HAL
open science

Écologie de Pseudomonas syringae dans un bassin versant : vers un modèle de transfert : des habitats naturels aux agro-systèmes

Caroline Monteil

To cite this version:

Caroline Monteil. Écologie de Pseudomonas syringae dans un bassin versant : vers un modèle de transfert : des habitats naturels aux agro-systèmes. Sciences de la Terre. Université d'Avignon, 2011. Français. NNT : 2011AVIG0046 . tel-00916593

HAL Id: tel-00916593

https://theses.hal.science/tel-00916593v1

Submitted on 10 Dec 2013

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

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

UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DU VAUCLUSE

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON

Ecole doctorale SIBAGHE

Présentée par

Caroline MONTEIL

Écologie de *Pseudomonas syringae* dans un bassin versant :

Vers un modèle de transfert

Des habitats naturels aux agro-systèmes.

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011

Jury

I. Sache	CR, INRA Grignon	Rapporteur
T. Vogel	PR, École Centrale, Lyon	Rapporteur
M. Troussellier	DR, CNRS Montpellier	Examinateur
D.C. Sands	PR, Université de l'état du Montana, USA	Examinateur
P. Roumagnac	CR, CIRAD Montpellier	Examinateur
C.E. Morris	DR, INRA Avignon	Directrice de Thèse
F. Lafolie	CR, INRA Avignon	Co-directeur de thèse

RÉSUMÉ

Écologie de *Pseudomonas syringae* dans un bassin versant : Vers un modèle de transfert des habitats naturels aux agro-systèmes.

Caractériser la dissémination des bio-agresseurs est un enjeu majeur pour la gestion et la prédiction des maladies en santé des plantes. Face aux limites des approches usuelles en pathologie végétale, une nouvelle vision a été proposée abordant les paradigmes d'histoire de vie des agents phytopathogènes en dehors des limites du système hôte-pathogène. Parmi ces agents phytopathogènes, les études sur *P. syringae* sont celles qui ont contribuées le plus à ce nouveau courant de pensée et dont on connaît le mieux l'histoire de vie en relation avec ses réservoirs « non hôtes ». L'espèce est détectée dans de nombreux compartiments du cycle de l'eau, des précipitations jusqu'aux rivières et eaux d'irrigation, en passant par les plantes sauvages et le manteau neigeux. L'ensemble de ces observations ont soulevé de nouvelles questions sur la manière dont *P. syringae* se dissémine au travers de ces environnements et sur les processus impactant sur la dynamique des populations à l'échelle d'un bassin versant. Ces recherches se sont donc intéressées à ses processus dans des précipitations jusqu'aux cours d'eau alpins dans l'optique d'acquérir des données pour la modélisation des flux de *P. syringae*. Elles ont mis en évidence les populations résidentes de la litière et la survie sa survie dans le sol, processus jamais identifiés à l'histoire de vie de *P. syringae*. Elles ont également caractérisé (i) les conditions propices à son transport via les précipitations, (ii) le rôle du manteau neigeux comme réservoir et protecteur des populations des prairies alpines et (iii) ont mis en évidence la chimie de l'eau comme indicateur témoin de la dynamique des populations des les rivières. Ces observations suggérant un transport de *P. syringae* dans le sol, nous l'avons quantifiée à travers des études de terrain et des simulations en laboratoire. Enfin, l'ensemble des données de ces recherches couplées à des outils SIG et des modèles météorologiques et hydrologiques ont permis de proposé un modèle sur les flux de *P. syringae* des habitats naturels vers les agro-systèmes.

Mots clés : *P. syringae*, bactérie phytopathogène, hydroécologie, modélisation, dissémination, dynamique des populations, atmosphère, sol, cours d'eau, manteau neigeux, précipitations.

ABSTRACT

The ecology of *Pseudomonas syringae* in watersheds: Towards a model of transfer from natural habitats to agrosystems

The characterization of the spread of bio-agressors spread is a major issue for the management of plant health and the prediction of disease emergence. Given the limitations of conventional approaches in plant pathology, a new vision has been proposed addressing paradigms life history of plant pathogens outside the limits of the crop host-pathogen system. Among the plant pathogens, studies on *P. syringae* are those that have contributed the most to this new way of thought for which life history in relation to "non host" reservoirs has been highlighted. The species is found in many compartments of the water cycle, from precipitation to rivers and irrigation water, wild plants and snowpack. All these observations have raised new questions about how *P. syringae* spreads through these environments and on the processes impacting population dynamics at the scale of a watershed. This research was therefore interested in these processes with the objective to acquire data for modeling the tranfer of *P. syringae* through the watershed. They highlighted the resident populations of litter and their survival in the soil, processes never identified in association with the life history of *P. syringae*. They also revealed (i) the conditions for transport via precipitations, (ii) the role of snowpack as a reservoir and protector of the populations in alpine meadows and (iii) showed that water chemistry can be used as an indicator of the population dynamics in headwaters. These observations suggested a transport of *P. syringae* via the soil that we subsequently characterized through field studies and laboratory simulations. Finally, all data from this research combined with GIS tools and meteorological and hydrological models have permitted us to propose a model of the flux of *P. syringae* of natural habitats to agricultural systems.

Key words: *P. syringae*, plant pathogenic bacteria, hydroecology, modelling, dissemination, population dynamics, atmosphere, soil, streams, snowpack, precipitations.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Monteil, C.L., Bardin, M., and Morris, C.E. Occurrence of *Pseudomonas syringae* in rain and snowfall is markedly influenced by the origin, temperature and the incident solar radiation of the associated air masses. Submitted to *Biogesosciences* (Chapitre II)

Monteil, C.L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., Soubeyrand, S., and Morris, C.E. Leaf litter in alpine prairies is a reservoir of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* contributing to its dynamics in snowpack. Accepted with revision for *Environmental Microbiology* (Chapitre I)

Demba Diallo, M., **Monteil, C.L.,** Vinatzer, B.A., Clarke, C., Glaux, C., Guilbaud, C., Desbiez, C., and Morris, C.E. *Pseudomonas syringae* naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in non agricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic. Accepted with revision for *ISME Journal* (Annexe)

PRIX

Lauréate Bourse de recherche Dufrenoy en 2010. Ces bourses sont attribuées par l'Académie d'agriculture de France à des jeunes chercheurs conformément au Legs Jean et Marie-Louise Dufrenoy. Huit doctorants au sein des laboratoires Inra ont été distingués en 2010.

COMMUNICATIONS

Morris, C.E., **Monteil, C.L.** (2011) Occurrence of the ice nucleation active bacterium *Pseudomonas syringae* in precipitation is linked to air mass properties and their trajectories. International Union of Geodesy and Geophysics (IUGG) General Assembly; 2011/06/28-2011/07/07; Melbourne (AUS). Monash University, School of Geosciences, Melbourne (AUS) Earth on the edge: science for a sustainable planet. 2011. 1 p. (Communication orale)

Berge, O., **Monteil, C.L.**, Glaux, C., Guilbaud, C., Morris, C.E. (2011) Biodiversité microbienne dans les cours d'eau du bassin de la Durance : conséquences de la présence de bactéries phytopathogènes dans les biofilms. Colloque international "Usages écologiques, économiques et sociaux de l'eau agricole en Méditerranée : quels enjeux pour quels services?" ; Marseille, France, 2011/01/20-21 (Poster)

Berge, O., **Monteil, C.L.**, Glaux, C., Guilbaud, C., Leyronas, C., Moudjahidou, D.D., Rimet, F., and Morris, C.E. (2010) Evolution du pouvoir pathogène d'une bactérie phytopathogène en dehors de zones agricoles. Impact des biofilms aquatiques sur la structure des populations de *Pseudomonas syringae*. Ecologie 2010, Montpellier, France, 2010/09/2-4. (Poster)

Monteil, C.L., Glaux, C., Guilbaud, C., Pasquier, A., Lafolie, F., and Morris, C.E. (2010). Impact of snowmelt on the population structure of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in an alpine hydrological system.13th international symposium on microbial ecology, Seattle, USA, 2010/08/22-27 (Poster)

Monteil, C.L., Guilbaud, C., Glaux, C., Lafolie, F., and Morris, C.E. (2010). Population dynamics of *Pseudomonas syringae* in leaf litter and snowpack in the southern French Alps. 9th International Symposium on the Microbiology of Aerial Plant Surfaces, Corvallis, USA, 2010/08/15-18. (Communication orale)

Monteil, C.L., Glaux, C., Pasquier, A., Lafolie, F., Morris, C.E. (2010). Impact of snowmelt on the population structure of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in an alpine hydrological system. 8. International conference; Pseudomonas syringae and related pathogens. 2010/08/31-2010/09/03; Oxford (GBR). (Poster)

Monteil, C.L., Pasquier, A., Lafolie, F., Morris, C.E. (2010). Impact du transfert de l'eau de fonte du manteau neigeux sur l'abondance et la diversité de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* dans un système hydrologique alpin. 9èmes rencontres Plantes-Bactéries, Aussois, France, 2010/01/18-22. (Poster)

Monteil, C.L., Lafolie, F., Morris, C.E. (2009). Dynamique temporelle de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* dans le manteau neigeux et les l'eau de fonte des Alpes du Sud. 4ème congrès national de l'AFEM, Lyon, France, 2009/08/30-09/02. (Communication orale)

REMERCIEMENTS

Il est venu le temps du bilan…

Je me souviens de ce 21 juin 2008 où je suis montée à Paris pour défendre ma candidature. Trois ans se sont écoulés, et pourtant c'est comme si c'était hier… Ce jour là on m'a demandé si je me sentais capable de réaliser une thèse et si mon objectif était de devenir chercheur. J'ai dis oui. Cependant, même si vous en êtes intimement convaincu(e), je crois qu'on ne peut jamais vraiment honnêtement répondre à cette question tant que l'on n'est pas arrivé à ce fameux soir où, un mojito[1] à la main, on fête sa soutenance…

La thèse est une réelle et profonde expérience professionnelle, mais aussi humaine, qui nous fait beaucoup grandir en très peu de temps. Elle demande un engagement physique, moral, et constitue une réelle épreuve pour quiconque décide de s'y aventurer. Cette fameuse incompréhension et décalage que ressent le jeune chercheur en devenir, face à ses amis d'enfance et son entourage, n'est pas un mythe : pendant plusieurs mois, nous vivons bien sur une autre planète. Nous nous levons en pensant « échantillonnage, analyse multivariée, rédaction », nous mangeons en parlant de « séquençage, rétro-trajectoires », nous refaisons nos prélèvements ou nos manips dans nos rêves, et nous finissons même par faire des blagues sur un test du Chi^2... Mais je crois que rares sont les personnes à avoir tenté l'expérience qui ont regretté un jour d'avoir fait le pas. Je l'ai fais et je ne le regrette vraiment pas.

Faire une thèse c'est décider de partir pour un long voyage en ne connaissant que la destination mais pas la manière d'y arriver. Tout ce que l'on a pour bagage est une profonde motivation d'arriver à bon port et de s'enrichir intellectuellement et humainement. Durant ce voyage on choisit petit à petit les chemins à prendre. Parfois on se trompe et on en reprend d'autres. Petit à petit, sans qu'on s'en aperçoive, on avance. On rencontre des gens qui nous soutiennent et qui parfois, décident de faire un bout de chemin avec nous. Tout le long de l'aventure, on aura pensé et appris à penser.

En ce sens je pense que j'ai entrepris un vrai voyage, une vraie thèse. Et pour cela, je ne remercierai jamais assez Cindy Morris. Je n'ai pas juste produit des données ; j'étais un réel chercheur en formation. J'ai pensé et appris à penser. Au départ, quand nous nous sommes lancées, nous avions une question. Maintenant nous en avons bien plus encore. Nous avions un objectif, mais la stratégie pour l'atteindre n'était pas encore définie. J'avais des gens pour m'aider, mais j'étais complètement autonome. La thèse s'est construit mois après mois, rencontre après rencontre, et résultat après résultat. Cindy m'a laissé penser, imaginer, construire, et projeter par moi-même mais sans jamais me laisser seule. Ce qui est présenté ici est je pense, un travail sincère, humble et passionné. C'est le fruit de multiples collaborations aussi variées qu'enrichissantes avec toutes les personnes qui ont décidé de faire un bout du voyage avec moi. Certes à mes yeux, il reste largement imparfait, mais ce n'est seulement parce que je ne regarde jamais ce qui a été accompli, mais toujours ce qu'il reste à faire (et il reste tellement de choses à faire…).

Je me souviens de ce fameux repas lors des rencontres doctorants SPE à Dijon où l'on me demanda «*pourquoi as tu choisi ce sujet de fou ?* ». Un peu grisée par un bon Bourgogne[2], j'ai répondu « *peut-être parce que je le suis aussi* ». J'ai aimé la marginalité de ce sujet et le défi qu'il relevait, même si il était et reste parfois difficile à porter au jour le jour. D'abord il demande un effort très important d'ouverture sur plusieurs disciplines, puis il doit être en permanence défendu car souvent mal compris. Mais j'ai entendu dire que les idées incomprises étaient celles d'avant-garde. Lorsqu'elles sont acceptées, elles deviennent moins intéressantes car elles n'ont plus un temps d'avance. Je tiens à remercier Olivier Le Gall, chef du département Santé des Plantes et Environnement de l'INRA, pour avoir cru en ce

[1] Dans un grand verre, piler quelques morceaux de citron vert et quelques feuilles de menthe, puis couvrir de sucre roux et de glaçons, remplir de moitié avec un bon rhum blanc Trois Rivières puis de San Pellegrino. Planter une paille. Déguster.

[2] Un petit Mercurey 2008… Mais mon cœur appartient toujours à ce fameux Collioure des Pyrénées Orientales

projet et de nous m'avoir donné l'opportunité de travailler avec Cindy sur un sujet aussi exceptionnel et enrichissant que celui-ci. Par la même occasion, je le remercie également d'encourager les rencontres et les échanges entre doctorants du département.

Parfois je me dis qu'il y a des hasards qui n'en sont pas. Je n'aurais pas imaginé avoir un autre directeur de thèse que Cindy. Notre relation est un peu à l'image du sujet : originale. J'ai appris beaucoup avec elle, et j'ai beaucoup reçu. J'espère que nous continuerons bien après. Je suis admirative de cette force qu'elle a de toujours croire en ses convictions et ses idées même dans les moments les plus difficiles. Je ne sais pas si les gens qui la côtoient s'en rendent compte, mais elle nous pousse dans nos retranchements pour faire sortir le meilleur de nous-même. Elle nous encourage à faire des choses que l'on n'aurait pas faites tout seul.

Maintenant, je voudrais remercier toutes les autres personnes avec qui j'ai fait un bout de chemin. Comme Boris Vinatzer de Virginia Tech (USA) dont j'apprécie énormément nos échanges et nos projets, m'a dit un jour : « *la recherche sans collaboration ne serait pas forcément moins productive, mais elle serait terriblement plus ennuyeuse* ». Je le rejoindrais totalement sur ce point là. Pendant ces trois années, j'ai travaillé avec des techniciens, des thésards, des chercheurs et des responsables des remontées mécaniques de stations de ski. Ils étaient écologues alpins, physiciens, chimistes, hydrogéologues, statisticiens, informaticiens ou encore spécialistes en pathologie végétale et écologie microbienne. Tous m'ont aidé à faire avancer le sujet.

Je commencerai par mon co-directeur de thèse François Lafolie qui a pris un menu plaisir à me taquiner pendant toutes ces sorties sur le terrain ! François m'a accompagné pour les prélèvements de neige, d'eau et de sol. Il a participé à la construction du protocole d'échantillonnage et a fait les carottages dans le sol. Il a également mis en place le dispositif d'étude de transfert de *P. syringae* à travers les colonnes de sable et celui de simulation de pluie sur colonne de sol. Nous avons passé d'excellents moments sur le terrain à parler de montagne, de fromage, de cycle d'eau et de dissémination de *P. syringae*. Il paraît que je râlais beaucoup pendant les 2h de montée à 600m de dénivelé, mais aussi au labo, alors je le remercie d'avoir supporté ma « douce » voix pendant tout ce temps.

Je suis particulièrement heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec Samuel Soubeyrand de l'unité BioSP de l'INRA d'Avignon. En plus de m'avoir proposé un outil pour comparer la diversité phénotypique de mes échantillons, il m'a réconforté dans l'idée que si on le désire et si on travaille, on peut petit à petit se former à la modélisation et au logiciel R. Il a été disponible dès notre première rencontre pour m'indiquer la route à suivre, et a pris le temps de bien comprendre mes attentes. Son ouverture m'encourage à croire que les échanges entre mathématiciens et biologistes sont vraiment nécessaires et j'espère que dans l'avenir, nous relèverons d'autres défis ensemble.

Merci également à Michel Moulery et Ghislain Géniaux d'ECODEV. J'ai adoré travaillé avec eux. Eux aussi ont pris le temps de s'intéresser à nos questions loin de leur domaine d'application. Grâce à eux, je me suis rendue compte de toutes les potentialités qu'offrent les outils SIG et les bases de données spatiales, mais aussi comment on peut explorer différemment ses propres données. Je me suis régalée à tracer mes rétro-trajectoires en buvant leur fameux déca préparé avec soin.

En fait, je me rends compte que j'ai goûté au café de beaucoup de labos ! Combien de fois Roland Simler et ses collègues m'en ont préparé un au LHA d'Avignon quand j'apportais mes échantillons... Roland a fait l'analyse des anions, des cations et des TOC de tous mes échantillons et je l'en remercie. L'équipe des hydrogéologues composée d'Yves Travi, de Vincent Marc et Christophe Emblanch, a également été présente dans cette aventure pour répondre aux questions que je pouvais me poser en hydrogéologie. A travers les premiers résultats de cette thèse, j'espère que nous irons un peu plus loin dans les échanges avec eux. Je suis d'ailleurs très contente que nous continuions à collaborer à travers l'étude sur la microbiologie des nappes d'Avignon conduite par Odile Berge.

Odile… Qu'aurait été ces trois ans sans elle ! Nous sommes arrivées à peu près en même temps dans le laboratoire. Nous avons partagé énormément de choses : les sorties sur le terrain, les réflexions sur nos projets et ceux futurs dans le petit bureau, nos rigolades. C'est grâce à Odile que je me suis rendue compte combien la diversité

était importante au sein même d'un laboratoire. Elle m'a montré beaucoup de papiers intéressants que je n'aurais peut être pas trouvé seule. Elle m'a amené à réfléchir d'une manière différente sur certains points scientifiques et d'autres plus personnels. Elle a enrichi mon travail et mon esprit à travers nos discussions. Sa bonne humeur a toujours été d'un grand réconfort surtout à la station Joseph Fourier cette fameuse semaine de novembre 2009. En fait, j'ai réellement eu de la chance de travailler su sein de cette équipe. J'ai été portée et supportée autant d'un point de vue technique que personnel par nos deux techniciennes « de choc » : Catherine Glaux et Caroline Guilbaud. Catherine a phénotypé beaucoup de mes souches, ce qui a été un travail long et répétitif. Caroline a pris la charge de faire quasiment toutes les rep-PCR et je peux vous dire qu'il en faut de la patience ! C'est une satisfaction pour quelqu'un de ma petite expérience, que d'avoir pu travailler d'égal à égal avec elles. Je ne me suis jamais sentie mal à l'aise et je garde un très bon souvenir de nos moments passés ensemble au labo. J'ai aussi une pensée pour Pierre Amato et Moud Demba Diallo de passage au laboratoire pendant plusieurs mois et que je me suis régalée à taquiner tous les matins. Merci à Jimmy Laurent et Adrien Pasquier, les deux stagiaires que j'ai encadré et qui ont fourni énormément de travail sur l'estimation du transfert de *P. syringae* dans le sol et pour le phénotypage des souches de l'eau.

Cette année notre équipe fusionne avec l'équipe de mycologie de l'étage d'en dessous. Cela annonce le début d'une nouvelle ère ! Je suis très contente d'avoir pu travailler avec Marc Bardin et *B. cinerea*. Je suis fière que nous ayons eu l'occasion de soumettre ensemble dans le cadre de la thèse. Nous avons tellement de recherches intéressantes à mener avec nos modèles ! Je compte bien à ce que nous les réaliserons dans un futur proche.

Je voudrais également remercier chaleureusement Daniel Granier et Gilbert de la station de ski de Super Sauze que j'ai formé à la collecte des échantillons de précipitations et qui ont fait preuve d'un enthousiasme et d'une aide précieuse. J'ai toujours été très bien accueilli par toute l'équipe là-haut. Je me souviendrai toujours de ces moments de la « team » au QG dixit *Le Trappeur*, où je tentais d'expliquer clairement mon sujet de thèse et pourquoi il ne fallait pas aller sur le site de prélèvement… Merci à eux d'avoir partagé leurs connaissances et leur temps pour *P. syringae*. Le métier de chercheur ne serait pas totalement intéressant si on ne pouvait pas le partager avec les autres.

En fait, travailler avec d'autres corps de métier enrichi vraiment notre travail. J'ai particulièrement aimé de travailler avec Jean Marc Bastien, technicien de l'unité, avec qui nous avons tenté de monter une enceinte pour reproduire le transfert ascendant des bactéries dans la neige. Nous n'avons pas réussi à reproduire la forte inertie du manteau neigeux, mais cela a été un vrai plaisir d'imaginer ce protocole ensemble, et d'avoir mis au point le suivant pour la future étude de la survie de *P. syringae* dans l'eau en conditions contrôlées.

Un des aspects importants de cette thèse concerne le sol. Je remercie Jonathan Lochet et son directeur de thèse Jean Christophe Clément de nous avoir donné la possibilité d'explorer ce compartiment avec leur dispositif sur la station alpine Joseph Fourier. Nous avons pu également profiter des installations pour construire les mesocosmes de neige et prélever des précipitations. Ce fut particulièrement instructif et agréable de travailler avec eux.

Merci à Jérôme Labille du CEREGE à Aix en Provence d'avoir accepté que j'utilise le matériel pour faire nos mesures de potentiel zêta et d'avoir pris le temps de me former. Merci aux membres de mon comité de thèse composé de Hans Werner Jacobi, Frédéric Fabre, Patrick Andrieux, Brigitte Brunel et Alain Brauman, pour leurs conseils avisés. J'ai aussi une pensée pour les météorologues, chimistes et physiciens de la neige que j'ai pu rencontrer : Florent Dominé, Samuel Morin, Matthieu Barret du LGGE de Grenoble et Matthieu Lafaysse du LTHE.

