 ml

Autoclaver le mix A et le mix B pendant 15 min à 120°C (restaurer progressivement la pression afin d'éviter la formation de bulle dans le milieu). Verser le Mix A dans le Mix B sous agitation afin de les mélanger, ajuster le pH à 7,0. Puis couler le mélange dans des boîtes de Pétri (18 ml / boîte de Pétri).

5. Milieu de Sucrose medium ; pH 7.3

Composition	Par litre
Sucrose	40 g
Peptone	10 g
Extrait de bœuf	5 g
Eau distillée	1000 ml

6. Réactif de Benedict

Composition	Par litre
Citrate de Na (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	173 g
Carbonate de Na (Na ₂ CO ₃)	85.5 g
Sulfate de Cu (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	17.3 g
Eau distillée	1000 ml

7. Milieu d'Indole ; pH 7.4

Composition	Par litre
Tryptone (Oxoid, L42)	10.0 g
L-tryptophan	1.0 g
Eau distillée	1000 ml

8. Réactif de Kovacs

Composition	Par litre
Paradiméthylamino-benzaldéhyde	50 g
Alcool isoamylique	750 ml
HCl concentré	250 ml

9. Milieu de NaCl à 5%

Composition	Par litre
Bacto peptone (Oxoid, L37) NaCl	10.0 g
NaCl	50.0 g
Eau distillée	1000 ml

10. Milieux Hugh et Leifson ; pH (6.8 – 7)

Composition	Par litre
Tryptone	2 g
Extrait de levure	1 g
NaCl	5 g
Bleu de Bromothymol	0.03 g
Glucose	10 g
Agar	3 g
Eau distillée	1000 ml

Après autoclavage à une température $\geq 121^{\circ}\text{C}$ pendant environ 20 minutes, le milieu est laissé à refroidir suffisamment pour pouvoir le répartir en tubes.

11. Milieu pectinase

Composition	Par litre
PGA	5 g
NaNo ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KCl	1 g
MgSo ₄	0.5 g
Extrait de levure	0.5 g
Glucose	1 g
NaCl	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

12. Milieu CMCase

Composition	Par litre
CMC	5 g
NaNo ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Kcl	1 g
MgSo ₄	0,5 g
Extrait de levure	0,5 g
Glucose	1 g
Nacl	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

Annexe V

Identification moléculaire

1. Tampon TAE 10X (Tris Acétate EDTA) pour un volume final de 1 litre

Composition	Par litre
Tris à 400mM	48.46 g/l
Acide acétique	12.01 g/l
EDTA à 10mM	3.72 g/l

Dissoudre les différents composés chimiques dans 1 litre d'eau distillée. La solution est 10 fois concentrée (10X).

2. Extraction de l'ADN chromosomique

Pour l'extraction de l'ADN, les isolats bactériens ont été cultivés dans un bouillon de LB et incubés pendant une nuit à 27 ± 1 ° C en agitation (130 tr / min).

L'ADN a été extrait en utilisant le kit (kits d'ADN génomique bactérien GenElute, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), en suivant les instructions du fabricant. L'ADN extrait est ensuite récupéré, et stocké à -20° C.

3. Protocole d'extraction de l'ADN à l'aide du GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, France)

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'une cinquantaine de spores. Le kit de purification de l'ADN "DNeasy Plant Mini Kit" a été adapté aux champignons et l'extraction de l'ADN comporte les étapes suivantes:

3.1. Préparation des réactifs du kit d'extraction

a. Mélange des réactifs

- Examiner les réactifs. Si certains forment un précipité, les réchauffer entre 55 et 65°C jusqu'à dissolution et les ramener à la température de la pièce avant de les utiliser.

b. Dilution du concentré de solution de lavage

- Diluer le concentré dans 80 ml (pack de 70 préparations) d'éthanol à 95-100%.
- Après chaque utilisation, bien refermer la solution diluée pour éviter l'évaporation de l'éthanol.

c. Reconstitution de la protéinase K

- Dissoudre la poudre dans 0.5ml d'eau (pack 70 préparations) pour obtenir une solution à 20 mg/ml.
- La solution peut être conservée quelques jours entre 2 et 8°C. Pour une conservation plus longue, elle doit être stockée à -20°C.

d. Préparation de la solution de lysozyme (à réaliser le jour de la préparation)

- Pour chaque échantillon, 200µl de solution de lysozyme sont nécessaires. Prévoir une marge pour les erreurs de pipetage.
- Préparer 2.115x10⁶ unité/ml de la solution de stockage de lysozyme (L7651) en utilisant la solution de lyse gram positif (L7539) comme diluant.
- Dissoudre le lysozyme en pipetant ou en vortexant le mélange.