Mes remerciements vont également à tout ceux qui m'on accompagné sur le terrain comme Eric Michel, Benjamin Allegrini, Alain Buffière, et Annette Bérard, et tous ceux qui m'ont accompagné dans ma vie de thésard en général. Je pense d'abord à l'équipe de Volley « Les dépoutrailleurs », mais également à Hana, Jonathan et Inès qui m'ont soutenu dans les moments difficiles, à Gregory et Magali, Florian et Morgane, Isabelle et Christel, Julie et Baptiste. Je me souviendrai toujours du petit groupe de midi à la cafet avec qui j'ai échangé rigolades, recettes et taquineries. Merci à Pascale et Patrick pour leurs

petits gestes, leur soutien et leur bonne humeur. La vie en patho1 n'aurait pas été la même sans eux. Je pense aussi à Claudine dont le travail sans faille m'a toujours facilité la vie, et à tous ceux du centre que je n'ai pas citer.

Je ne pourrais finir sans une pensée particulière pour mes copains doctorants du département SPE que j'ai rencontré ce fameux mois de juin 2011 à Dijon : Stella, Emilie, Alban, Adrien et Fabrice. Ils sont exceptionnels, passionnés, talentueux et plein d'avenir. J'ai découvert en eux des vrais amis de cœur et d'esprit, des gens avec qui parler de Science mais également avec qui je peux jouir des petits bonheurs simples de la vie. Merci à eux d'exister et de m'avoir montré que je n'étais pas toute seule à venir d'une autre planète. Merci à mes copains du LSTM également pour tous les moments passés à Aussois. Merci à Guillaume, Clément et Vicky pour nos très bonnes soirées à Seattle et Corvallis.

Enfin, je remercie ma famille de s'être tant investie pour que je puisse réaliser ce défi. Ils ne m'ont pas souvent vu pendant trois ans et ils ont toujours essayé de m'aider par tous les moyens. Merci à mes amis Sarah, Marie-Jo, Thierry, Muriel et Mouette pour leur soutien. Eux aussi ont compris que si j'avais pris de la distance, c'était pour mieux les retrouver.

PRÉAMBULE

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un contrat d'Attaché Scientifique Contractuel (ASC) avec l'INRA. Plusieurs contrats de ce type ont été ouverts en 2008 par la Direction générale de l'INRA afin de renforcer les capacités de recherche de l'institut sur l'approche intégrée et prédictives des systèmes biologiques. A terme, les sujets ont pour objectif le développement des compétences interdisciplinaires. Conformément au principe de mobilité géographique prévu par la Charte d'accueil des chercheurs doctorants et des jeunes recrutés sur contrats par l'INRA, l'ASC est accueilli dans un nouveau laboratoire après l'obtention de son doctorat pour 3 ans afin d'acquérir de nouvelles compétences. Ce projet a donc l'intérêt de donner l'opportunité d'organiser ses recherches sur 6 ans.

TABLES DES MATIÈRES

INTRODUCTION **23**

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE **27**

I. L'évolution des paradigmes sur l'histoire de vie de *P. syringae* **27**

I.1. Biologie de *P. syringae* : bactérie pathogène, épiphyte et glaçogène 28

I.2. Diversité des populations de *P. syringae* et des maladies qu'elle provoque 42

I.3. Écologie de *P. syringae* : de l'aptitude à la vie épiphyte vers la mise en évidence d'une histoire de vie associée au cycle de l'eau 51

II. Les traits de *P. syringae* qui pourraient être impliqués dans sa dissémination le long du cycle de l'eau **60**

II.1. Quelques caractéristiques générales du génome de *P. syringae* 60

II.2. L'adaptation à l'environnement nutritionnel 61

II.3. Les résistances aux conditions physico-chimiques 64

II.4. Gestion des interactions avec d'autres microorganismes 69

TRAVAUX DE RECHERCHE **71**

I. Caractérisation de la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux, rôle d'autres intrants (i.e., populations autochtones) contribuant aux populations dans la neige **73**

I.1. Introduction 73

I.2. Article soumis à *Environmental Microbiology* 76

I.3. Synthèse 108

II. Estimation du transport et de la déposition de *P. syringae* par les précipitations en fonction des trajectoires des masses d'air et de leurs propriétés physiques **111**

II.1. Introduction 111

II.2. Article en cours de soumission à *Biogeosciences* 114

II.3. Complementary results on phenotypic diversity 137

II.4. Synthèse 139

III. Caractérisation de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les eaux de surface durant la fonte des neiges et en fonction de facteurs physico-chimiques 141

III.1. Introduction 141

III.2. Manuscrit en préparation 144

III.3. Complementary results on phenotypic and genotypic diversity 162

III.4. Complementary experiment to assess the transport of *P. syringae* through the soil 166

III.5. Synthèse 170

IV. Estimation du transfert de la bactérie phytopathogène *P. syringae* en milieu poreux sous diverses conditions environnementales. 173

IV.1. Introduction 173

IV.2. Article en préparation 176

IV.3. Synthèse 192

SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE 195

I. De nouveaux environnements liés à l'écologie de *P. syringae* 195

I.1. Mise en évidence des populations résidentes de la litière 196

I.2. La survie de *P. syringae* dans le sol 197

II. Les dynamiques des populations de *P. syringae* au cours du cycle de l'eau .. 198

II.1. La déposition de *P. syringae* par les précipitations dans le bassin versant 198

II.2. Le manteau neigeux : réservoir et protecteur des populations résidentes de la phyllosphère et de la litière en milieu alpin 199

II.3. L'impact du transport bactérien dans le sol en milieu alpin 200

II.4. La chimie de l'eau comme marqueur de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les cours d'eau 200

III. Vers un modèle des flux de *P. syringae* dans un bassin versant : des habitats naturels vers les agro-systèmes 201

IV. Perspectives de recherche 204

ARTICLE EN CO-AUTEUR ACCEPTÉ DANS *ISME JOURNAL*.....207

ANNEXES 232

BIBLIOGRAPHIE 241

LISTE DES FIGURES

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I-1. Évolution des orientations de recherche sur l'écologie et l'histoire de vie de *P. syringae* depuis sa découverte comme agent phytopathogène 28

Figure I-2. Les différents scénarios hypothétiques sur les modifications de la phyllosphère que pourraient opérer les bactéries pour leur protection contre les stress physiques et nutritifs (Lindow and Brandl, 2003) 29

Figure I-3. Mise en évidence du rôle de la densité des populations et des gènes impliqués dans la production de N-acyl homoserine lactone dans la motilité de *P. syringae* (Quiñones *et al.*, 2005) 31

Figure I-4. Nombre de lésions (A) et leur diamètre (B) sur des feuilles de haricot en fonction de la production de N-acyl homoserine lactone par *P. syringae* (Quiñones *et al.*, 2005) 31

Figure I-5. Taux de survie de *P. syringae* pv. *syringae* après irradiation avec les UV-B pour les souches 8B48 et HS191 (Sundin and Murillo, 1999) 32

Figure I-6. Le modèle « zigzag » illustrant le système immunitaire de la plante selon Jones and Dangl (2006) 33

Figure I-7. Représentation de l'injectisome du système de sécrétion de type III (Troisfontaines and Cornelis, 2005) 35

Figure I-8. Structure tripartite de l'îlot de pathogénicité de *P. syringae* mise en évidence par Alfano *et al.* (2000) basée sur l'analyse de trois souches *Psy* 61, *Psy* B728a et *Psy* DC3000 36

Figure I-9. Variabilité des gènes impliqués dans la virulence de 19 souches de *P. syringae* (Baltrus *et al.*, 2011) 37

Figure I-10. Spectre d'activité glaçogène de *P. syringae* (Hirano and Upper, 2000) 41

Figure I-11. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences alignées et concaténées de quatre gènes de ménage *gapA*, *cts*, *gyrB*, et *rpoD* avec la méthode *Neighbor-Joining pour 120* souches de *P. syringae* et quatre souches d'espèces proches (*P. viridiflava, P. fluorescens et P. aeruginosa*) (Morris *et al.*, 2010) 43

Figure I-12. Exemples de symptôme causés par l'espèce *P. syringae* 47

Figure I-13. Variabilité temporelle de la taille des populations de la souche de *P. syringae* (R10) résistante à la rifampycine, des *P. syringae* totaux et des bactéries totales cultivables 48

Figure I-14. Variabilité de la taille des populations de *P. syringae* sur des feuilles individuelles de haricots à partir de jeux de données (Hirano *et al.*, 1995) 53

Figure I-15. Effet de la pluie sur la taille des populations de *P. syringae* à la surface des feuilles de haricot (Hirano *et al*. (1996) 53

Figure I-16. Observations au microscope électronique à balayage de populations de *P. syringae* à la surface des organes de la plante 54

Figure I-17. Représentation schématique des composants majeurs de la phyllosphère en tant qu'habitat (Morris, 2001) 55

Figure I-18. Deux exemples de caractérisation des tailles des populations de bactéries dans l'atmosphère 55
Figure I-19. Représentation de la dynamique hypothétique des populations des bactéries de l'atmosphère (ligne noire) dans la zone inférieure de la troposphère à un temps et une zone donnée (Lighthart, 1999) 56
Figure I-20. Représentation de la dynamique hypothétique des populations des bactéries de l'atmosphère dans la zone inférieure de la troposphère en fonction des solstices d'hiver et d'été dans l'hémisphère nord (Lighthart, 1999) 57
Figure I-21. Cycle de vie hypothétique de *P. syringae* (Morris *et al.*, 2008) 58
Figure I-22. Similarité génétique des populations de *P. syringae* isolées de plusieurs rivières travers le monde (Morris *et al.*, 2010) 59
Figure II-1. Ensemble des réactions conservées, variables et absentes de plusieurs voies métaboliques (KEGG) chez les souches de *P. syringae* (Mithani *et al.*, 2011) 62
Figure II-2. Regroupement sur la base de la présence/absence de 224 réactions impliquées dans 32 voies métaboliques ayant montré des distribution différentes pour les 9 souches de *Pseudomonas* spp. (Mithani *et al.*, 2011) 63
Figure II-3. Composition moyenne en matière organique dissoute de faible poids moléculaire (a) acides carboxyliques, (b) acides aminés et (c) hydrates de carbones dans l'eau de source deux bassins versant du nord de la Suède (Berggren *et al.*, 2010) 64
Figure II-4. Composition moyenne en acides carboxyliques dans les gouttes d'eau des nuages du Puy de Dôme (Marinoni *et al.*, 2004) 64
Figure II-5. Taux de croissance *k* (lignes noires) et temps de doublement, de *P. syringae* (●) et *Xanthomonas pruni* (○) en fonction de la température d'incubation (Young *et al.*, 1977) 67
Figure II-6. Illustration des voies qui permettent aux bactéries d'utiliser la lumière pour faire des choix de mode de vie (Gomelsky and Hoff, 2011) 68

Chapitre I à IV

Figure I-1. Population densities of *P. syringae* and total culturable bacteria in alpine grasses, litter and snowfalls in the catchment basin before and during snowpack formation 86
Figure I-2. Population densities of *P. syringae* and total mesophilic bacteria in two layers of snowpack in the Southern French Alps 86
Figure I-3. Population densities of *P. syringae* and total mesophilic bacteria in litter and two layers of the covering snowpack in sub-alpine meadows of the Southern French Alps for sites where triplicates samples of litter and snow were sampled 89
Figure I-4. Population Dynamics of population densities of *P. syringae* in litter (dashed line) and snow (solid line) in microcosms incubated for 9 weeks under snowpack in the Southern French Alps 89

Figure I-5. Phenotypes of *P. syringae* and their frequency distribution among strains from leaf litter and the entire snowpack in the Upper Durance catchment basin in the Southern French Alps 90
Figure I-6. Example of phenotypic structure comparison with the GLM approach: frequency distribution of the probability for each combination of phenotypes to be in the first layer of snow 93
Figure I-7. Example of BOX-PCR profiles in leaf litter and the first layer of snow at one site and two dates 94
Figure I-8. PCA performed on 138 haplotypes of *P. syringae*, followed by a nonhierarchical classification with clustering based on Ward's method 96
Figure I-9. Distribution of *cts* haplotypes of *P. syringae* into three genetic clusters inferred with the Bayesian clustering algorithm of the STRUCTURE software 97
Figure II-1. Population densities of total culturable bacteria, *P. syringae* and *B. cinerea* in rainfalls and snowfalls. 121
Figure II-2. Backward trajectories of air masses associated with the 88 precipitation samples. 122
Figure II-3. Occurrence of *P. syringae* in precipitations according to the origin of air masses. 122
Figure II-4. Backward trajectories of air masses associated the occurrence of *P. syringae*. 135
Figure II-5. Backward trajectories of air masses associated the occurrence of *B. cinerea*. 136
Figure III-1. Chemical features of water sampled in the Southern French Alps represented as percentage of total milligrams per liter on the trilinear Piper diagram (Piper, 1944). 151
Figure III-2. Concentrations of *P. syringae* as a function of total culturable bacteria. 153
Figure III-3. Dynamics of bacterial concentrations over time. 153
Figure III-4. Localization of the four catchment basins in the Durance river basin in France. 158
Figure III-5. The experimental system of the Bio-CATCH project. 167
Figure III-6. Microbial and chemical characteristics of the lysimeter percolate. 168
Figure IV-1. Variability of the ζ potential for three strains of *P. syringae* at three levels of conductivity (100 (white), 600 (grey) and 1200 (dark grey) µS cm^{-1}) 185
Figure IV-2. Relative effluent concentration of *P. syringae* across columns of Fontainebleau 185
Figure IV-3. Relative effluent concentration of strains TA-022-rif of *P. syringae* across columns of soil collected in the Southern French Alps 187

Article en co-auteur

Figure 1. Fraction of HR^- strains in the total *P. syringae* populations in environmental samples in terms of the density of the *P. syringae* population in the sample 216
Figure 2. Reaction of cantaloupe plants at the cotyledon stage to inoculation with HR^+ and HR^- strains of *P. syringae* after 7 days of incubation: plants were inoculated with A) sterile distilled water, B) HR^- strain CC1524 in the clade of the same name C) HR^+ strain CC0094 in the Group 2b clade, or D) HR^- strain TA043 in the TA002 clade. 218
Figure 3. Population dynamics of *P. syringae* (A) and disease (B) in cantaloupe seedlings after inoculation with either HR^+ or HR^- strains. HR^+ strains are represented by solid lines and symbols (◆

CC0654; ▲ DC3000; ■ USA-032) and HR$^-$ strains by dashed lines and open symbols (◊ TA-043; △ SZ-030; ▫ CC1504). 222
Figure 4. Example of PCR results for canonical *hrp-hrc* cluster and Southern blot experiments 228

LISTE DES TABLEAUX

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I-1. Production d'alginate et la susceptibilité aux radicaux oxygène intermédiaires des souches de *P. syringae* dont la production de N-acyl homoserine lactone (AHL) est différente (Quiñones *et al.*, 2005) 30

Tableau I-2. Systèmes de sécrétion chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et leur rôle dans le pouvoir pathogène d'après Cunnac *et al.* (2009) 38

Tableau I-3. Phytotoxines produites par les pathovars de *P. syringae* et modes d'action d'après Bender *et al.* (1999) 39

Tableau I-4. Liste non exhaustive des pathovars de *P. syringae* émergeants dans les zones tempérées des 15 dernières années 45

Tableau II-1. Liste des souches de *P. syringae* dont le génome complet à été séquencer et publié avant septembre 2011 61

Chapitre I à IV

Table I-1. Frequency of strains of *P. syringae* from leaf litter and snow in different phenotypic classes 91

Table I-2. Origin of strains from which *P. syringae* was isolated in this study 101

Table I-3. Synthesis of frequency distributions of the probability for each combination to be in a given substrate, site, date or sample 106

Table II-1. Sampling sites and number of samples collected 118

Table II-2. Frequency of precipitations carrying *P. syringae* and *B. cinerea.* 120

Table II-3. Physical properties of air masses carrying *P. syringae* during 120 h and 48 h preceding the precipitation event 124

Table II-4. Origin of precipitations and their population sizes of total culturable bacteria, *P. syringae* and *B.cinerea.* 131

Table II-5. Significance of mean comparisons for each physical parameter between air masses carrying *P. syringae* and the ones carrying *B. cinerea* considering the subsample. 134

Table II-6. Frequency of strains from snow and rain inducing a hypersensitive reaction on tobacco 138

Table III-1. Catchment basins where streams and their associated snowpack were sampled 148

Table III-2. Populations sizes of microorganisms, pH and electrical conductivities in streams. 150

Table III-3. Correlations between bacterial concentration (log(CFU/L) and water chemistry (n=52). 153

Table III-4. Origin, chemical characteristics, and concentrations of total culturable bacteria and *P. syringae* in snowpack and rivers 159

Table III-5. Ionic composition of water samples 161

Table III-6. Frequencies of *P. syringae* strains in different phenotypic classes from water at three sites in 2009 and 2010. 164

Table III-7. Affiliation of the water strains to the phylogroups defined by Morris *et al.* (2010)..... 165
Table III-8. Population sizes of total culturable bacteria and *P. syringae* in the percolated water of lysimeters and the plant material of grasslands from the Col du Lautaret..... 168
Table IV-1. Strains of *P. syringae* used in this study..... 180
Table IV-2. Characteristics if the porous media..... 182
Table IV-3. Interspecific variability of ζ potential for *P. syringae* species..... 184
Table IV-4. Characteristics of soil columns collected in the Southern French Alps..... 188
Table IV-5. Sizes of the indigenous populations of *P. syringae* and total bacteria leached from soil cores collected in Southern French Alps..... 189

Article en co-auteur

Table 1. Characteristics of environmental samples, from alpine regions and outside of cropped fields, used in survey for populations of *Pseudomonas syringae* incapable of inducing a hypersensitive reaction in tobacco (HR-). 215
Table 2. Genetic and pathogenic diversity of strains of *P. syringae* according to the phylogenetic context of the strains..... 220
Table 3. Sources of strains of *P. syringae* from non agricultural habitats..... 230

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Exemple d'un prélèvement de neige fraîche au Col du Lautaret en novembre 2009 232
Annexe 3. Échantillonnage du manteau neigeux 233
Annexe 4. Construction des microcosmes 234
Annexe 5. Source du Riou Mounal (versant sud du Col de Vars) le 26 mai 2010 235
Annexe 6. Classification des différents types de faciès chimiques en fonction de la proportion relative de chaque ion et représentée par le diagramme de Piper (Piper, 1944) 236
Annexe 7. Structure des sols prélevés en montagne. 237
Annexe 8. Prélèvement des colonnes de sol. 238
Annexe 9. Dispositif expérimental pour l'estimation du transport de *P. syringae* à travers les colonnes de sable de Fontainebleau. 239
Annexe 10. Dispositif expérimental pour l'estimation de la survie et du transport de *P. syringae* à travers les colonnes de sol prélevées dans les Alpes du Sud. 240

INTRODUCTION

Caractériser la dissémination des bio-agresseurs est un enjeu majeur pour la gestion et la prédiction des maladies en santé des plantes. Depuis le XIXème siècle, de nombreuses recherches s'intéressent aux propriétés génétiques, biologiques et aux interactions des systèmes hôte-pathogène impliqués dans l'émergence des maladies, mais également aux voies et aux facteurs relatifs à leur diffusion. Cependant, quelque soit l'échelle à laquelle les recherches dans ces domaines se placent (du moléculaire au paysage) elles sont essentiellement centrées sur la plante hôte dans un contexte agricole. Les traits d'histoire de vie des agents pathogènes, leurs fonctions et leurs dynamiques dans les écosystèmes sont alors réduits à une définition dans le simple contexte des populations susceptibles aux maladies (plantes de manière générale mais tout spécialement les plantes hôtes d'importance agronomique) sans considérer les réservoirs dans lesquels ils sont présents de manière asymptomatique. Or, cette vision réductionniste permet de comprendre la distribution des agents phytopathogènes à travers les metapopulations de plantes hôtes cultivées que dans une certaine limite. De plus elle ne permet pas de prédire l'émergence des maladies qu'ils provoquent. Face aux limites des démarches scientifiques usuelles dans ce domaine, de nouvelles approches devaient être proposées.

Morris *et al.* (2009) sont les premiers à avoir fait évoluer cette vision à travers l'extension des paradigmes des traits d'histoire de vie des agents phytopathogènes et de l'évolution de leur valeur sélective en dehors des limites de la plante-hôte. Cette vision se basait (i) sur la mise en évidence d'autres forces impliqués dans l'épidémiologie de maladies humaines comme le rôle de réservoirs alternatifs, les fonctions multiples des mécanismes de virulence et la sélection par l'environnement de traits liés à la valeur adaptative pour certains pathogènes, et (ii) sur plusieurs observations de pathogènes de plante (i.e., les espèces de bactérie *Pectobacterium carotovorum*, *Pantoea agglomerrans*, et *P. syringae* ; de champignon *Fusarium* spp. et *Aspergillus* spp. ; ou encore le Tomato mosaic virus) dans divers écosystèmes non agricoles (i.e., sol, eau douce, nuages).

Parmi ces agents phytopathogènes, les études sur *P. syringae* sont celles qui ont contribué le plus à ce nouveau courant de pensées et dont on connaît le mieux le cycle de vie en relation avec ses réservoirs « non hôtes ». Récemment, Morris *et al.* (2008) ont mis en évidence l'ubiquité de *P. syringae* dans plusieurs substrats non agricoles et ont

proposé un cadre d'histoire de vie environnemental, étroitement lié au cycle de l'eau. En plus des plantes cultivées, *P. syringae* a en effet été isolée dans les précipitations et dans l'eau de nuage (Amato *et al.*, 2007a; Constantinidou *et al.*, 1990; Sands *et al.*, 1982), dans les rivières (Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008), les plantes sauvages (Mohr *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008) ou encore le manteau neigeux saisonnier (Morris *et al.*, 2008). L'ensemble de ces observations a soulevé de nouvelles questions sur la façon dont chaque compartiment du cycle de l'eau structure la population pathogène et comment le transfert d'un compartiment à l'autre peut affecter la dynamique des populations de *P. syringae*. Serait-il possible de prédire le risque en santé des plantes associé à l'impact de ces transferts sur l'abondance et la structure des populations de *P. syringae* au cours du cycle de l'eau ?

Vu l'échelle, le réseau de compartiments et les échanges entre eux, la prédiction nécessite un outil de modélisation. L'utilisation d'un tel outil implique ; (i) d'identifier les processus réellement pertinents à considérer ; et (ii) d'acquérir des données qui, dans le cas de la modélisation statistique, permettent d'établir les associations avec des processus distaux et non causaux, et dans le cas de la modélisation mathématique, permettent de valider et optimiser le modèle. Cependant, très peu d'études se sont intéressées à l'écologie de *P. syringae* dans les systèmes non agricoles. Les seules dont nous disposons sont celles sur la structure des populations des travaux de Morris *et al*. (2010; 2008), dans lesquelles la connaissance des processus impliqués dans la dynamique des metapopulations de *P. syringae,* ainsi que les échantillonnages, ne permettent pas de modéliser directement. Les recherches développées durant la thèse ont donc eu pour but d'identifier une partie de ces processus et d'acquérir les données nécessaires sur la dynamique des populations de *P. syringae* dans un bassin versant. Elles se sont basées sur une hypothèse globale de ce qui pourrait être le cycle de vie de *P. syringae* (Figure 1) et s'organisent suivant les axes suivant :

- Caractérisation de la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux, rôle d'autres intrants (i.e., populations autochtones) contribuant aux populations dans la neige
- Estimation du transport et de la déposition de *P. syringae* par les précipitations en fonction des trajectoires des masses d'air et de leurs propriétés physiques

- Caractérisation de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les eaux de surface durant la fonte des neiges et en fonction de facteurs physico-chimiques
- Estimation du transfert de la bactérie phytopathogène *P. syringae* à travers un milieu poreux sous diverses conditions environnementales

Dans une première partie, mon travail de recherche est introduit par une synthèse bibliographique dont l'objectif est de (i) présenter l'évolution des paradigmes sur l'écologie et plus globalement sur l'histoire de vie de *P. syringae* et (ii) d'explorer les potentialités de l'espèce en terme de survie et dissémination dans les habitats non agricoles d'un point de vu de la cellule et de son génome. Une synthèse et puis une discussion sur l'ensemble des résultats est proposée en fin du manuscrit ainsi qu'une présentation des autres recherches auxquels les résultats de thèse ont participé.

La manière de penser et d'aborder le sujet, ainsi que les messages qu'elle veut diffuser, sont en parfaite adéquation avec l'esprit d'un nouveau courant de pensée en épidémiologie humaine nommé « écologie de la santé ». Cette nouvelle vision qui caractérise l'épidémiologie moderne, ainsi que les enjeux associés en santé humaine, sont merveilleusement présentés, illustrés et développés par Jean-François Guégan et ses collaborateurs dans une synthèse *Écologie de la santé : le macroscope, un nouvel outil !* [3]. Selon les auteurs, considérer l'individu hôte pour seul référentiel ne permet pas de comprendre l'émergence et la diffusion des agents infectieux à large échelle : « *L'analyse des risques à large échelle en épidémiologie nécessite l'intégration de connaissances provenant de disciplines différentes, sollicitant ainsi une approche de recherche de type holistique*[4]. » En d'autres termes, l'épidémiologie moderne doit changer de référentiel d'étude et adopter une approche pluridisciplinaire pour répondre aux enjeux en santé humaine : « *Confronter les approches moléculaires explicatives-mécanistiques, néo-darwiniennes, et les mécanismes physiques non causaux entre eux. Ne pas mettre en opposition des disciplines, mais rechercher leurs complémentarités au travers d'explications multiples possibles à un même phénomène.* » A travers ce manuscrit,

[3] Guégan, J.F., Constantin de Magny, G., Durand, P. et Renaud, F., 2007. *Écologie de la Santé : Le Macroscope comme Nouvel Outil !* , Écologie et Évolution des Systèmes Parasités. De Boeck Université, Paris, France, pp. 301-344.

[4] Relatif à l'holisme ; doctrine qui ramène la connaissance du particulier, de l'individuel, à celle de l'ensemble, du tout dans lequel il s'inscrit.

nous espérons que le lecteur comprendra l'intérêt d'un telle approche en santé des plantes et qu'elle sera développée par la suite avec d'autres modèles phytopathogènes.

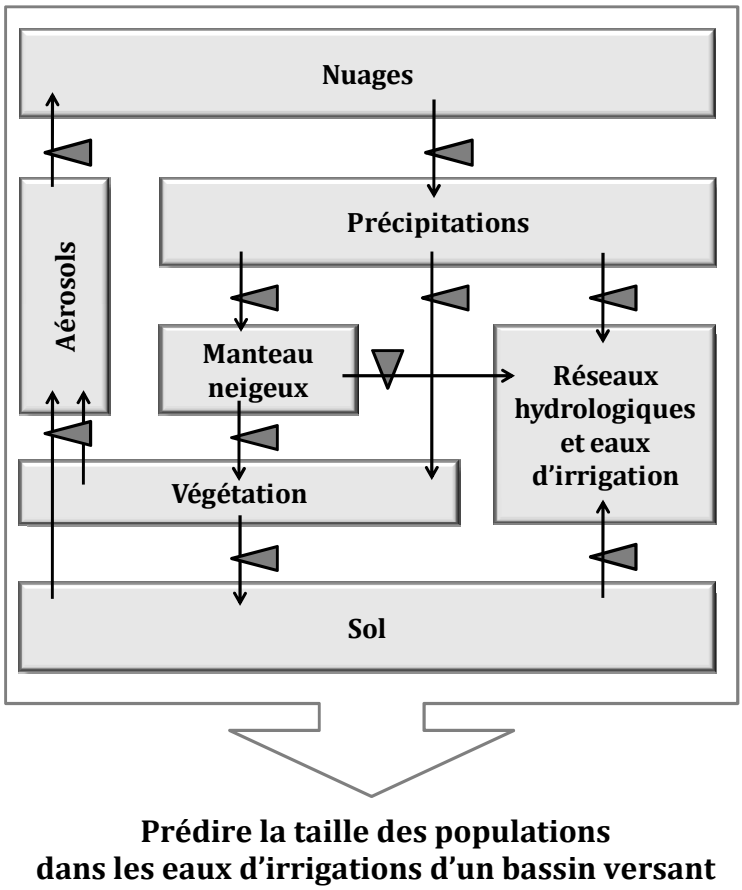


Figure 1. Organigramme du modèle préliminaire sur la dissémination de *P. syringae* à travers le cycle de l'eau
L'objectif de ce modèle est d'être capable de prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations et les précipitations en contact avec les cultures. Cette variable serait alors une fonction du taux de survie, du taux de croissance et des taux de transfert de *P. syringae*, à travers chacun des compartiments du cycle de l'eau (les boîtes) et en fonction de variables explicatives comme le temps ou les conditions physico-chimiques (les flèches grises).

I. L'évolution des paradigmes sur l'histoire de vie de *P. syringae*

P. syringae est intensivement étudiée depuis plus d'un siècle en tant qu'espèce bactérienne phytopathogène. Initialement, elle a été isolée à partir d'un lilas malade (*Syringa vulgaris* L.) par MW Beijerinck en 1899, puis a été caractérisée et nommée par CJJ van Hall en 1902. À ce moment là, on ne s'intéressait qu'au développement des maladies et à leurs conséquences. Le cycle de vie de *P. syringae* était uniquement associé à une phase pathogène et donc aux symptômes qu'elle provoquait. Les lésions étaient considérées comme les premières sources d'inoculum pour le développement des maladies, aucune attention n'étant portée sur les autres environnements. C'est avec les travaux de Crosse (1959) et de Leben (1965) qu'on commença à considérer la feuille comme un habitat pour les micro-organismes, à parler de phyllosphère[5] et de vie épiphyte[6]. Le dogme selon lequel les bactéries phytopathogènes se trouvaient uniquement dans les lésions fut alors abandonné et remplacé. Désormais son cycle de vie était caractérisé par l'alternance de phases infectieuses et épiphytes. Cette nouvelle vision initiée par la découverte de populations pathogènes de *P. syringae* pv[7]. *morsprunorum* à la surface de feuilles saines de cerisier, fut développée par un ensemble de travaux de recherche dont le but était de comprendre les relations entre *P. syringae* et la phyllosphère. Certaines équipes comme celle de S.E. Lindow de l'université de Californie à Berkeley se sont focalisées sur les traits associés aux interactions entre *P. syringae* et la phyllosphère. D'autres auteurs comme S. Hirano, J. Lindemann, T. Suslow ou C.D. Upper se sont plus intéressés aux dynamiques des populations sur la feuille jusqu'au sein des parcelles. Depuis une centaine d'années, la biologie et son écologie ont donc naturellement été définies dans le cadre de ses plantes hôtes, jusqu'à récemment avec les travaux de l'équipe de Pathologie Végétale d'Avignon (Figure I-1). C'est pourquoi le lecteur trouvera les informations relatives à la biologie de *P. syringae* liée à son association avec les plantes dans une première partie, puis sur la diversité de l'espèce et de ses maladies, et enfin une

[5] Habitat localisé à la surface des feuilles et dans les espaces intercellulaires.
[6] Populations résidentes à la surface des feuilles dont la croissance est associée aux tissus sains de la plante.
[7] pv. pour pathovar

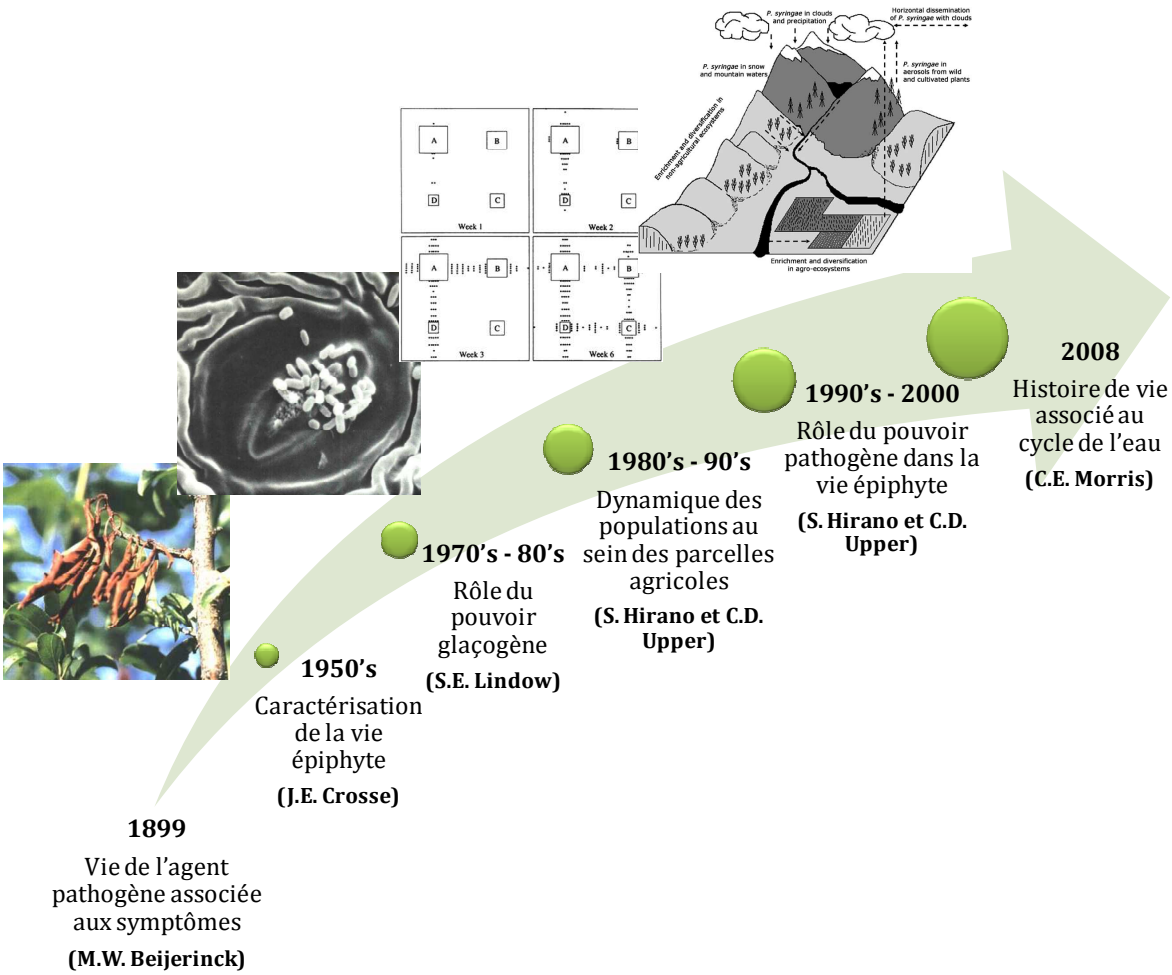


Figure I-1. Évolution des orientations de recherche sur l'écologie et l'histoire de vie de *P. syringae* depuis sa découverte comme agent phytopathogène

synthèse sur son écologie depuis la mise en évidence de sa vie épiphyte jusqu'à la découverte de son association avec le cycle de l'eau.

I.1. Biologie de *P. syringae* : bactérie pathogène, épiphyte et glaçogène

I.1.1. Les traits de vie associés à la vie épiphyte

Les traits de vie de *P. syringae* liés à la vie épiphyte sont impliqués dans la tolérance aux conditions extrêmes de la phyllosphère, mais aussi dans les interactions avec la plante (Hirano and Upper, 2000; Lindow and Brandl, 2003). Ils ont donc un rôle indirect dans la virulence. Parmi les traits de vie les plus importants pour la vie épiphyte, on note ceux impliqués dans l'habilité d'adhésion aux surfaces et à la mobilité (Haefele and Lindow, 1987). En effet, Roine *et al.* (1998) avaient observé des

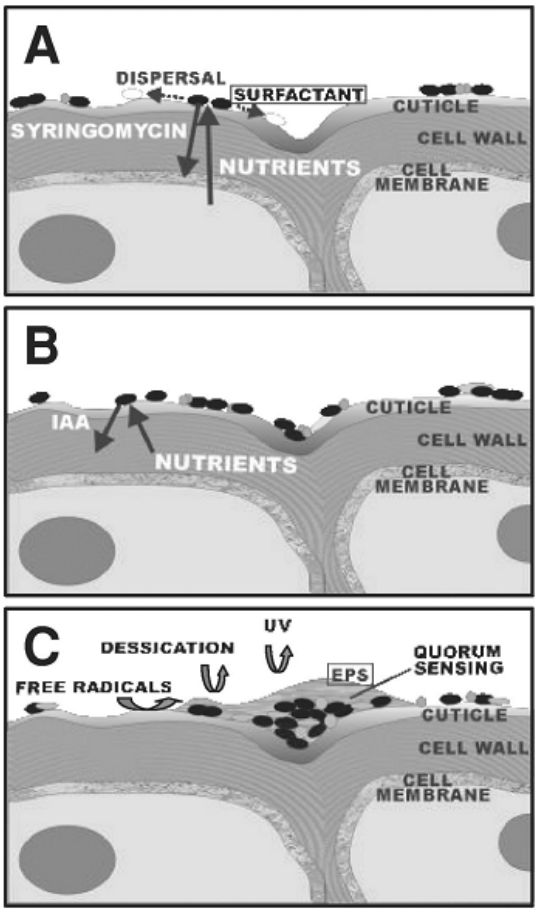


Figure I-2. Les différents scénarios hypothétiques sur les modifications de la phyllosphère que pourraient opérer les bactéries pour leur protection contre les stress physiques et nutritifs (Lindow and Brandl, 2003)
(A) L'exsudation de nutriments sous l'action de phytotoxines pouvant agir aussi comme des surfactants tel que la syringomycine **(B)** L'exsudation de saccharides par la cellule de la plante hôte sous l'action de l'auxine sécrétée par la bactérie. **(C)** Protection des populations bactériennes par la production d'EPS dans les agrégats.

tailles de population plus faibles pour les *P. syringae* pv. *tomato* manquant du pili de type IV[8]. D'autre part, des mutants *pilA*$^-$ et *pilO*$^-$, des gènes essentiels à la formation du pili, indiquaient une diminution significative de la mobilité de *P. syringae* pv. *tabaci* et de la formation de biofilms (Taguchi and Ichinose, 2011).

D'autres moyens existent pour se protéger de la dessiccation, de l'exposition aux rayons UV, ou de la présence de radicaux libres sur la phyllosphère. Par exemple, *P. syringae* peut former des agrégats par l'intermédiaire de structures extracellulaires comme des exopolysacharides (EPS) (Figure I-2C). Les résultats de Monier et Lindow (2003a) suggéraient que la valeur reproductive des populations épiphytes et donc la

[8] Pour les mécanismes d'adhésion, la spécificité et la structure du pili de type IV, voir la synthèse de Mattick JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56:** 289-314.

Tableau I-1. Production d'alginate et la susceptibilité aux radicaux oxygène intermédiaires des souches de *P. syringae* dont la production de N-acyl homosérine lactone (AHL) est différente (Quiñones *et al.*, 2005)

Les valeurs représentent les moyennes et les écartypes d'une seule expérience de trois réplicas. Les valeurs annotées de la même lettre de sont pas significativement différents p = 0,01, test de Bonferroni.

Souche	Génotype	Production d'alginate (µg/mg de protéines totales ± SD) [y]	Susceptibilité au peroxide d'hydrogène (zone d'inhibition de croissance [mm] ± SD) [z]
B728a	Souche sauvage	913,8 ± 108,8 [a]	11,4 ± 0,5 [a]
A9	*ahlI⁻ ahlR⁻*	302,9 ± 58,8 [b]	13,7 ± 0,5 [b]
538	*aefR⁻*	225,6 ± 63,7 [b]	13,1 ± 0,7 [b]
BGACX	*gacA⁻*	17,9 ±5,0 [c]	18,2 ± 0,4 [c]

[y] La production d'alginate a été quantifiée après une croissance de 3 jours sur un milieu solide contenant du mannitol et glutamate supplémenté avec de l'extrait de levure.
[z] La susceptibilité aux radicaux oxygènes a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance entourant les filtres contenant 3% de peroxyde d'hydrogène.

colonisation de la plante, pouvait être dépendante de la formation de ces agrégats et donc de la densité des cellules. Or, certaines bactéries à Gram négatif comme *P. syringae*, possèdent des systèmes de signalisation dépendante de la densité des populations capables de réguler et coordonner l'expression de certains traits — systèmes de *quorum sensing* (Von Bodman *et al.*, 2003). Chez *P. syringae*, ce processus implique la production d'une petite molécule signal auto-inductive, la *N*-acyl homosérine lactone (AHL) dont la production est dépendante d'une enzyme : la AHL synthase. La synthèse de cette enzyme est codée par le gène *AhlI*, dont l'expression est régulée par le gène *AhlR*. L'ensemble du système est contrôlé par deux régulateurs GacA (Dumenyo *et al.*, 1998) et AefR (Quiñones *et al.*, 2004). À travers la production de mutants de ces quatre gènes, Quiñones *et al.* (2005) ont déterminé qu'effectivement certains traits impliqués dans la vie épiphyte comme la production d'exopolysaccharides comme l'alginate, de la résistance au peroxyde d'hydrogène (Tableau I-1) ou encore la motilité « *swarming* » (Figure I-3) et la formation de lésions (Figure I-4) pouvait être sous le contrôle d'un tel système chez *P. syringae*.

P. syringae ayant besoin de nutriments et la phyllosphère étant un milieu oligotrophe, elle interagit avec la plante pour en obtenir par plusieurs moyens. D'un part, elle peut produire des régulateurs de croissance comme l'acide indole-3-acétique (IAA), détournant ainsi la synthèse de sucres par la plante à son profit (Figure I-2B).

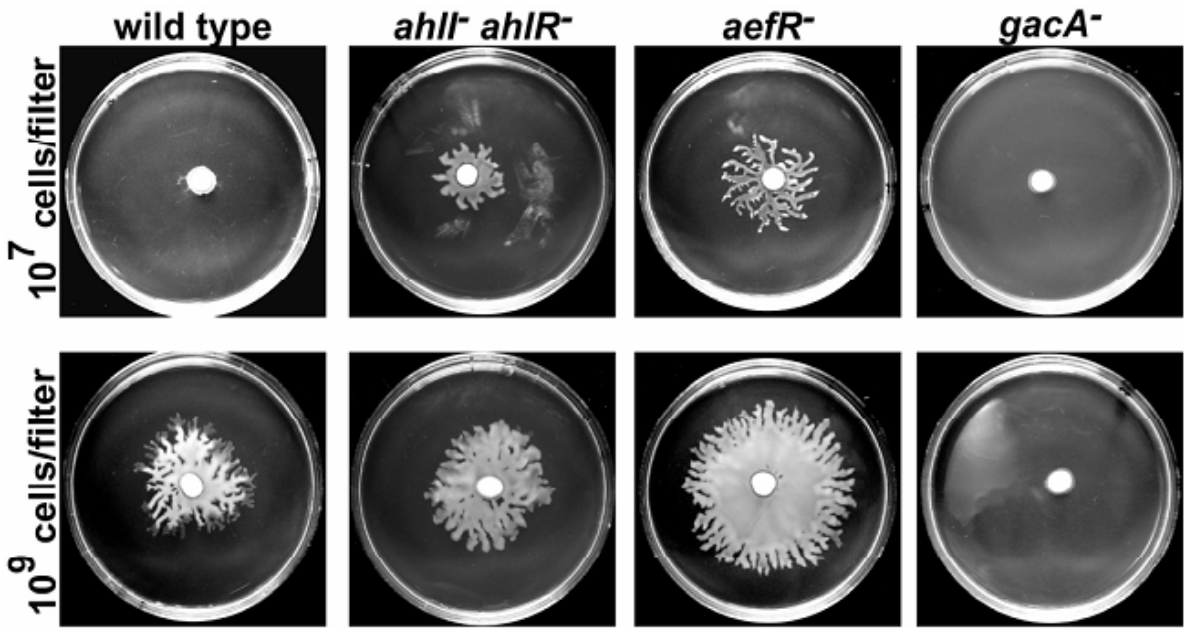


Figure I-3. Mise en évidence du rôle de la densité des populations et des gènes impliqués dans la production de N-acyl homosérine lactone dans la motilité de *P. syringae* (Quiñones *et al.*, 2005)
Des filtres stériles ont été inoculés avec 10^7 ou 10^9 cellules de la souche sauvage de B728a et de plusieurs mutants *ahlI*$^-$ / *ahlR*$^-$, *aefR*$^-$ ou *gacA*$^-$ et placés sur milieu B de King (King *et al.*, 1954). *AhlI* code pour la synthèse de AHL synthase, dont l'expression est régulée par le gène *AhlR*. L'ensemble du système est contrôlé par deux régulateurs codés par *aefR* et *gacA*.