3.2. Premières étapes de l'extraction d'ADN des bactéries à Gram négatif

a. Préchauffer un bain-marie ou une étuve à 55°C.

b. Recueil des cellules

- Centrifuger 1.5 ml de culot d'une culture overnight de bactéries à 12000-16000g (16400 rpm) pendant 2 min.
- Eliminer le surnageant.

c. Suspension des cellules

- Mettre les cellules en suspension dans 180 µl de solution de lyse T.

d. Traitement optionnel par RNase A

- Ajouter 20µl de la solution de RNase A (R6148).
- Mélanger et incuber à température ambiante pendant 2 min.

e. Préparation de la lyse des cellules

- Ajouter 20µl de la solution de protéinase K dans l'échantillon.
- Mélanger et incuber à 55°C pendant 30 min.

f. Lyse des cellules

- Ajouter 200µl de la solution de lyse C (B8803).
- Vortexer complètement environ 15 sec (un mélange homogène est essentiel pour une lyse efficace).
- Incuber à 55°C pendant 10 min.

g. Préparation de la colonne

- Ajouter 500µl de la solution de préparation de la colonne dans chaque colonne pré-assemblée (bague rouge), positionnée dans un tube à récolte de 2ml.
- Centrifuger à 12000g (13500 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer le surnageant mais conserver le tube à récolte.

h. Préparation du liant

- Ajouter 200µl d'éthanol à 95-100% au lysat.
- Vortexer 5 à 10 sec (une bonne homogénéité est importante).

i. Chargement du lysat

- Transférer la totalité du tube dans la colonne (utiliser une pipette à large embout pour éviter que l'ADN ne se déchire).
- Centrifuger à plus de 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer l'ancien tube de récolte qui contient le surnageant et placer la colonne dans un nouveau tube à récolte.

j. Premier lavage

- Ajouter 500µl de la solution de lavage 1 (W0263) dans la colonne.
- Centrifuger à plus de 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer à nouveau la colonne dans un nouveau tube à récolte.

k. Second lavage

- Ajouter 500µl de solution de lavage dans la colonne.
- Centrifuger à vitesse maximale (16400 rpm) pendant 3 min pour sécher la colonne.
- Vérifier que la colonne ne contienne pas d'éthanol avec de faire l'éluion de l'ADN (Si de l'éthanol est encore visible, centrifuger à vitesse maximale pendant 1 min supplémentaire en vidant et ré-utilisant le tube à récolte).
- Eliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer la colonne dans un nouveau tube à récolte.

l. Elution de l'ADN

- Pipeter 200µl de la solution d'éluion (B6803) directement sur le centre la colonne (pour augmenter l'efficacité, incubé 5 min à température ambiante).
- Centrifuger à au moins 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- L'éluât contient l'ADN génomique pur. Pour une conservation à court terme, stocker à 2-8°C. Pour une conservation plus longue, il est recommandé de stocker à -20°C.

4. Mesure de la concentration de l'ADN

La méthode décrite par Sambrook et *al.* (2000) a été utilisée pour mesurer la concentration de l'ADN isolé à l'aide d'un spectrophotomètre UV / VIS OPTIZEN.

Pour cela, l'absorbance des échantillons d'ADN extrait dilué au 1/10ème, est alors déterminée à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50µg d'ADN par µl.

La concentration d'ADN est déterminée par la formule suivante :

Concentration d'ADN (µg / ml) à 260 nm = Absorbance à O.D 260 nm x facteur de dilution x 50 µg/µl 1000 (Hoisington *et al.*, 1994).