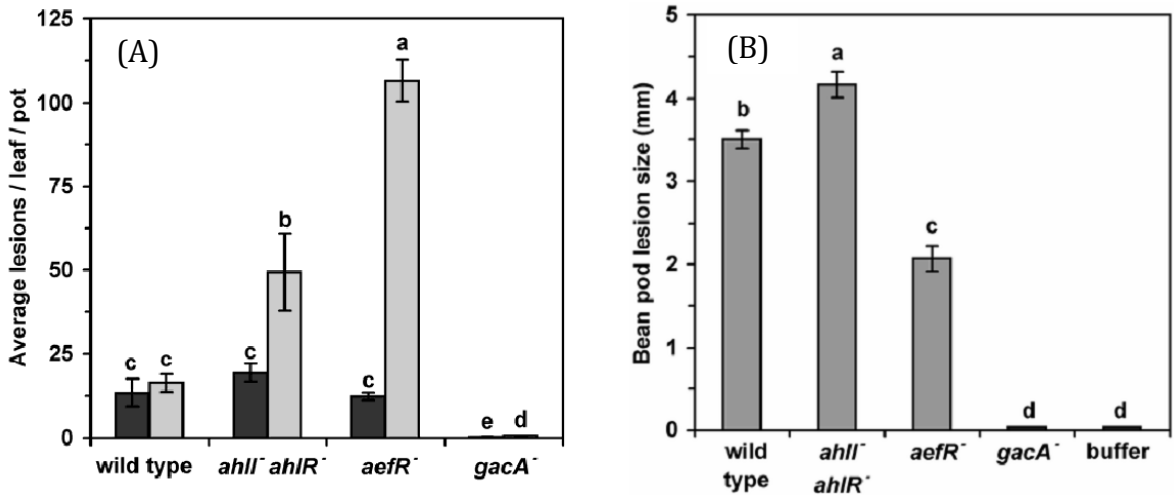


Figure I-4. Nombre de lésions (A) et leur diamètre (B) sur des feuilles de haricot en fonction de la production de N-acyl homosérine lactone par *P. syringae* (Quiñones *et al.*, 2005)
Le nombre de lésions sur les feuilles de haricot a été observé 24 h (barres noires) et 48h (barres grises) après inoculation de 10^6 CFU/ml de la souche B728a sauvage, du double mutant *ahlI*$^-$ / *ahlR*$^-$, des mutants *aefR*$^-$ et *gacA*$^-$. La taille des lésions a été mesurée 3 jours après avoir inoculé 10^8 cellules. Les deux expériences ont été menées à 28°C. Les barres associées à la même lettre n'étaient pas significativement différentes ($p < 0,01$) selon le test non paramétrique de Duncan.

Mais elle peut également produire des phytotoxines comme la syringomycine (Figure I-2A). Bien que qu'elle soit un important facteur de virulence elle peut non seulement induire l'exsudation de métabolites par la plante sans pour autant créer de maladie, mais elle agit aussi comme un biosurfactant régulant la disponibilité en eau pour la bactérie (Lindow and Brandl, 2003).

La phyllosphère étant particulièrement exposée à la lumière, la résistance aux dommages causés par les radiations UV est un trait particulièrement important pour l'adaptation à la vie épiphyte. En plus de la protection conférée par la formation d'agrégats, il a aussi été montré que la production de pigments pouvait être un autre mécanisme de protection contre les rayonnements ultraviolets. D'autre part, *P. syringae* aurait des mécanismes de réparation de l'ADN. Certains gènes comme *rulAB* porté par un plasmide, semblent également permettre une meilleure résistance aux UV (Sundin and Murillo, 1999). Ce gène est un homologue de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN chez *Escherichia coli*, et son expression nécessite la présence de *recA* (Willis *et al.*, 1988). Sundin et Murillo (1999) l'ont détecté dans plusieurs pathovars de *P. syringae*, et ils ont montré qu'il permettait d'augmenter la survie de la bactérie aux UV-B par un facteur de 10 à 100 suivant la souche (Figure I-5).

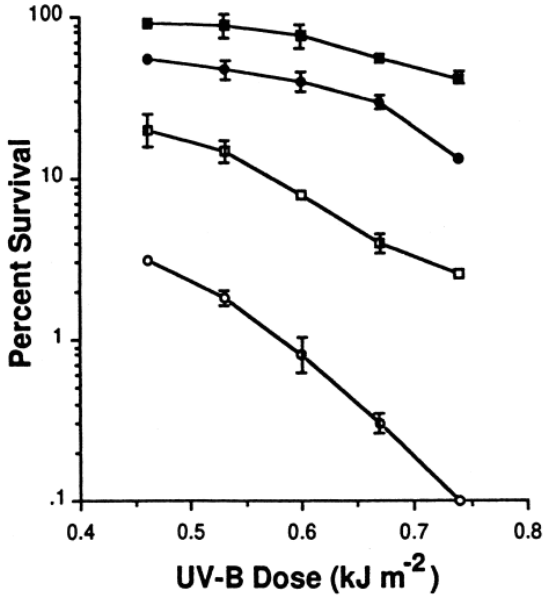


Figure I-5. Taux de survie de *P. syringae* pv. *syringae* après irradiation avec les UV-B pour les souches 8B48 et HS191 (Sundin and Murillo, 1999)
Les ■ et les ● correspondent à deux souches sauvages contenant le gène *rulAB*. Les □ et les ○ correspondent à ces mêmes souches mutées. Les valeurs correspondent aux moyennes et aux erreurs standards. Trois réplicas ont été faits.

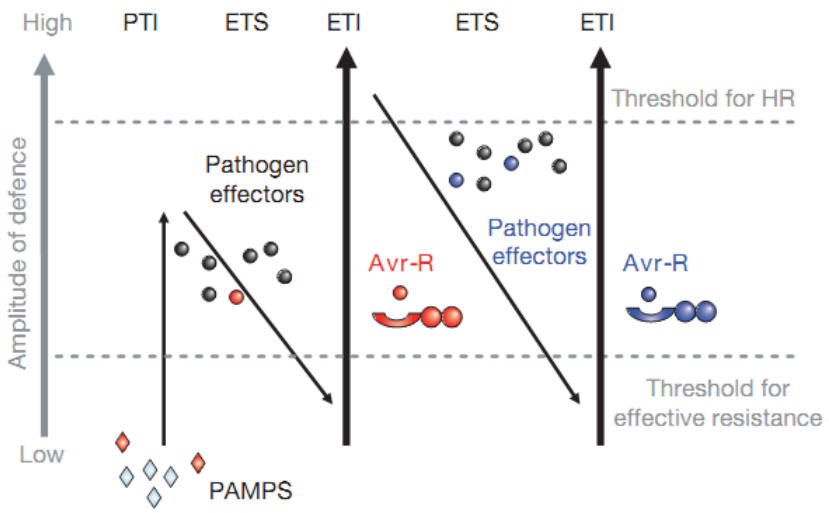


Figure I-6. Le modèle « zigzag » illustrant le système immunitaire de la plante selon Jones and Dangl (2006)
Dans ce modèle, l'amplitude de la résistance ou de la sensibilité de la plante à la maladie est proportionnelle à l'importance de la première immunité PTI, de la susceptibilité aux interférences des effecteurs avec PTI et de la deuxième immunité ETI induite par les effecteurs. Il ya 4 phases : (1) Les PAMPs sont reconnus par les PRRs, induction PTI ; (2) Libération d'effecteurs par le pathogène permettant sa prolifération et interférant avec PTI ; (3) Un des effecteurs (rouge) est reconnu par une protéine NB-LRR qui active ETI et amplifie PTI qui si elle est suffisamment importante, induit l'HR ; (4) Le pathogène gagne un nouvel effecteur à travers les transferts horizontaux (bleu) pour aider à la suppression d'ETI.

I.1.2. Le pouvoir pathogène

Une fois que *P. syringae* a colonisé la surface extérieure de la plante (feuille en particulier), elle pénètre les espaces intercellulaires par des lésions ou des ouvertures naturelles. Le pouvoir pathogène de *P. syringae* s'exprime alors suivant deux processus : (i) sécrétion de protéines effectrices à l'intérieur des cellules des plantes hôtes pour moduler les fonctions de la plante par des systèmes de sécrétion transmembranaires ou (ii) la production d'exoplysaccahrides, de phytotoxines, de phytohormones et d'enzymes dégradant les parois cellulaires.

Pour se défendre, la plante dispose d'une immunité basale sans mémoire, qui lui permet de détecter la présence anormale du pathogène au sein de ses tissus (Figure I-6). En effet, les micro-organismes phytopathogènes dont les bactéries, sont constitués de molécules qui leur sont spécifiques tels que la flagelline, les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes ou encore les facteurs d'élongation. Appelées PAMPs pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, elles sont reconnues par des récepteurs

transmembranaires de type kinase (PRR) qui déclenchent une immunité basale (PTI pour *PAMPs Triggered Immunity*). Cette immunité peut être détournée par le pathogène à travers l'injection d'effecteurs dans les cellules de la plante hôte qui interfèrent avec les premières défenses de la plante et déterminent la susceptibilité de la plante (ETS). À son tour, la plante peut faire obstacle au processus si elle possède le gène de résistance polymorphe *R* codant pour des protéines de type NB-LRR[9] (Dangl and Jones, 2001). La reconnaissance entre l'effecteur produit par le pathogène et cette protéine détermine la deuxième immunité ETI — pour *Effector Triggered Immunity*. Cette phase induit la résistance de la plante qui se manifeste par la réaction d'hypersensibilité (HR) qui correspond à l'activation de la mort programmée des tissus infectés dans les 24h après le contact avec le pathogène (Jones and Dangl, 2006). Le pathogène peut essayer de détourner cette immunité en diversifiant son répertoire d'effecteurs. Ces interactions protéines effectrices (ou d'avirulence) et protéines R — définissant la résistance gène pour gène — sont spécifiques du pathovar de *P. syringae* et de la plante hôte.

Dans les années 80s, la construction de plusieurs mutants a mis en évidence une région de 20-25kb dans le génome de *P. syringae* associée au pouvoir pathogène et à l'induction de cette réponse d'hypersensibilité, et portant les gènes *hrp* pour *hypersensitive response and pathogenicity*. Les homologies avec un locus, la structure flagellaire et les protéines associés à la virulence chez les pathogènes animaux ont mis en évidence que ces gènes été associés à un système de sécrétion de type III (T3SS, pour *Type III Secretion System*). Il n'existerait qu'un homologue du système de sécrétion de type III dans le génome de *P. syringae*, mais O'Brien *et al.* (2010) ont mis en évidence une deuxième copie pour toutes les souches du groupe phylogénétique 3 et 4 testées sur la base de l'analyse MLST du *core* génome. Le T3SS est présent chez beaucoup de bactéries à Gram négatif pathogènes chez le règne animal et végétal. Il joue un rôle dans la lutte contre la phagocytose ou l'invasion pour certains pathogènes humains tels que *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica, Pseudomonas aeruginosa*, mais également dans la virulence d'autres bactéries phytopathogènes comme *Erwinia amylovora*,

[9] Les protéines NB-LRR sont caractérisées par un domaine NB pour *Nucleotide Binding* et un domaine *Leucine Rich Repeat* .

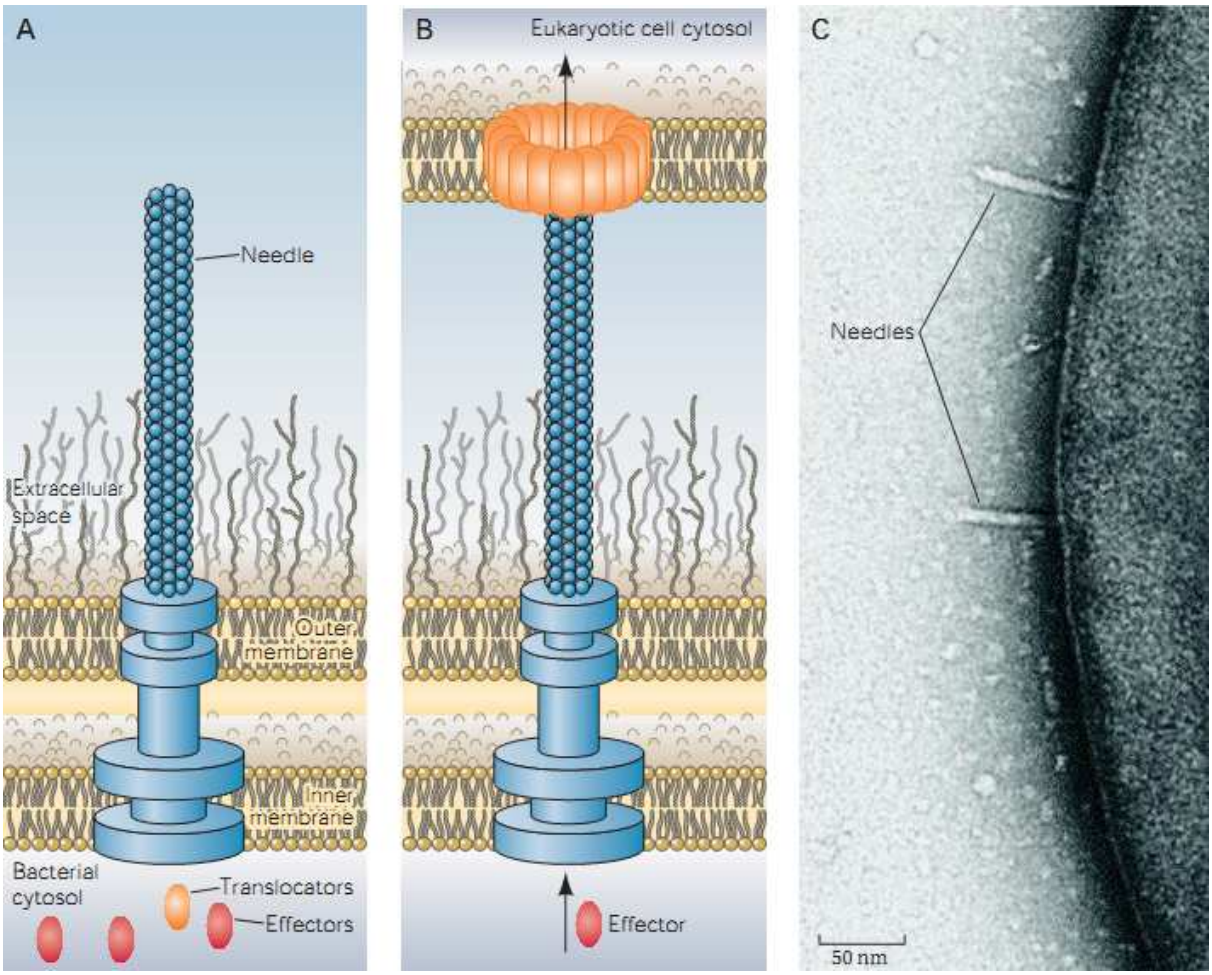


Figure I-7. Représentation de l'injectisome du système de sécrétion de type III (Troisfontaines and Cornelis, 2005)
(A) L'injectisome est inséré dans la membrane de la cellule bactérienne par deux systèmes d'anneaux, un pour la membrane interne et un pour la membrane externe. Il se prolonge par une structure protéique en aiguille longue de plusieurs nanomètres. **(B)** Injectisome à l'action : Les effecteurs produits par la cellule bactérienne dans le cytoplasme, sont transloquées à l'intérieur du cytoplasme de la cellule eucaryote hôte par l'intermédiaire et en association avec des molécules signales et chaperonnes. **(C)** Observation au microscope d'une surface de *Yersinia enterolotica* arborant des aiguilles.

Pseudomonas fluorescens ou *Ralstonia solanacearum* (cf. synthèses de Pallen *et al.* (2005) et He *et al.* (2004)). La structure moléculaire du T3SS permettant d'injecter des effecteurs du cytoplasme bactérien dans celui de la cellule hôte traversant les parois cellulaires est appelé injectisome. Comme illustré sur la Figure I-7, il consiste en un corps basal de type flagellaire composé de deux anneaux liant les deux membranes et une aiguille protéique qui peut atteindre 80nm de long (Troisfontaines and Cornelis, 2005).

La forme canonique du T3SS est codée par un ensemble de gènes porté par un îlot de pathogénicité, susceptible aux transferts horizontaux et qui forme une structure tripartite illustrée dans la Figure I-8 (Alfano *et al.*, 2000). Les éléments les plus importants dans la virulence sont les gènes du cluster *hrp/hrc* qui codent pour le

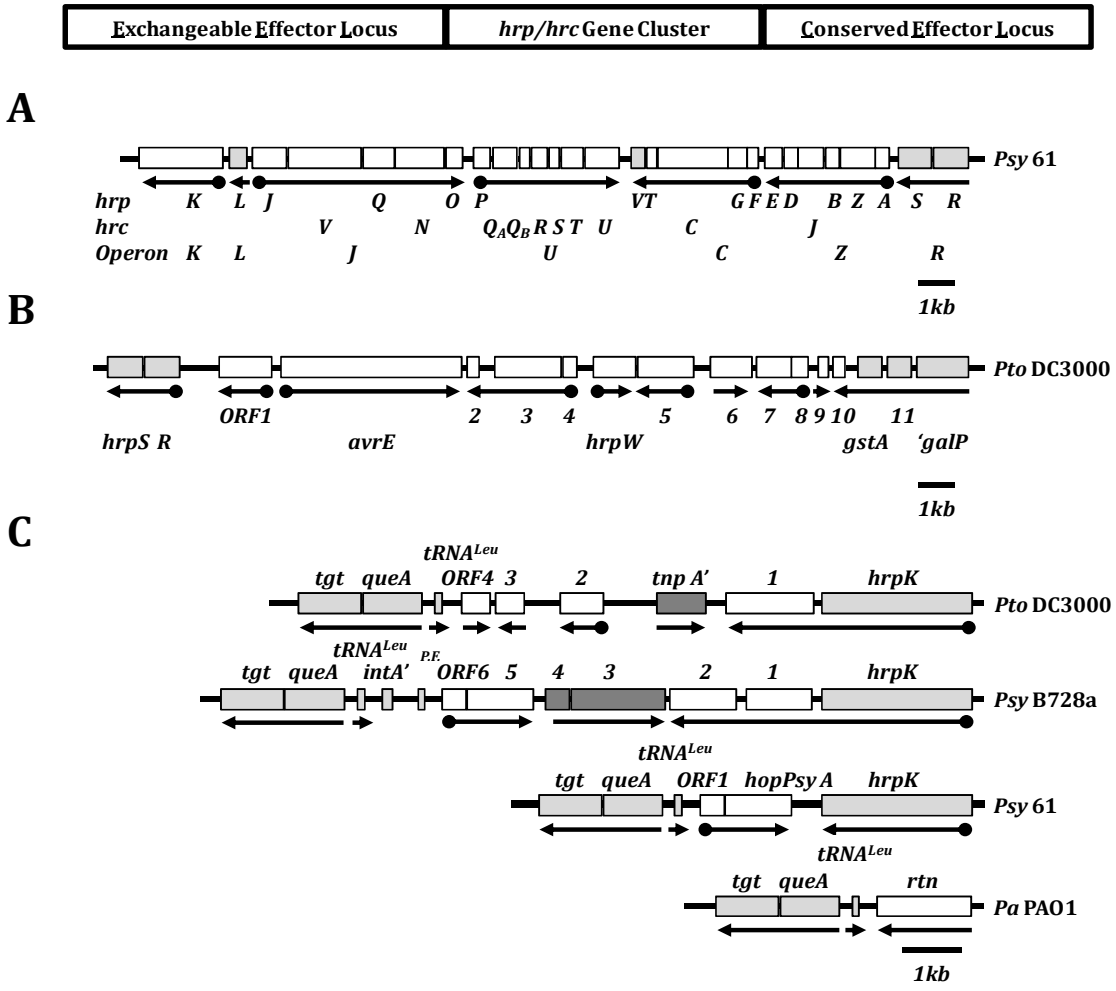


Figure I-8. Structure tripartite de l'îlot de pathogénicité de *P. syringae* mise en évidence par Alfano *et al.* (2000) basée sur l'analyse de trois souches *Psy* 61, *Psy* B728a et *Psy* DC3000
Le cluster *hrp/hrc* codant pour le sécrétion de type III **(A)**, est flanqué du côté gauche par les gènes codant pour les effecteurs interchangeables (EELs) **(B)**, du côté droit par les gènes codant pour les effecteurs conservés (CELs) **(C)**. *Pa* PAO1 est une souche de *Pseudomonas aeruginosa* qui permet de faire la comparaison. Les flèches indiquent le sens des transcriptions, les boîtes en gris foncé correspondent à des éléments mobiles et les boîtes en gris clair correspondent à des gènes complètement différents par rapport aux autres.

système en lui-même. Les gènes s'y regroupent en trois classes : (1) les gènes conservés entre les pathogène animaux et végétaux sont codés *hrc* — pour *hrp conserved* ; (2) les gènes de régulation de la transcription type *hrpL* et *hrpS* et (3) les gènes codant pour l'assemblage de l'injectisome et les protéines chaperonnes (Tampakaki *et al.*, 2011). Il semble que ces gènes soient très importants pou la survie de *P. syringae* car de certaines études phylogénétiques montrent que *hrpL* et *hrpS* sont aussi évolutivement stables entre pathovars que les deux gènes de ménage *gyrB* et *rpoD* (Hirano and Upper, 2000). D'autre part, il est intéressant de noter que le cluster *hrp/hrc* de *P. syringae* produit une autre famille d'effecteurs qui ne sont pas trouvés chez les pathogènes de mammifères :

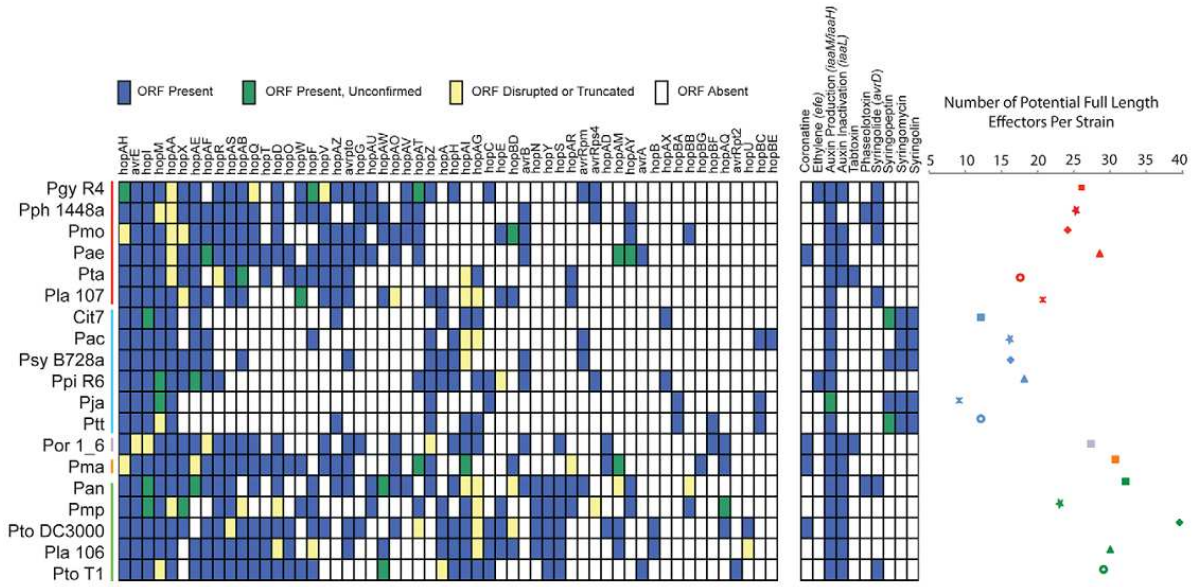


Figure I-9. Variabilité des gènes impliqués dans la virulence de 19 souches de *P. syringae* (Baltrus *et al.*, 2011)
Les gènes codant pour la biosynthèse des effecteurs, de toxines ou la production d'hormones trouvés dans le génome de *P. syringae* sont listées en fonction du groupe phylogénétiques d'appartenance des souches suivant l'analyse MLST de Sarkar et Guttman (2004) — rouge pour le groupe 3 ; bleu pour le groupe 2 ; vert pour le groupe 1 ; violet pour le groupe 4 et orange pour le groupe 5. Les boîtes bleues correspondent à la présence de l'ORF. Les boîtes vertes indiquent les gènes présents par des recherches de similarité. Les boîtes jaunes indiquent que les gènes sont tronqués et les boîtes blanches marquent l'absence de l'ORF.

les effecteurs de la famille des harpines codées par *hrpZ* (He *et al.*, 2004). Le premier membre de cette famille a été identifiée dans *Erwinia amylovora* et induit une réaction HR, mais le rôle exact reste encore inconnu. Chez *P. syringae,* HrpZ pourrait être impliquée dans la libération de nutriments et/ou l'injection de facteurs de virulence durant la colonisation de son hôte (He *et al.*, 2004).

Le cluster *hrp/hrc* est flanqué de part et d'autre par deux clusters. Le premier portent les effecteurs conservés (CELs) tels que les protéines d'avirulence Avr ou les protéines Hop permettant de détourner la machinerie cellulaire au profit du pathogène (Figure I-8B). Ces effecteurs sont hautement polymorphes est restreignent la gamme d'hôte. Alfano *et al.* (2000) ont également mis en évidence un autre ensemble de gènes codant pour des effecteurs interchangeables (EELs) et dont la structure est différente suivant le pathovar (Figure I-8C). Mais selon Collmer *et al.* (2000), les EELs contribueraient de manière moins conséquente à la virulence de *P. syringae*. Pourtant la délétion entre le gène *hrpK* et l'ARNt^{Leu} entraine une baisse de la valeur reproductive de la souche (Alfano *et al.*, 2000). L'analyse de 19 génomes complets de *P. syringae* a mis en évidence 58 familles d'effecteurs différents qui ne se distribuent pas de la même manière suivant le pathovar (Figure I-9).

Tableau I-2. Systèmes de sécrétion chez *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 et leur rôle dans le pouvoir pathogène d'après Cunnac *et al.* (2009)

Pathway	Genes	Substrates	Role
Type I	No candidates identified	Unknown	Unknown
Type II	Component *gsp* genes present (PSPTO_3307-3317)	PlcA1, PlcA2 confirmed, 3 plant cell wall-degrading enzymes predicted	*gspD* and *gspE* mutants cause reduced chlorotic cell death
Type III	Component *hrp/hrc* genes present (PSPTO_1378-1405)	28 effectors likely deployed, plus 4 harpins and 8 Hrp proteins	T3SS essential for pathogenicity
Type IV	2 plasmid localized gene clusters	Conjugation of plasmids pDC3000A and pDC3000B	None
Type V	1 autotransporting lipase predicted, PSPTO_0569	Lipase	Unknown
Type VI	2 clusters predicted	Unknown	Unknown
2-partner secretion	1 predicted system, PSPTO_3230	Filamentous hemagglutinin, PSPTO_3229	Unknown
Tat export	PSPTO_5155-5157	59 predicted; confirmed for PlcA1, PlcA2, amidase, aminotransferase, glucans biosynthetic enzyme	Tat mutants reduced in virulence and HR elicitation

Même si la présence d'un T3SS canonique soit essentiellement à la virulence de *P. syringae*, il apparaît qu'elle ne soit pas indispensable pour pouvoir coloniser les feuilles de la plante. En effet Mohr *et al.* (2008) ont mis en évidences des souches de *P. syringae* non pathogènes ne possédant pas le cluster *hrp/hrc* et appartenant à SZ-030 un groupe particulier de l'arbre phylogénétique défini par Morris *et al.* (2010). Ces souches avaient une très bonne valeur reproductive *in planta* et certaines souches du même groupe possédaient un T3SS orthologue (Clarke *et al.*, 2010). A noter que l'absence, du cluster *hrp/hrc* canonique était associé à la présence d'un bactériophage en aval de l'ARNt^{Leu} (Mohr *et al.*, 2008).

Le système de sécrétion de type III est un processus majeur dans le pouvoir pathogène de *P. syringae*, mais d'autres systèmes de sécrétion semblent intervenir (c.f. Tableau I-2), tout tout comme la production de phytotoxines, la synthèse d'adhésines et de phytohormones (Bender *et al.*, 1999). Les toxines produites par *P. syringae* appartiennent à différentes familles et sont issues de voies de synthèse diverses. Toutes ne sont pas retrouvées chez toutes les souches (c.f. Tableau I-3 et Figure I-9) et agissent de manière indépendante du T3SS. En général, les toxines n'agissent pas de manière spécifique et elle ne font donc que compléter les processus impliqués dans la maladie. Chacune de ces toxines est codée par un gène différent, par exemple le cluster *syr* pour la production de syringomycine (Guenzi *et al.*, 1998), le cluster *argK–tox* pour la phaseolotoxine (Sawada *et al.*, 1999), ou le cluster *cor* pour la production de coronatine (Bender *et al.*, 1999). Elles peuvent entraîner différents effets, comme des chloroses, des hypertrophies, ou des nécroses et leur expression est généralement modulée par des

Tableau I-3. Phytotoxines produites par les pathovars de *P. syringae* et modes d'action d'après Bender *et al.* (1999)

Toxine	Pathovar	Classe chimique ou origine de la biosynthèse	Mode d'action
Coronatine	*atropurpurea, glycinea, maculicola, morsprunorum, tomato*	Polyketide	Chloroses Hypertrophie inhibition de l'élongation racinaire et stimulation de la production d'éthylène
Persicomycine	*persicae*	Acide gras	
Phaseolotoxine	*actinidiae, phaseolicola*	Sulfodiaminophosphinyl peptide	Inhibition de l'OCTase impliquée dans le cycle de l'urée Chloroses
Syringomycine[a]	*syringae, aptata, atrofaciens*	Lipodepsinonapeptide	Création de pores dans la membrane et de flux de cations, nécroses
Syringompeptine	*syringae*	Lipodepsinonapeptide	Même mode d'action que la syringomycine
Tabtoxine	*tabaci, coronafaciens, garcae*	β-Lactam	Inhibition de la détoxification de l'ammoniac et de la synthèse de glutamine
Tagetitoxine	*tagetis*	Non connu	

[a] Incluant les toxines relatives comme le syringotoxine, la syringostatine, et la pseudomycine.

signaux environnementaux. La biosynthèse de coronatine par exemple, est fortement dépendante de la température (Palmer and Bender, 1993) et celle de la syringomycine est initié par la perception de glycosides phénoliques qui sont des composés abondants sur la plante (Mo and Gross, 1991).

La production de certaines toxines est régulé par le cluster *gacS/gacA* qui est aussi impliqué dans l'expression de plusieurs traits liés à la vie épiphyte comme la production d'alginate, d'homosérine lactone, et la motilité. Il code pour ensemble de régulateurs transmembranaires de type histidine kinase, qui servent de senseurs et qui peuvent activer l'expression d'autres gènes (Hirano and Upper, 2000). Ces régulateurs peuvent également être requis pour la formation de lésions ou la production de toxines en agissant sur le gène *salA* qui lui-même régule l'expression de *syrB* codant pour la production de syringomycine (Kitten *et al.*, 1998).

I.1.3. Le pouvoir glaçogène

Les dégâts provoqués par le froid sont une cause importante d'altération de la production dans les cultures et peuvent être induits par certaines populations de bactéries épiphytes et plus spécialement *P. syringae*. Le pouvoir glaçogène (ou INA pour *Ice Nucletation Activity*) de ces bactéries leur permet de créer et contrôler la morphologie et la croissance des cristaux de glace qui peuvent ensuite altérer les tissus de la plante (Bauer *et al.*, 2003; Lindow, 1983; Morris *et al.*, 2004). Lorsque les bactéries glaçogènes sont associées aux plantes sensibles au gel, ce trait entraîne non seulement des dommages physiques liés à l'éclatement physique des cellules, mais il favorise également la pénétration de populations pathogènes par la suite (Lindow, 1983). Pour l'induction de dommages liés au gel, le pouvoir glaçogène est déterminant à des températures entre -5°C et 0°C car dans cette gamme, l'eau en contact avec les tissus de la plante reste facilement à l'état de surfusion et donc liquide.

Beaucoup de liquides dont l'eau ne gèlent pas au point de fusion de la phase solide. L'eau pure peut être maintenue en état de surfusion jusqu'à -39 °C. La prise en glace est catalysée par des particules en suspension qui servent de sites sur lesquels des embryons de glaces se forment par regroupement aléatoire des molécules d'eau entre elles à des températures négatives, plus ou moins proches de 0 °C (c.f. synthèse de Lindow (1983)). Ces particules peuvent être des composés inorganiques comme des poussières minérales et des particules métalliques, ou organiques comme le metaldehyde, les terpènes ou des huiles végétales (Morris *et al.*, 2004). Ils forment des noyaux de glace à des températures entre -20°C et -10°C, mais d'autres noyaux peuvent être glaçogènes à des températures plus chaudes jusqu'à -2°C.

Les noyaux les plus actifs sont d'origine biologique et pour l'essentiel ce sont des microorganismes tels que les bactéries, des algues ou les champignons. Le premier micro-organisme à avoir été identifié fut *P. syringae* (Maki *et al.*, 1974), et reste aujourd'hui l'organisme glaçogène le plus efficace jamais trouvé. Mais cette capacité des bactéries à former de la glace à partir de l'eau en surfusion n'est pas limitée à *P. syringae,* une poignée d'autres espèces bactériennes, dont beaucoup vivent dans la phyllosphère en sont capables, comme *Erwinia herbicola*, *Erwinia ananas*, *Erwinia uredovora*, *P. fluorescens*, *P. viridiflava*, et *X. campestris* pv. *translucens* (Hirano and Upper, 2000; Morris *et al.*, 2004), toutes membres des γ-Proteobacteria. Il a été proposé que le

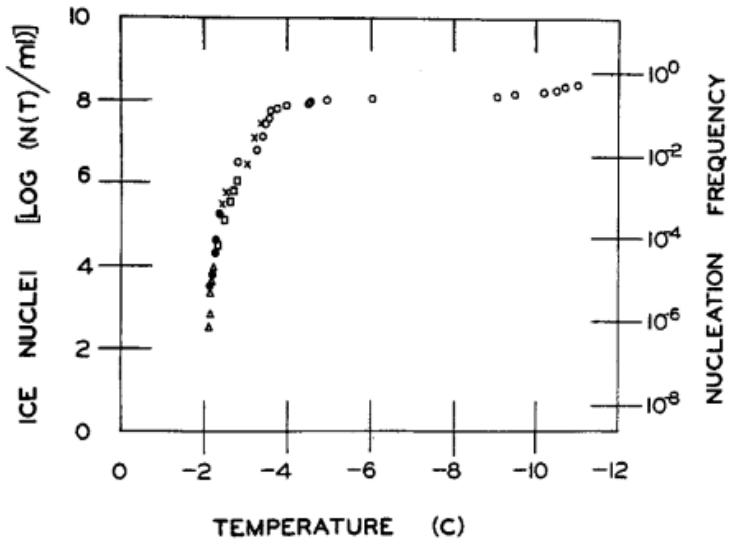


Figure I-10. Spectre d'activité glaçogène de *P. syringae* (Hirano and Upper, 2000)
L'activité glaçogène de plusieurs dilutions d'une suspension de 10^8 CFU mL^{-1} a été mesurée en fonction de la température, et le nombre de noyaux glaçogènes log (N(T)/mL) a été calculée suivant la méthode de Vali (1995).

phénotype INA aurait été sélectionné au cours des générations chez les micro-organismes de la phyllosphère car il présente un avantage lors de l'invasion des feuilles en créant des lésions (Lindow, 1983).

L'activité glaçogène est due à une protéine ancrée dans la membranaire externe. Plusieurs allèles du gène, et la protéine encodée ont été caractérisés. Par exemple InaZ de 120kD-180kD et exposée à l'environnement externe, capable d'orienter les molécules d'eau pour former un embryon de glace (Wolber *et al.*, 1986). Ces protéines INA peuvent se rassembler pour former des agrégats de différentes tailles en liaison avec la membrane externe des cellules bactériennes. Plus l'agrégat est gros et plus la prise en glace est importante. Elles sont codées par les gènes *ina* qui ne semblent être le fruit d'un transfert horizontal, dont *inaZ* chez *P. syringae, inaW* chez *P. fluorescens* ou *inaX* chez *X. campestris* (Hirano and Upper, 2000).

Cependant toutes les souches au sein même de ces espèces ne sont pas glaçogènes ce qui est utilisé pour distinguer certains pathovars chez *P. syringae*. D'autre part, toutes les cellules ne sont pas actives au sein même de chaque souche glaçogène, et le sont à une température différente (Figure I-10) (Hirano and Upper, 2000). Plus la température augmente, et plus il ya de noyaux glaçogène dans la population. D'après les résultats de Nemecek-Marshall *et al.* (1993) sur l'étude de *P. syringae* pv. *tomato*, l'expression du phénotype INA serait aussi dépendante des conditions du milieu. Il en

effet, montré que la concentration en noyaux glaçogènes et la température de gel était étroitement corrélés à la disponibilité en nutriments et la température du milieu.

I.2. Diversité des populations de *P. syringae* et des maladies qu'elle provoque

I.2.1. État des lieux de la taxonomie de *P. syringae*[10]

P. syringae est un complexe d'espèces dont les relations de parenté sont actuellement déterminées à travers l'analyse de séquences multilocus (MLST) du génome conservé proposée par Sarkar et Guttman (2004). Les gènes de ménages déployés pour cette analyse incluent *acn*, *cts (gltA)*, *gapA*, *gyrB*, *pfk*, *pgi* et *rpoD*. A travers l'analyse de plusieurs souches isolées de plantes hôtes, les auteurs avaient mis en évidence 5 clades (ou « groupes génomiques »). Mais l'extension de cette analyse avec les souches isolées des habitats non agricoles par Morris *et al.* (2010; 2008) a augmenté ce nombre de clades à 18 (Figure I-11). L'utilisation de cette méthode est maintenant répandue (Baltrus *et al.*, 2011) et l'ensemble des travaux qui l'utilisent alimentent une nouvelle base de données *Plant-Associated Microbes Database* (PAMDB)[11] avec une interface web spécialement conçu pour les micro-organismes associés aux plantes. Elle comprend, à ce jour, les données de typage génomique multilocus et d'analyse (MLST / MLSA) des études de *P. syringae*, et d'autres bactéries phytopathogènes comme *Acidovorax citrulli*, *Ralstonia solanacearum* et *Xanthomonas* spp. (Almeida *et al.*, 2010).

Les arbres phylogénétiques construits sur la base des analyses MLST sont congruentes avec les résultats d'hybridation ADN-ADN et de ribotypage menées sur des dizaines de souches de *P. syringae* et d'espèces relatives par Gardan *et al.* (1999). L'ancienne nomenclature qui distinguait les souches suivant leur pathovar[12] est tout de même restée afin de maintenir l'information relative à leur gamme d'hôte bien qu'elle n'ait pas de valeur taxonomique. Au début des années 80s, cette classification rassemblait plus de 40 pathovars (Dye *et al.*, 1980; Young *et al.*, 1978), nombre qui s'est

[10] Une synthèse complète et une discussion sur l'évolution de la taxonomie de l'espèce de *P. syringae* depuis les années 60's sont présentées par Young JM (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J Plant Pathol* **92:** S5-S14.
[11] http://genome.ppws.vt.edu/cgi-bin/MLST/home.pl
[12] Définit de manière standard comme « … une souche ou un ensemble de souches avec les mêmes caractéristiques, différenciés à un niveau infrasubspécifique des autres souches de la même espèce ou subespèce sur la base d'une pathogénie distincte sur une ou plusieurs plante(s) hôte(s). »

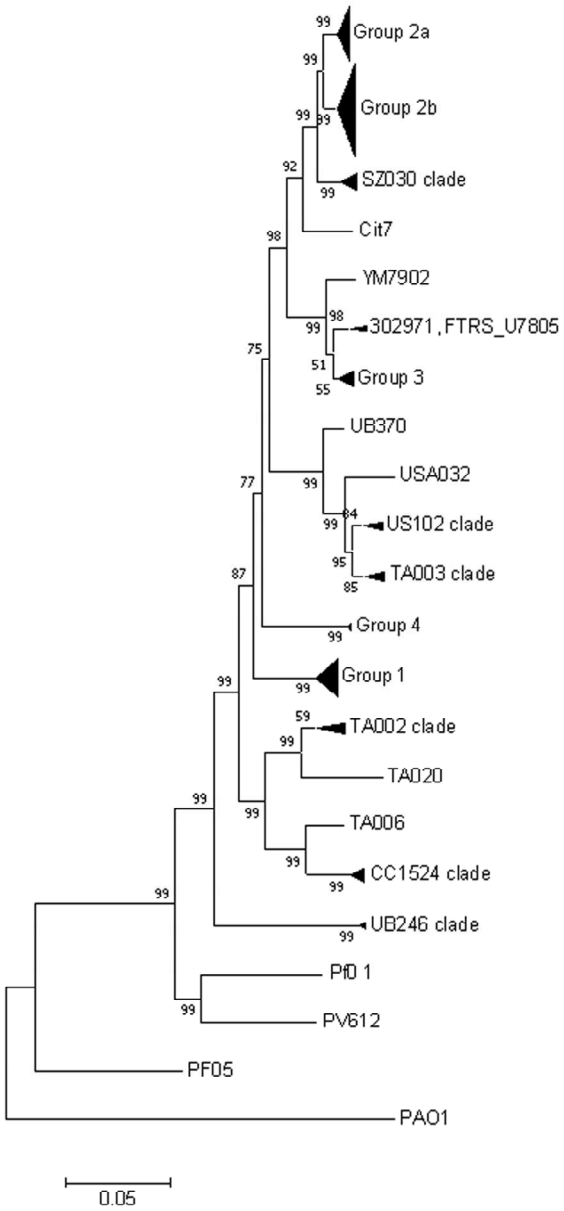


Figure I-11. Arbre phylogénétique construit sur la base des séquences alignées et concaténées de quatre gènes de ménage *gapA*, *cts*, *gyrB*, et *rpoD* avec la méthode *Neighbor-Joining pour 120* souches de *P. syringae* et quatre souches d'espèces proches (*P. viridiflava, P. fluorescens et P. aeruginosa*) (Morris *et al.*, 2010)

Les souches utilisées pour la construction de cet arbre sont issues des habitats non agricoles explorés dans l'étude et celles des plantes cultivées de Sarkar et Guttman (2004).

agrandi à 56 quelques années plus tard (Bradbury, 1986; Young, 2010). Aujourd'hui, les anciens épithètes spécifiques sont devenus des appellations pathovar subspécifique. Par exemple, l'organisme qui cause la maladie moucheture bactérienne de la tomate et qui s'est autrefois appelé *Pseudomonas tomato* (Dye *et al.*, 1980) est devenu *P. syringae* pv. *tomato*.

I.2.2. Gammes d'hôtes et symptômes

Dans sa globalité l'espèce *P. syringae* se caractérise par un spectre d'hôte très large puisque qu'elle a été signalée sur près de 400 espèces végétales (Bradbury, 1986). La bactérie agresse de nombreuses plantes cultivées maraîchères appartenant à une large gamme de familles (i.e., *Solanaceae, Curcubitaceae Leguminosae*), mais elle affecte aussi beaucoup d'arbres fruitiers. L'espèce a également été isolée sur des plantes ornementales malades (i.e., Lilas, Rose, Magnolia) et observée dans les grandes cultures (i.e., blé, seigle, avoine). Toutes les souches de *P. syringae* ne peuvent pas infecter les mêmes hôtes et il existe une large variabilité intra-spécifique du pouvoir pathogène. La subdivision en pathovars avait été mise en place pour pouvoir distinguer les souches entre elles. Certains pathovars sont très spécifiques à une espèce de plante par exemple *P. syringae* pv. *glycinea* (soja), *P. syringae* pv. *phaseoli* (haricot), ou *P. syringae* pv. *persicae* (pêcher) (Vigouroux, 1970; Young *et al.*, 1978). D'autres ont une gamme d'hôtes plus large comme *P. syringae* pv. *syringae* signalée sur 177 espèces de plantes (Bradbury, 1986). En outre, il existe une variabilité intra-pathovar pour certains, notamment pv. *syringae* pour qui la gamme d'hôte peut être différente tout comme l'intensité des symptômes une fois inoculé (c.f. synthèse Gaignard et Luisetti (1993) ainsi que les travaux de Morris *et al.* (2000)).

Plusieurs épidémies provoquées par *P. syringae* ont été recensées dans le monde créant ainsi de nombreuses pertes économiques, qui restent néanmoins difficiles à quantifier. Par exemple, la moucheture bactérienne causée par *P. syringae* pv. *tomato* a entrainé d'importants dommages dans les cultures de tomate (*Solanum lycopersicum*) en 1978 dans l'état de la Géorgie (USA) où elle a été identifiée pour la première fois (McCarter *et al.*, 1983). *P. syringae* pv. *phaseolicola* responsable de la graisse bactérienne, est probablement la bactérie pathogène la plus importante de l'haricot (*Phaseolus vulgaris* L.) en Europe et aux Etats-Unis (Rico *et al.*, 2003). Mais on peut également citer les pathovars *syringae* et *morsprunorum* qui peuvent sévèrement attaquer plusieurs espèces d'arbres fruitiers à travers le monde tels que l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le pêcher (*P. persica* Batsch.), le cerisier doux (*P. avium* L.), ou encore le prunier (*P. domestica* L.) et qui sont considérer comme des agents étiologiques d'intérêt majeur (Scortichini, 2010). En France, elle est très étudiée depuis le

Tableau I-4. Liste non exhaustive des pathovars de *P. syringae* émergeants dans les zones tempérées des 15 dernières années
De nombreuses épidémies ont été reportées depuis les années 1950, dont Gaignard et Luisetti (1993) font une synthèse concernant les plantes ligneuses.

Espèce, pathovar	Pays	Auteurs	Plante hôte
Arbres fruitiers			
P. syringae pv. *actinidiae*	Corée	Koh *et al.* (2010)	Kiwi
	Italie	Balestra *et al.* (2009)	Kiwi
	Italie	Ferrante et Scortichini (2010)	Kiwi
	Portugal	Balestra *et al.* (2010)	Kiwi
P. syringae pv. *aesculi*	Angleterre	Webber *et al.* (2008)	Châtaigner
P. syringae pv. *avellanae*	Italie	Scortichini et Tropiano (1994)	Noisettier
P. syringae pv. *avii*	France	Ménard *et al.* (2003)	Cerisier
P. s. pv. *mosprunorum*	Allemagne	Helmut (1997)	Pommier, Poirier, Cerisier
P. syringae pv. *syringae*	Macédoine	Mitrev *et al.* (2000)	Poivrier
		Whitelaw-Weckert *et al.* (2010)	Vigne
	Australie	Golzar and Cother (2008)	Manguier
P. syringae pv. tabaci	Brésil	Destefano *et al.* (2010)	Caféier
Plantes ornementales			
P. syringae pv. *papulans*	France	Kerkoud *et al.* (2000)	Rose
Cultures maraîchères			
P. syringae pv. *aptata*	France	Mention *et al.* (2004)	Melon
P. syringae pv. glycinea	Serbie	Ignjatov *et al.* (2008)	Haricot
P. syringae pv. *lachrymans*	Maroc	Fatmi *et al.* (2008)	Melon, Concombre
P. syringae pv. *pisi*	Australie	Hollaway *et al.* (2007)	Pois
P. syringae pv. *porri*	France, Canada, Etats-Unis	Samson *et al.* (1998)	Poireau
	Hollande	van Overbeek *et al.* (2010)	Poireau
P. syringae pv. *syringae*	Etats-Unis	Hirano *et al.* (1995)	Haricot
	Serbie	Obradovic *et al.* (2008)	Framboisier
P. syringae pv. *tomato*	Népal	Lamichhane *et al.* (2010)	
	Portugal	Cruz *et al.* (2010)	Tomate
Grandes cultures			
P. syringae pv. *atrofaciens*	Ukraine	Pasichnik *et al.* (1997)	Avoine, seigle
P. s. pv. *coronafaciens*	Ukraine	Pasichnik *et al.* (1997)	Avoine, seigle

dépérissement bactérien du pêcher dû à *P. syringae* pv. *persicae*, apparu à la fin des années 1960 (Vigouroux, 1970) et surtout depuis les épidémies sévères de 1993, 1996 et 1997 provoquées par *P. syringae* pv. *aptata* qui causèrent d'énormes pertes dans les productions de melon — *Cucumis melo* L. (Morris *et al.*, 2000). Lors de ces épisodes, plus

de 80% des cultures en plein champ des régions du sud-est ont été infectées et certains agriculteurs ont perdu près de 100% de leur production à cause de la bactériose. Bien que de nombreuses maladies dues à des virus ou des champignons soient bien connues dans ce type de culture, aucune bactérie auparavant, n'avait déjà été impliquée dans des problèmes aussi sérieux (Mention *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2000). Encore ces dernières années, l'espèce continue de sévir à travers le monde (Tableau I-4), et une attention particulière est apportées aux cultures de Kiwi, qui ont subi des attaques foudroyantes en 2010 et 2011 en France et en Italie (Vanneste *et al.*, 2011) et qui est en train de dévaster la production en Nouvelle Zélande.

Les symptômes induits par l'ensemble des pathovars de *P. syringae* sont semblables à quelques exceptions près et bien reconnaissables tout spécialement au début de l'infection. Les synthèses de Scortichini (2010), Hirano et Upper (1990), Gaignard et Luisetti (1993) et Mention *et al.* (2004) présentent quelques éléments de diagnostic. Certains pathovars comme *P. syringae* pv. *syringae*, sont capables de produire un type de lésion caractéristique correspondant à un engorgement des tissus d'aspect huileux, appelé *water soaking*. Dans les stades plus avancés de l'infection, toutes les souches de *P. syringae* provoquent une destruction plus ou moins localisée des tissus parenchymateux chez ses hôtes sensibles, l'espèce étant essentiellement un agent de type nécrogène. Elle n'entraîne pas systématiquement la mort des plantes infectées, mais affecte significativement la qualité des produits à cause de la réduction de leur taille ou leu pourriture, ou la croissance de l'hôte : le rendement photosynthétique étant altéré. Les symptômes se manifestent aussi bien sous forme de chancres, que de nécroses foliaires et tissulaires (Figure I-12). La maladie peut devenir systémique et atteindre l'ensemble de la plante infectée.

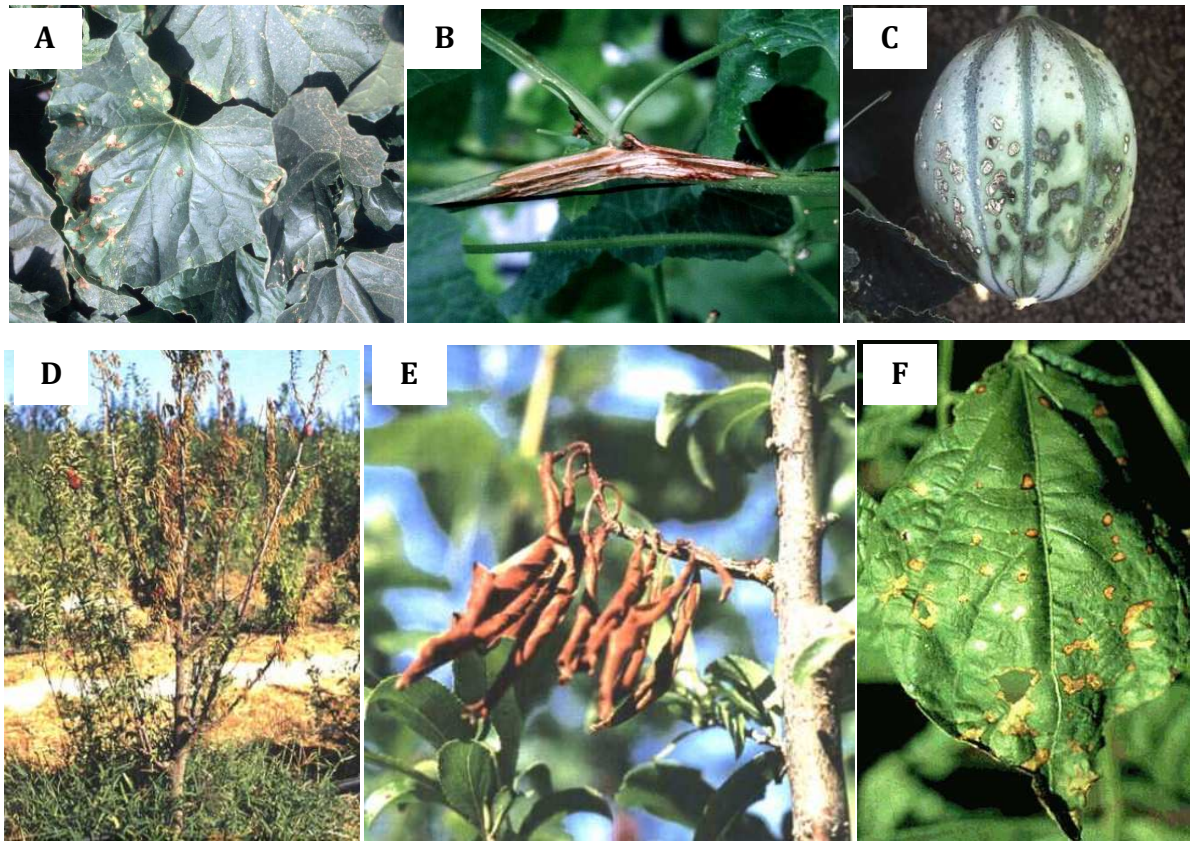


Figure I-12. Exemples de symptôme causés par l'espèce *P. syringae*
(A-C) Nécroses foliaires, sur tige et sur fruit causées par *P. syringae* pv. *apatata* sur melon (*Cucumis melo*) (INRA Avignon). **(D-E)** Feu bactérien et mort d'un prunier causés par *P. syringae* pv. *mosprunorum,* photos de Hattingh *et al.* (1989). **(F)** Nécroses foliaires sur haricot dues à *P. syringae* pv. *syringae* (Hirano *et al.*, 1995).

I.2.3. Épidémiologie des maladies

P. syringae est une bactérie phytopathogène affectant les parties aériennes de l'hôte. Une fois sur la plante hôte, *P. syringae* pénètre dans les feuilles, les tiges et les fruits par des ouvertures naturelles comme les stomates ou les hydathodes, et par les blessures occasionnées par la taille, les gelées, ou la grêle (Gaignard and Luisetti, 1993). La réussite de l'infection et donc du développement de la maladie, est alors fonction de la taille de l'inoculum infectieux, des conditions climatiques et du moment de la colonisation. L'ensemble des auteurs s'accordent à dire que les populations épiphytes se trouvant de manière asymptomatique sur les feuilles d'hôtes susceptibles ou résistants, jouent un rôle important comme source d'inoculum (Hirano and Upper, 2000). C'est la raison pour laquelle beaucoup d'études se sont intéressés à la dynamique temporelle et spatiale des populations de *P. syringae* épiphytes de l'échelle de la plante à la parcelle. De manière générale, le développement

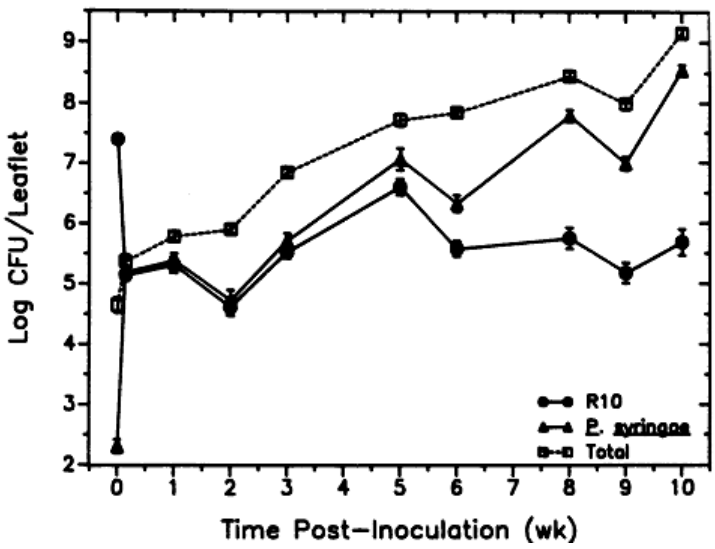


Figure I-13. Variabilité temporelle de la taille des populations de la souche de *P. syringae* (R10) résistante à la rifampicine, des *P. syringae* totaux et des bactéries totales cultivables
Les moyennes et les erreurs standards ont été calculées sur 25 feuilles de haricots par date d'échantillonnage (Hirano and Upper, 1993).

de la maladie nécessite des températures fraîches de l'humidité puis une période plus chaude, son optimum de température étant aux alentours de 28°C.

Lindemann *et al.* (1984) ont mis en évidence que l'occurrence de la maladie *Brown Spot* du haricot causé par *P. syringae* pv. *phaseolicola* pouvait être prédite si la population du pathogène excédait 10^4 CFU par gramme de feuilles saines. Les résultats de Rouse *et al.* (1985) allaient aussi en ce sens. A travers certaines expériences, on constate aussi que la taille des populations évolue au cours d'une saison. Par exemple, Hirano et Upper (1993) ont mis en évidence une augmentation de la taille des populations de *P. syringae* d'un facteur allant jusqu'à 10^4 en fin de saison de culture (Figure I-13).

En outre d'autres facteurs peuvent affecter la diffusion spatiale et temporelle des maladies causées par *P. syringae*. Par exemple, l'historique de la culture peut jouer un rôle dans la taille des populations pathogènes. En effet comme mentionné dans la synthèse de Hirano et Upper (1990), de plus larges populations sont observées sur les feuilles d'arbres ayant déjà été malades l'année précédente. Par contre, il semble que de manière globale, la taille de cette population ne soit pas prédictive de la maladie contrairement à la taille des populations épiphytes. Il semble également que ni la nature du couvert ni l'épaisseur n'avait d'impact sur la dissémination du pathogène puisque

Upper *et al.* (2003) ont mis en évidence que l'alternance des couverts végétaux d'hôtes susceptibles et d'hôtes non favorables à la propagation de *P.s.* pv. *syringae*, ne changeaient pas la diffusion du pathogène.

L'abondance des souches glaçogènes peut aussi être un élément clé dans le développement de la maladie. En effet, les travaux de Lindow (1983) suggèrent que les souches de *P. syringae* glaçogènes peuvent créer des dommages à de températures inférieurs à 0°C facilitant ainsi sa colonisation des tissus. Les dommages sont dus à la formation de cristaux de glace qui se répandent dans les espaces intra et inter cellulaires entraînant une rupture des membranes cellulaires (Buttner and Amy, 1989). D'autres auteurs comme Scortichini (2010) ont tenté de définir d'autres facteurs climatiques, autres que la pluie, importants dans l'épidémiologie des maladies causées par *P. syringae* pv. *mosprunorum* sur arbres fruitiers. Selon lui plusieurs paramètres environnementaux (i.e, température, pluie, humidité, gel) peuvent déclencher la multiplication et la propagation d'un agent pathogène, ainsi que les caractéristiques agronomiques de la culture comme les caractéristiques du sol, le régime de fertilisation, d'irrigation. Selon Mention *et al*. (2004), le développement de la bactériose du melon par *P. syringae* pv. *aptata* est conditionnée par l'alternance d'une température froide aux alentours de 15°C puis de températures plus chaudes. Pour les maladies causes par *P. syringae* pv. *savastanoi*, il semble que l'âge des cultures et l'activité physiologique du cambium soient des facteurs importants à leur développement (Hirano and Upper, 1990).

La colonisation des feuilles est donc la première étape dans le développement de la maladie. *P. syringae* peut arriver sur la plante de plusieurs manières, notamment à travers les semences. Par exemple, Mohan et Schaad (1987) ont détecté *P. syringae* pv. *phaseolicola* dans des semences de sa plante hôte, le haricot. Il a également été montré qu'un sol humide contenant des débris des végétaux malades peut être une source d'inoculum pour les semences et les futures cultures. Ce qui peut être le cas pour *P. syringae* pv. *lachrymans* affectant les cultures de concombre ou encore *P. syringae* pv. *porri* agent causal de la bactériose du poireau (Kritzman and Zutra, 1983; van Overbeek *et al.*, 2010). McCather *et al*. (1983) ont de la même manière suggéré le sol, les semences et les tissus malades pouvaient jouer un rôle dans l'épidémiologie de la moucheture bactérienne sur tomate causée par *P. syringae* pv. *tomato* si la température du sol n'était pas élevée.

La pluie et l'atmosphère sont aussi des éléments clés dans la dispersion locale des populations pathogènes à travers les projections de gouttes d'eau et les mouvements d'air. La pluie a toujours précédé les épidémies pour différentes maladies foliaires causées par *P. syringae*, mais également pour d'autres agents phytopathogènes comme *Xanthomonas campestris* (Hirano *et al.*, 1996; Hirano and Upper, 1990; Mention *et al.*, 2004). Riffaud et Morris (2002) ont aussi suggéré de prendre en compte les bassins de rétention d'eau d'irrigation comme sources d'inoculum, où les auteurs avaient détecté *P. syringae* pv. *aptata*.

Etant donné que *P. syringae* n'a pas besoin de vecteur biologique pour être disséminée, il semble que le rôle des insectes s'il existe, soit minime. Les seules données dont on dispose sont celles de Lindemann et Upper (1985) qui avaient détecté la bactérie sur des boîtes de pétri dans les quelles des insectes s'étaient déposés, et les travaux de Stavrinides *et al.* (2009) suggérant une possible vection par les pucerons.

I.2.4. Moyens de lutte

En plus des mesures prophylactiques qui visent à limiter la progression de la maladie à travers la gestion des hôtes, du sol ou du matériel agricole, différents méthodes ont déjà été mise en place pour lutter contre les bactérioses notamment chimiques, par l'utilisation d'antibiotiques ou de sels de cuivre. Dans de fortes concentrations, le cuivre est un inhibiteur de la croissance bactérienne et il a donc été incorporé comme élément clé dans beaucoup de bactéricides homologués dans tous les pays. Cependant, certaines souches émergentes montrent de fortes résistances à ces produits qui déjà, provoquait une diminution que de 30% des symptômes aux doses les plus fortes sur certaines cultures comme le melon (Mention *et al.*, 2004). De plus, l'efficacité de son utilisation dépendait beaucoup des stades d'application et s'avérait parfois phytotoxique (Gaignard and Luisetti, 1993). Il en été de même pour l'utilisation du mancobèze qui remplaçait le cuivre lors du traitement des jeunes plants en pépinière. Concernant l'utilisation des antibiotiques comme la tétracycline, la streptomycine ou encore la gentamicine, elle est interdite en Europe. Aux Etats-Unis, ces antibiotiques sont pourtant largement utilisés et quelques succès ont été observés. Par exemple, la streptomycine est permise pour le contrôle du *Wildfire* sur tabac causé par *P. syringae* pv. *tabaci* et plusieurs dizaines de kilogrammes par an sont appliqués sur les vergers

(McManus *et al.*, 2002). Cependant des souches résistantes de plusieurs pathovars ont émergées rendant ces produits inefficaces ce qui soulève une faille dans les stratégies de contrôle des maladies par cette voie. De plus, ces produits affectent de manière profonde les communautés microbiennes, ce qui peut être remis en cause d'un point du vu écologique et de santé publique. Des études ont été menées pour sélectionner des variétés résistantes, mais ce moyen de lutte reste compliqué, d'une part parce que pour certaines espèces de plante (comme le melon), on n'a pas trouvé de cultivar résistant, et d'autre part, parce que la gestion durable de ses résistances reste difficilement prédictible.

Il semble que l'on attende beaucoup de la lutte des maladies par la voie biologique. Il y a plusieurs modes d'action — basées sur la compétition pour la ressource, la production de substances nocives. Pour la lutte contre *P. syringae*, certains auteurs tentent de trouver des antagonistes naturels pour supprimer ou ralentir le développement de la maladie. Weinsing *et al.* (2010) ont regardé si la biosynthèse de multiples types de sidérophores par *P. syringae* pv. *syringae* pouvaient leur permettre de contrôler la croissance *P. syringae* pv. *glycinea,* responsable de la bactériose du soja. En se basant sur un autre phénotype, Lindemann et Suslow (1987) se sont aussi intéressés à la compétition entre les souches de *P. fluorescens* non glaçogènes et *P. syringae* pour la protection des fleurs de fraisiers contre les dégâts dus au gel. Aux Etats-Unis, des préparations lyophilisées de la souche A506 de *P. fluorescens* sont même désormais commercialisées (Lindow and Brandl, 2003). Mais de manière globale, on peut quand même conclure que peu de moyens vraiment efficaces sont à la disposition des agriculteurs pour contrôler les maladies dues aux bactéries phytopathogènes que cela soit *P. syringae* ou d'autres comme *Pectobacterium carotovorum*, ou *Xanthomonas campestris*.

I.3. Écologie de *P. syringae* : de l'aptitude à la vie épiphyte vers la mise en évidence d'une histoire de vie associée au cycle de l'eau

Jusqu'à la fin des années 2010s, l'écologie de *P. syringae* a été définie uniquement dans le contexte de la plante hôte malade et de sa vie épiphyte. On dispose donc de tout un ensemble d'études sur la dynamique des populations dans le temps et l'espace en relation avec la phyllosphère. Ces travaux ont fait l'objet de nombreuses synthèses concernant *P. syringae* (Gaignard and Luisetti, 1993; Hirano and Upper, 1990;

Hirano and Upper, 2000; Lindow and Brandl, 2003; Morris *et al.*, 2004) tout comme pour les communautés de la phyllosphère (Kinkel, 1997).

Morris *et al.* (2004) a comparé la dynamique des populations de *P. syringae* sur la plante à celle sur un ensemble d'îles. Selon les auteurs : « *Une feuille émergente d'une plante porte très peu de micro-organismes, mais va être colonisée par une large population durant la vie de la plante, tout particulièrement de bactéries. La colonisation des feuilles peut alors être comparée à celle d'îles où les individus peuvent immigrer d'une feuille à une autre, trouver une niche, survivre et multiplier. Chaque cellule peut ensuite être perdue par la mort ou l'émigration. L'ensemble de ces processus sont affectés par les conditions environnementales et l'espèce de plante ».* La vie épiphyte peut être décrite par la théorie de biogéographie insulaire de MacArthur et Wilson (Kinkel, 1997) , et implique donc les processus suivants (1) la croissance et la mort des individus et (2) les mécanismes liés à l'immigration vers et l'émigration à partir de la phyllosphère. Enfin, une troisième partie introduit la mise en évidence de l'association de l'histoire de vie de *P. syringae* au cycle de l'eau.

La taille des populations épiphytes de *P. syringae* peut varier de manière importante d'une feuille à une autre. La répartition des tailles de population est souvent bien décrite par une loi de distribution de type lognormale (Figure I-14)(Hirano *et al.*, 1995). De manière globale, cette taille est déterminée par un ensemble de paramètres comme l'espèce de plante considérée, sa phénologie, l'âge, la zone géographique, l'échelle de temps, mais également les conditions climatiques. Par exemple, elle peut être en dessous du seuil de détection pour les jeunes plantes en pleine croissance, et plus grandes que 10^7 CFU g^{-1} de tissu sur des plantes âgées. Elle peut également varié d'un facteur allant jusqu'à 10^3 en fonction de l'heure de la journée, variabilité journalière qui peut parfois être plus importante que celle saisonnière. Des préférences de chacune des souches de *P. syringae* en termes d'hôte pour la phase épiphyte et d'hôtes qu'elles puissent infecter, preuvent aussi être à l'origine de différences dans la taille des populations dans la phyllosphère (O'brien and Lindow, 1989). D'autre part, il a été montré que l'augmentation de l'humidité et le choc provoqué sur les feuilles par les chutes de pluie, pouvait augmenter par un facteur de 10^3 les populations sur les plantes de haricots (Figure I-15)(Hirano *et al.*, 1996). Cependant, même une fois identifié, l'ensemble de ces paramètres ne permettent pas clairement de prédire la taille et la

structure des communautés microbiennes épiphytes et encore moins celle des populations de *P. syringae*.

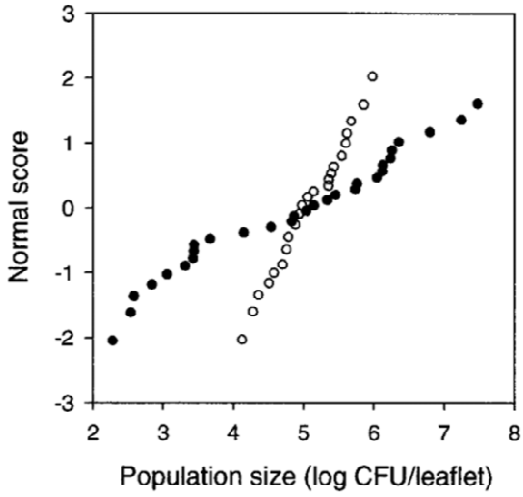


Figure I-14. Variabilité de la taille des populations de *P. syringae* sur des feuilles individuelles de haricots à partir de jeux de données (Hirano *et al.*, 1995)
Les distributions suivent une loi normale. La moyenne est d'approximativement 5,0 log CFU / feuille avec une variance entre 0,23 et 2,5 suivant le jeu de données.

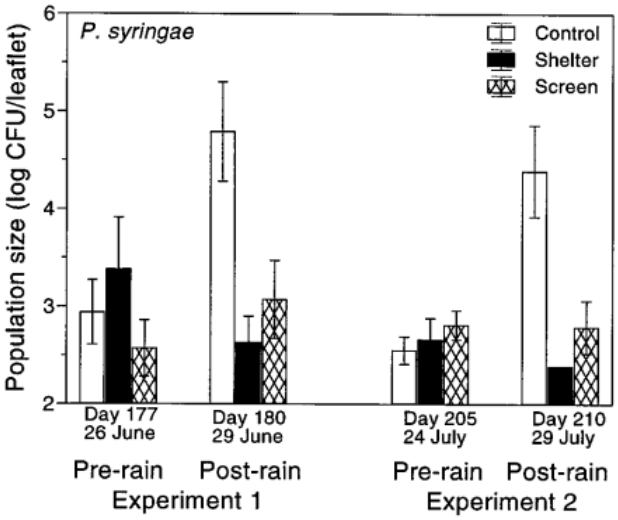


Figure I-15. Effet de la pluie sur la taille des populations de *P. syringae* à la surface des feuilles de haricot (Hirano *et al.* (1996)
Les auteurs avaient mené deux expériences en plein champs sur des cultures de haricots aux mois de juin et juillet. Les plantes ont soit été exposées à la pluie (*control*), soit abritées avec des plaques de polyéthylène (*shelter*), soir exposées à la pluie ayant passée à travers un grillage de fibres avant de tomber sur la canopée (*screen*). Les données correspondent aux moyennes et aux erreurs standards des tailles log_{10}-transformées.

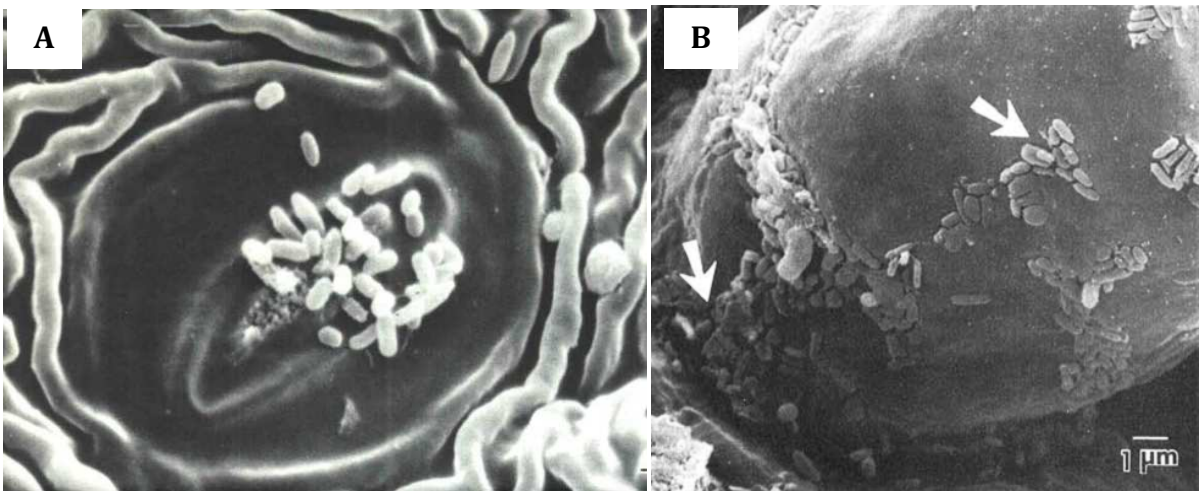


Figure I-16. Observations au microscope électronique à balayage de populations de *P. syringae* à la surface des organes de la plante
(A) Cellules de *P. syringae* pv. *syringae* à l'entrée de la chambre stomacale d'une feuille de prunier. L'échelle représente 1 µm. Micrographie de Hattingh *et al.* (1989). **(B)** Cellules de *P. syringae* pv. *tomato* à la base d'un long trichome non glandulaire de tomate. Micrographie de Getz *et al.* (1983).

Les populations de *P. syringae* autant que celle des micro-organismes composant les communautés microbiennes de la phyllosphère (bactéries, champignons filamenteux, nématodes et protozoaires) ne sont pas distribuées de manière uniforme sur la surface des feuilles. Elles forment des agrégats de cellules souvent associés à des structures spécifiques à la surface de la feuille incluant le réseau de veines, les trichomes, les glandes, les stomates, les spores de champignons ou encore les grains de pollen — exemples donnés dans la Figure I-16-16-16-16. Selon Kinkel (1997), c'est le résultat de la micro-architecture de la plante qui favorise certains mouvements de l'eau pour diriger et concentrer les micro-organismes au niveau de quelques zones.

Une fois implantées à la surface des parties aériennes des plantes — i.e., feuilles, jeunes pousses, fruits et fleurs — les populations de *P. syringae* doivent faire face à un ensemble de stress biotiques et abiotiques. En effet, la phyllosphère est un environnement hostile de par (i) la rareté et les fluctuations de la ressource nutritive, (ii) la compétition et la prédation exercées par la communauté microbienne et (iii) les changements physiques brutaux et extrêmes (Figure I-17). De larges variations de facteurs comme l'exposition aux rayonnements du soleil, la température, l'humidité relative, ou la vitesse du vent peuvent se produire sur des échelles de temps variant de quelques secondes à quelques heures, et de manière hétérogène dans l'espace. Face à des conditions aussi limitantes, il est attendu que des phénotypes particuliers

détournant ces problèmes aient été sélectionnés, tout comme des traits conférant la possibilité à la bactérie de modifier son environnement.

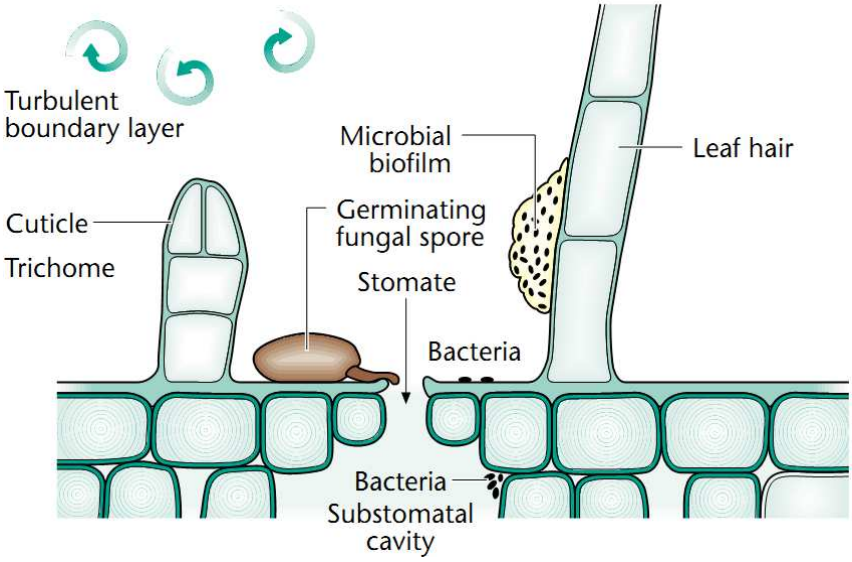


Figure I-17. Représentation schématique des composants majeurs de la phyllosphère en tant qu'habitat (Morris, 2001)
La couche limite autour de la feuille (*boundary layer*) peut mesurer plusieurs millimètres d'épaisseur, amenant à des différences marquées dans les conditions environnementales entre la phyllosphère et l'air ambiant. Les cellules épidermiques sont couvertes par une cuticule qui est le premier point de contact entre microorganismes et la surface de la feuille proprement dite. La phyllosphère présente des caractéristiques topographiques comme des poils, des trichomes glandulaires et des hydathodes, qui sont des sites favorables pour la colonisation microbienne. Les stomates, les hydathodes et les autres ouvertures naturelles permettent le passage des microorganismes entre les membranes internes et externes de la feuille. Les éléments ont été dessinés à l'échelle.

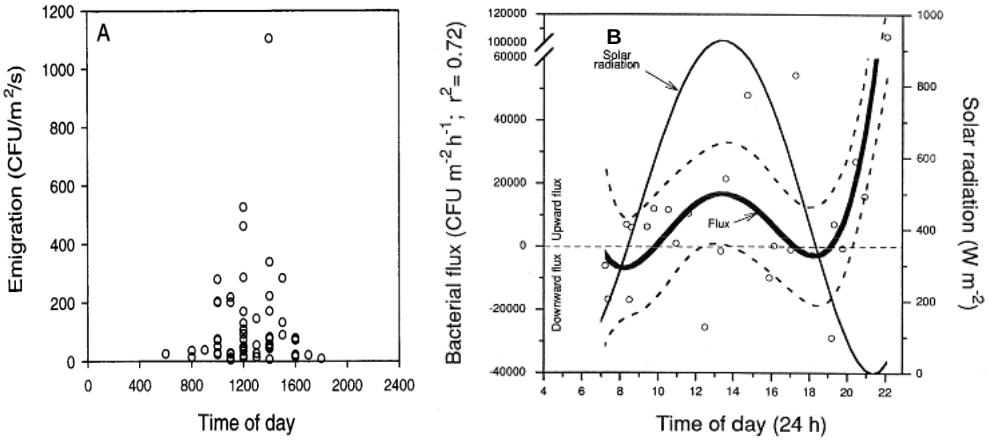


Figure I-18. Deux exemples de caractérisation des tailles des populations de bactéries dans l'atmosphère
(A) Émigration des bactéries à la surface d'une canopée de haricots en fonction de l'heure de la journée, d'après Hirano et Upper (2000). La collecte des aérosols ont été effectuées avec des échantillonneurs de type Andersen et les bactéries ont été énumérées par dilution étalement sur milieu B de King (King *et al.*, 1954). **(B)** Flux bactériens en fonction de l'heure de la journée et des rayonnements du soleil d'après Lighthart et Shaffer (1997).

En plus de la croissance et la mort, deux processus supplémentaires conditionnent la phase épiphyte d'une bactérie: l'immigration (arrivée de propagules viables sur la feuille) et l'émigration (perte physique de propagules viables) (Kinkel, 1997). Tout deux caractérisent la dispersion du micro-organisme qui dépend de facteurs tels que la température, les rayonnements du soleil, l'humidité relative ou encore la force du vent. Une bactérie en suspension dans l'atmosphère peut se déposer sur la surface des feuilles par sédimentation, impaction ou sous l'action des gouttelettes de pluie (Gregory, 1961). L'occurrence des bactéries épiphytes dans l'atmosphère n'est plus à démontrer et a été le fruit de beaucoup de recherche (voir synthèse de Burrows *et al.* (2009b)). L'émigration des bactéries épiphytes comme *P. syringae* peut se produire sous l'action du vent ou des projections d'eau du aux impacts des chutes de pluie tout comme pour les mécanismes d'immigration. Mais des mouvements ascendants de bactéries sur des couverts végétaux peuvent également être créés par des flux de chaleur sensible (Lighthart, 1997). Plusieurs études ont mis en évidence des émissions de bactéries et de *P. syringae* dans l'atmosphère, ainsi que leurs variations diurnes et annuelles (Constantinidou *et al.*, 1990; Hirano and Upper, 2000; Lighthart, 1999; Lindemann *et al.*, 1982; Shaffer and Lighthart, 1997; Tong and Lighthart, 2000). La Figure I-18-18-18-18-18 montre cette variabilité journalière des concentrations de bactéries épiphytes au dessus d'un couvert végétal de haricots, et illustre aussi ce lien entre flux bactérien et rayonnement solaire incident. Selon Lighthart (1999), ces variations suivent les cycles journaliers et annuels solaires (Figure I-19 et Figure I-20).

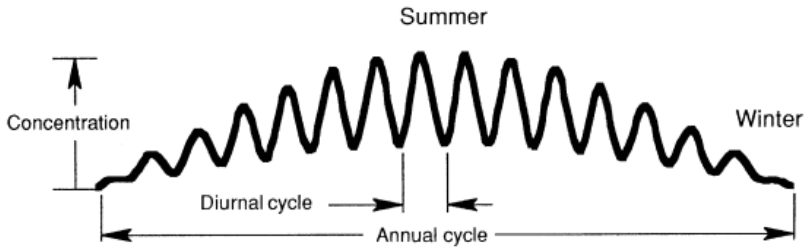


Figure I-19. Représentation de la dynamique hypothétique des populations des bactéries de l'atmosphère (ligne noire) dans la zone inférieure de la troposphère à un temps et une zone donnée (Lighthart, 1999)

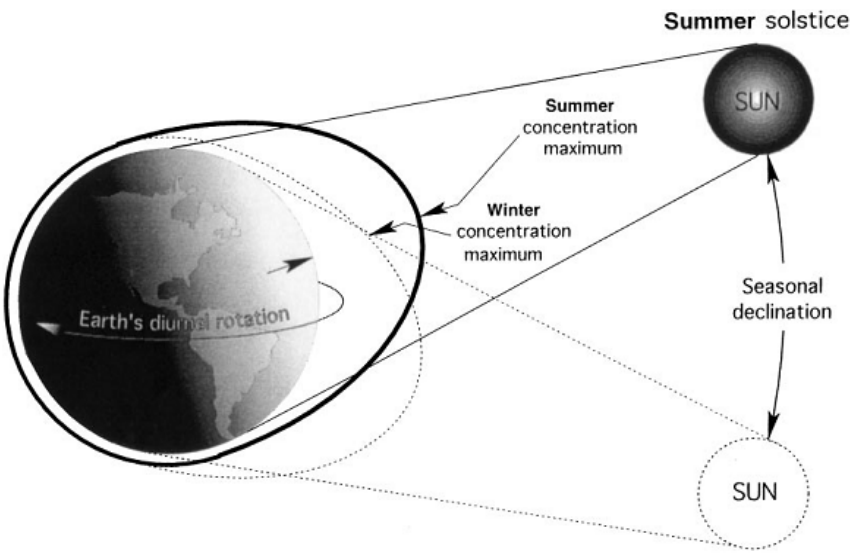


Figure I-20. Représentation de la dynamique hypothétique des populations des bactéries de l'atmosphère dans la zone inférieure de la troposphère en fonction des solstices d'hiver et d'été dans l'hémisphère nord (Lighthart, 1999)

Si plusieurs travaux avaient caractérisés *P. syringae* dans les aérosols, d'autres comme ceux de Sands *et al.* (1982) puis un peu plus tard Constantinidou *et al.* (1990), avaient mis en évidence sa déposition à travers la pluie. *P. syringae* étant connue pour ses propriétés glaçogènes depuis les travaux de Maki *et al.* (1974) et ceux de Vali *et al.* (1976). Ces observations avaient fait émerger l'idée d'une possible existence d'un cycle biologique par lequel la colonisation des plantes par des bactéries glaçogènes comme *P. syringae*, contribue à déclencher des processus atmosphériques essentiels pour la précipitation, qui à son tour favorise la croissance des végétaux des microorganismes (Sands *et al.*, 1982). Il ne s'agissait plus de considérer le rôle de la pluie uniquement dans la dispersion locale des bactéries sur la plante avec les projections de gouttes de pluie, mais du transport par les nuages. Malgré ces hypothèses concernant le rôle de *P. syringae* dans les processus atmosphériques, les études sur *P. syringae* ont resté focalisées, jusqu'au milieu des années 2010s, sur le contexte de l'hôte. Dans un premier temps, Riffaud et Morris (2002) ont mis en évidence les populations de *P. syringae* pv. *aptata* dans les eaux d'irrigation et ont suggéré leur rôle comme source d'inoculum pour les cultures de Melon. Un peu plus tard, Morris *et al.* (2007) ont exploré d'autres niches susceptibles de porter *P. syringae* et l'ont trouvé dans les biofilms épilithiques[13] suivant des densités supérieures à 6000 cellules / g en France et aux USA. L'hypothèse d'un

[13] Sur des roches dans immergées dans les rivières

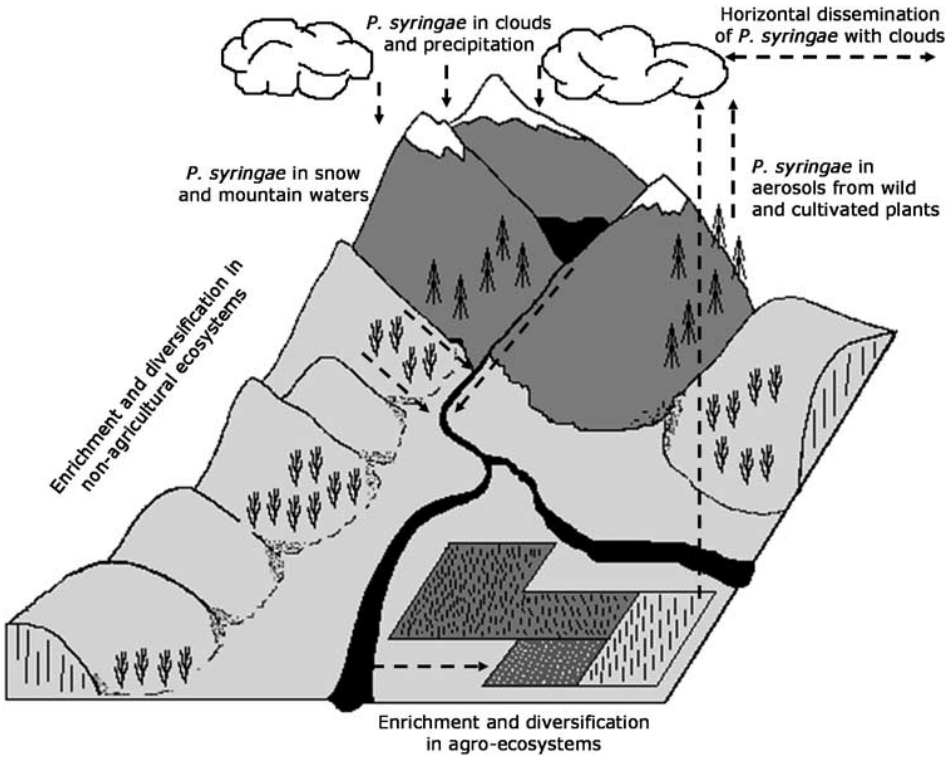


Figure I-21. Cycle de vie hypothétique de *P. syringae* (Morris *et al.*, 2008)

transport de *P. syringae* sur plusieurs kilomètres a été soutenue confirmée quelques années plus tard grâce notamment aux travaux de Amato *et al*. (2007a). En effet, les auteurs avaient isolé des bactéries de l'eau des nuages au sommet du Puy de Dôme, dont le séquençage d'un gène d'ADNr 16S affiliait deux isolats aux pathovars *P. syringae* pv. *coryli* et *P. syringae* pv. *atropurpurea.*

Forts de ces observations, Morris *et al.* (2008) ont élargi leur échantillonnage à d'autres écosystèmes et ont détecté *P. syringae* dans les rivières, la neige pérenne, les précipitations, les lacs alpins ou encore les plantes subnivales sauvages. Pour la première fois, ils mettaient en évidence l'omniprésence des populations de *P. syringae* et la présence de clones de la même lignée dans les substrats agricoles et non agricoles sur différents continents, les conduisant à proposer une histoire de vie de la bactérie dirigée par le cycle environnemental de l'eau. Selon cette histoire de vie, les populations épiphytes de *P. syringae* sont émises dans l'atmosphère, transportées à des altitudes de plusieurs dizaines de kilomètres dans les nuages par lesquels elles se disséminent sur longue distance. Elles regagnent la végétation à travers les précipitations de neige ou de pluie, ou grâce au ruissellement résultant de l'ensemble des écoulements du bassin versant (Figure I-21). L'analyse de la diversité génotypique et phénotypique, de la

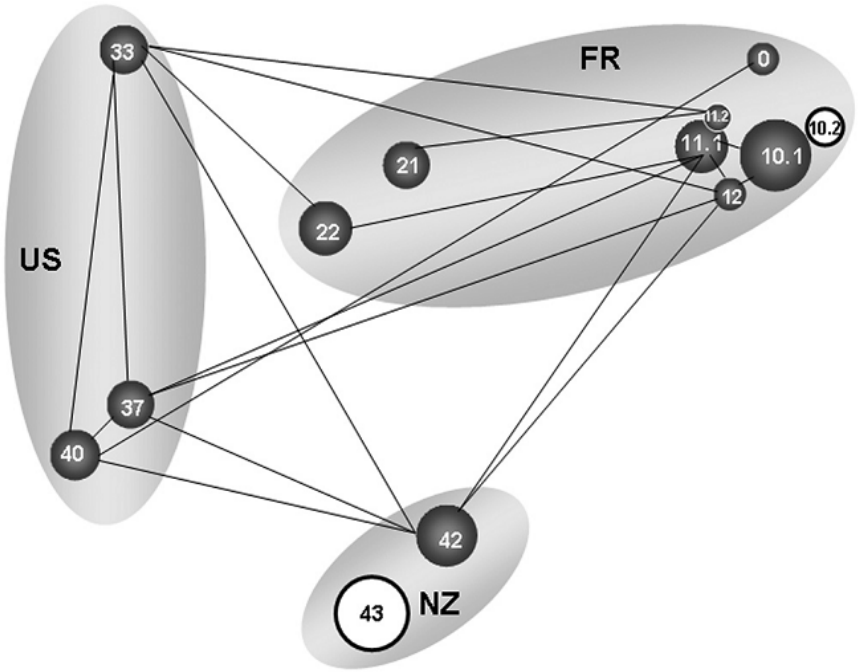


Figure I-22. Similarité génétique des populations de *P. syringae* isolées de plusieurs rivières travers le monde (Morris *et al.*, 2010)
Les tailles des populations sont représentées par des cercles de taille proportionnelle. Les nombres dans les cercles codent pour des sites échantillonnés aux États-Unis (US), en France (FR) et e Nouvelle Zélande (NZ). Les structures génétiques des populations liées par une ligne noire ne sont pas significativement différentes (F_{st} test, $p > 0,05$), alors que celles non liées le sont (F_{st} test, $p \leq 0,05$). Les cercles blancs entourés de noirs représentent les structures des populations qui sont significativement différentes de celles de l'ensemble des autres populations de l'étude.

structure génétique et de la biogéographie des populations de *P. syringae* dans plusieurs eaux de source sur trois continents par Morris *et al.* (2010) a montré combien ces environnements ont été surestimés dans l'écologie de l'espèce. Non seulement il y avait de forts échanges au sein de la metapopulation, ainsi qu'entre habitats non agricoles et cultures (Figure I-22), mais en plus elle été composée d'une large gamme de phénotypes dont ceux généralement associés aux épidémies dans les cultures.

Cette nouvelle vision de l'histoire de vie de la bactérie *P. syringae* est la première pour l'ensemble des micro-organismes phytopathogènes. Pourtant la détection d'autres agents comme *Pectobacterium carotovorum*, *Pantoea agglomerans* ou encore *Botrytis cinerea* et *Fusarium* spp. dans les nuages (Amato *et al.*, 2007a) et dans l'eau de rivière (Franc, 1988), suggère une histoire de vie similaire pour d'autres organismes phytopathogènes.

II. Les traits de *P. syringae* qui pourraient être impliqués dans sa dissémination le long du cycle de l'eau

Se disséminer via le cycle de l'eau signifie que *P. syringae* doit disposer des traits nécessaires pour s'adapter aux changements soudains et extrêmes de son environnement. En effet, les nuages, la neige, l'eau, la végétation ou encore le sol — dont le rôle dans la dissémination de *P. syringae* n'a jusqu'ici été que très peu considéré — offrent une gamme de conditions très variées en terme de température, de qualité et disponibilité en nutriments, de composition chimique, d'osmolarité, d'humidité, de pH ou encore d'illumination. De plus, ces environnements abritent des communautés microbiennes résidentes et passagères qui pourraient agir sur la survie, la multiplication et la dissémination des populations de *P. syringae*. Cette section propose donc une synthèse sur l'ensemble des traits identifiés à ce jour chez *P. syringae* qui pourraient être importants dans son histoire de vie liée au cycle de l'eau, mais également un ensemble d'hypothèses sur ceux qui pourraient lui être importants.

II.1. Quelques caractéristiques générales du génome de *P. syringae*

Dans sa globalité le génome de *P. syringae* se caractérise par un chromosome circulaire entre 5,9 et 6,5 Mbp Certains pathovars possèdent plusieurs plasmides (i.e., 2 pour *P.s.* pv. *tomato* et *phaseolicola*, 4 à 6 pour *aesculi*) et d'autres comme *P. syringae* pv. *syringae* n'en possèdent pas. Globalement, le génome contient environ 5000 gènes dont un minimum de 30 % sont spécifique au pathovar (Baltrus *et al.*, 2011; Buell *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2010; Feil *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2010; Joardar *et al.*, 2005; Reinhardt *et al.*, 2009). A ce jour, environ 26 génomes complets d'une vingtaine de pathovars sont disponibles dans les bases de données — c.f. Tableau II-1 pour leur nom, leur position phylogénétique, la méthode de séquençage et les références associées. Les travaux ayant publié les analyses de ces génomes se sont focalisées sur les facteurs de virulence et les déterminants de la gamme d'hôte.

Tableau II-1. Liste des souches de *P. syringae* dont le génome complet à été séquencer et publié avant septembre 2011

Souche[a]	Pathovar	GP[b]	Méthode de séquençage[c]	Référence
*Pto*DC3000	*tomato*	1	Sanger	Buell *et al.* (2003)
*Psy*B828a	*syringae*	2	Sanger	Feil *et al.* (2005)
*Pph*1448A	*phaseolicola*	3	Sanger	Joardar *et al.* (2005)
*Pto*T1	*tomato*	1	454/Illumina	Ameida *et al.* (2009)
*Psy*642	non pathogène	2	Illumina PE	Clarke *et al.* (2010)
*Pta*11528	*tabaci*	3	Illumina PE	Green *et al.* (2010)
*Pae*3681	*aesculi*	3	Illumina PE	Green *et al.* (2010)
*Pae*2250	*aesculi*	3	Illumina PE	Green *et al.* (2010)
*Pae*P6617	*aesculi*	3	Illumina PE	Green *et al.* (2010)
*Pae*P6623	*aesculi*	3	Illumina PE	Green *et al.* (2010)
*Psv*3335	*savastanoi*	3	454/454 PE	Rodriguez-Palenzuela *et al.* (2010)
*Por*I_6	*oryzae*	4	454/454 PE/Illumina	Reinhardt *et al.* (2009)
Pgy R4	*glycinea*	3	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pmo	*mori*	3	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pta	*tabaci*	3	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pae	*aesculi*	3	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pla 107	*lachrymans*	3	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Cit7	*NA*	2	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pac	*aceris*	2	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Ppi R6	*pisi*	2	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pja	*japonica*	2	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Ptt	*aptata*	2	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pma	*maculicola*	1	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pla 106	*lachrymans*	1	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pmp	*morsprunorum*	1	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)
Pan	*actinidiae*	1	454/Illumina	Baltrus *et al.* (2011)

[a] Le nom des souches de Baltrus *et al.* (2011) correspond à un identifiant et non pas à leur nom dans les bases de données.
[b] Groupe Phylogénétique sur la base de l'analyse MLST des 7 gènes de ménage par Sarkar et Guttman (2004)
[c] PE pour *Paired-End* : lorsque deux séquences d'ADN ont été obtenues avec le même fragment d'ADN

II.2. L'adaptation à l'environnement nutritionnel

P. syringae possède les gènes impliqués dans les fonctions vitales comme ceux de la glycolyse, néoglucogenèse, des acides tricarboxyliques, et les cycles du pentose phosphate qu'elle partage avec des espèces proches comme *P. aeruginosa, P. fluorescens* ou *P. putida* (Figure II-1). Il y a une grande variabilité entre espèces et pathovars en ce qui concerne les réactions impliquées dans le métabolisme de l'azote, le catabolisme des acides aminés, le métabolisme de aminophosphanate, celui des séléno-aminoacides, et ceux du glyoxylate et dicarboxyate (Mithani *et al.*, 2011).

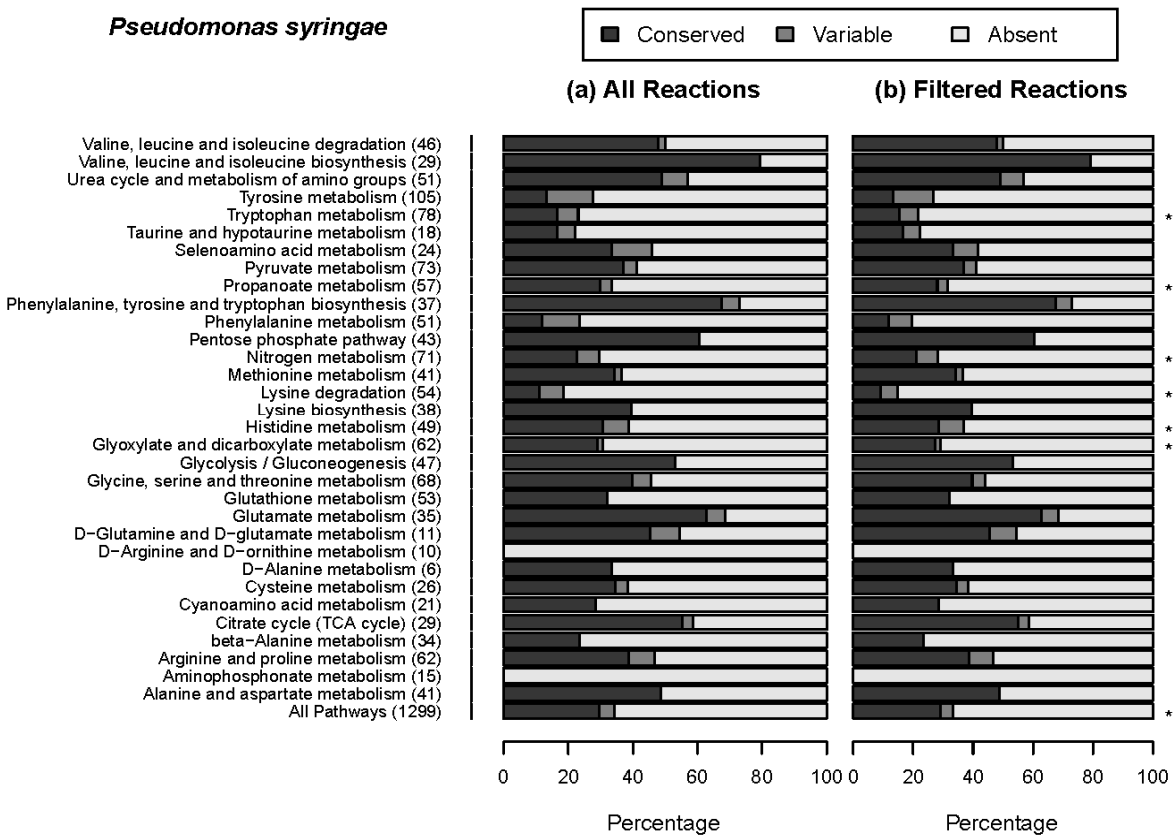


Figure II-1. Ensemble des réactions conservées, variables et absentes de plusieurs voies métaboliques (KEGG[14]) chez les souches de *P. syringae* (Mithani *et al.*, 2011)
La proportion de chaque réaction est déterminée sur les trois souches 1448a, DC3000 et B728a pour 32 voies métaboliques impliquées dans l'assimilation d'acides aminées et la biosynthèse des carbohydrates et dans le métabolisme énergétique (a) avec et (b) sans filtrage d'apparenté[15]

D'après l'ensemble des tests réalisés par Sands *et al.* (1970), *P. syringae* semble pouvoir dégrader moins de sources de carbone que ses relatifs saprophytes du même genre comme *P. flurorescens*. Des analyses de la présence de différentes voies métaboliques données dans la Figure II-2, à travers l'analyse de 9 génomes par Mithani *et al*. (2011) confirmaient ces observations et suggéraient que l'ancêtre de *P. syringae* avait perdu un ensemble de fonctions par adaptation à sa vie épiphyte (Figure II-2).

Tous les compartiments du cycle de l'eau offrent de la matière organique biodisponible mais ils ne sont pas égaux en termes de quantité et qualité de substrat disponibles. Par exemple, l'eau de rivière (Berggren *et al.*, 2010; Bernal *et al.*, 2002; Romani *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009b) et des nuages (Marinoni *et al.*, 2004) ne

[14] ***K**yoto **E**ncyclopedia of **G**enes and **G**enomes*
[15] Les réactions appartenant à des voies métaboliques différentes mais étant apparentées, on été éliminées. Deux réactions sont considérées comme étant apparentées si elles partagent au moins un métabolite. Lorsque le filtrage change le nombre de gènes conservés de manirèe significative, les voies sont annotés d'une étoile.

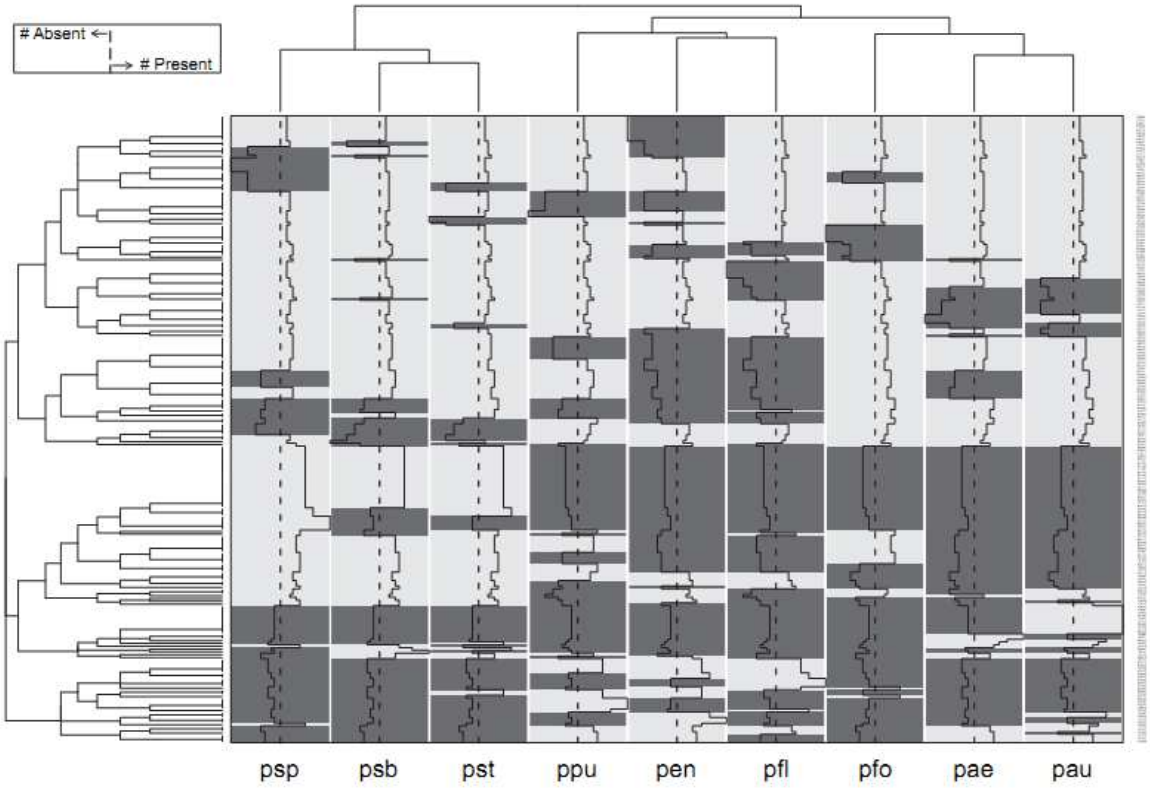


Figure II-2. Regroupement sur la base de la présence/absence de 224 réactions impliquées dans 32 voies métaboliques ayant montré des distribution différentes pour les 9 souches de *Pseudomonas* spp. (Mithani *et al.*, 2011)
Les distances euclidiennes ont été calculées pour évaluer les dissimilarités entre souches. La procedure avait été faite sur les enzymes et avaient montré des distributions variables également. L'abbréviation des souches correspondent à : **pae**: *P. aeruginosa* PAO1, **pau**: *P. aeruginosa* PA14, **pen**: *P. entomophila* L48, **pfl**: *P. fluorescens* Pf-5, **pfo**: *P. fluorescens* PfO-1, **ppu**: *P. putida* KT2440, **psb**: *P. syringae* pv. syringae B728a, **psp**: *P. syringae* pv. phaseolicola 1448A, and **pst**: *P. syringae* pv. tomato DC3000.

contiennent que quelques milliers de µg par L de carbone labile comparé à un milieu riche comme les premiers horizons du sol. Ces conditions caractérisent plutôt un milieu oligotrophe.

Ces environnements contiennent des nutriments comme des acides aminés, des acides carboxyliques et des hydrates de carbone que *P. syringae* est capable de dégrader (Figure II-3 pour l'eau de rivière et Figure II-4 pour les nuages). La production primaire est la source majeure de carbone organique labile pour les bactéries dans les eaux douces à travers les exsudats du phytoplancton et leur lyse cellulaire (Berggren *et al.*, 2010). Une partie de la matière organique plus rare et plus récalcitrante est issue du lessivage d'exsudats racinaires et de la décomposition des végétaux. Le stress nutritionnel est donc un des premiers facteurs limitants à la dissémination d'une bactérie au cycle de l'eau. On peut imaginer que le passage de *P. syringae* dans de tels

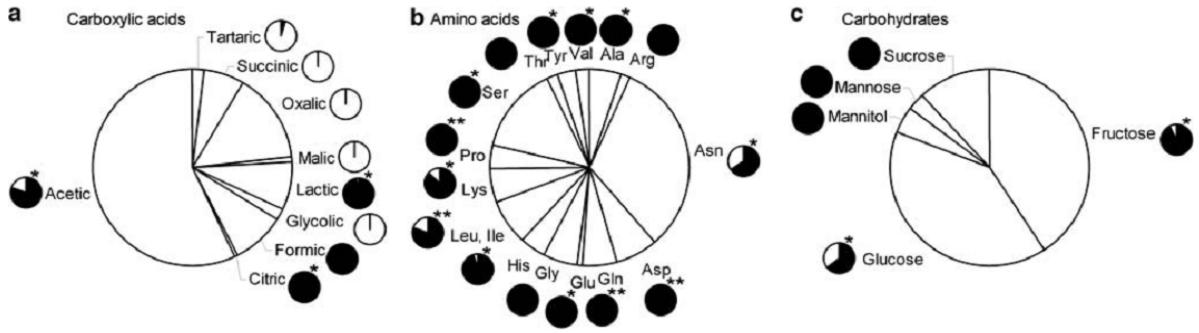


Figure II-3. Composition moyenne en matière organique dissoute de faible poids moléculaire (a) acides carboxyliques, (b) acides aminés et (c) hydrates de carbones dans l'eau de source deux bassins versant du nord de la Suède (Berggren *et al.*, 2010)

Les grands cercles représentent la part relative de chaque substrat dans chaque concentration totale et les petits cercles correspondent à la part disponible à la consommation pour le bactérioplancton. Les étoiles représentent la significativité des consommations de chaque substrat par le bactérioplancton au bout de deux semaines d'essais.

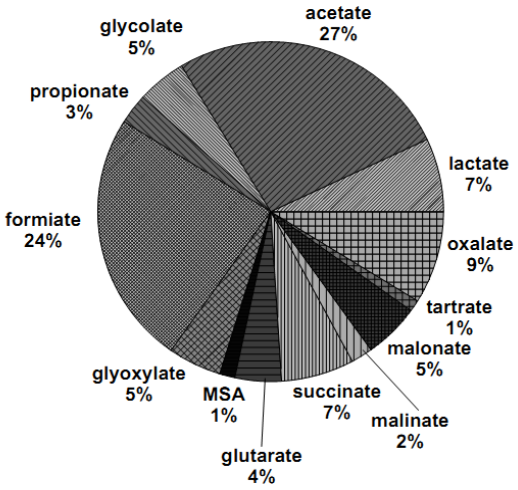


Figure II-4. Composition moyenne en acides carboxyliques dans les gouttes d'eau des nuages du Puy de Dôme (Marinoni *et al.*, 2004)

milieux aurait donc pu sélectionner un métabolisme adapté à des ressources nutritives limitantes caractérisant la phyllosphère et aux molécules de faible poids moléculaire (<1kDa) (Hirano and Upper, 2000; Lindow and Brandl, 2003).

II.3. Les résistances aux conditions physico-chimiques

P. syringae possèdent d'autres traits jouant un rôle dans sa valeur reproductive sur la phyllosphère qui pourraient aussi permettre de résister à un ensemble de stress associés au cycle de l'eau. Sept exemples sont particulièrement pertinents.

(1) Certains pathovars comme *P. syringae* pv. *tomato* disposent d'une batterie de gènes codant pour des enzymes comme les peroxyde dismutases ou catalases, qui permettent de bloquer l'action de composés toxiques pour les bactéries tels que des radicaux superoxides ou hydroxiles et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et aussi de réparer réactiver les enzymes inhibées par l'oxydation (Buell *et al.*, 2003). Ce trait est connu dans le cadre de l'infection des tissus de la plante par *P. syringae* qui peut déclencher un choc oxydatif du à la destruction des tissus et accumuler des radicaux oxygène dans l'apoplaste. Alors que ces processus ont un rôle au sein de la plante et donc dans la virulence, il s'avère qu'ils pourraient également être sélectionnés par d'autres environnements que la bactérie côtoie. En effet, l'atmosphère, les nuages et le manteau neigeux durant l'hiver sont des environnements où le stress oxydatif est permanent à cause des émissions de O^- HO^- et H_20_2 (Amato *et al.*, 2007a; France *et al.*, 2007).

(2) *P. syringae* possède des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (Feil *et al.*, 2005; Sundin and Murillo, 1999) qui codent pour les enzymes comme l'ADN polymérase V réparant les séquences d'ADN endommagées. Les rayonnements incidents du soleil sont néfastes pour les microorganismes de manière générale. La résistance aux UV de *P. syringae* a déjà été abordée pour son rôle dans l'épiphytisme. Mais cette résistance est d'autant plus important dans l'atmosphère et les nuages que le pourcentage d'exposition aux UV augmente avec l'altitude.

(3) En couplant analyses bioinformatiques, chimiques, phénotypiques et spectrométrie de masse, Berti *et al.* (2007) ont mis en évidence la production de lipopeptides linéaires agissant comme des biosurfactants. Tout comme la syringomycine qui est un lipopeptide cyclique (Bender *et al.*, 1999; Hutchison and Gross, 1997), la production de biosurfactants permet d'augmenter l'affinité de *P. syringae* avec l'eau et donc son transport au cours du cycle de l'eau notamment dans le sol. En effet, d'après Jacobs *et al.* (2007) et Gargiulo *et al.* (2008), les espèces bactériennes les plus hydrophiles, étaient celles qui étaient le moins bien retenues par les colonnes de sable. Par contre, d'autres traits comme la production d'exopolysaccharides ont pour effet d'augmenter l'attachement de *P. syringae* aux surfaces (Takashima and Morisaki, 1997) mais également celui d'augmenter la rétention dans le sol d'autres espèce comme *P. aeruginosa* (Liu *et al.*, 2007). Ces facteurs ont été identifiés dans le génome de plusieurs

pathovars de *P. syringae*, tout comme d'autres aussi impliqué dans les mécanismes d'adhésion comme le pili de type IV ou l'hémagglutinine (Joardar *et al.*, 2005). Les facteurs d'adhésion peuvent non seulement permettre d'accéder à un ensemble de substrats, mais aussi de former des agrégats à la surface des roches, du sol ou des particules en suspension.

(4) La température optimale de croissance de *P. syringae*, se situe entre 23°C et 30°C (Hirano and Upper, 1990; Young *et al.*, 1977). Les mesures de croissance bactérienne effectuées par Young *et al.* (1977) montrent que l'ensemble des pathovars de *P. syringae* testés peuvent croître de manière significativement à des températures inférieures à 10°C (Figure II-5). De manière très intéressante, elles étaient capables *in vitro* de se dédoubler à 0 °C toutes les 22h, ce qui selon Igraham (1958), caractérise les micro-organismes tolérants au froid. Cette gamme de température permet donc une possibilité de survivre et croître sur la phyllosphère mais également dans l'eau et le manteau neigeux.

D'autre part *P. syringae* produit également des lipopolysaccharides qui peuvent permettre de lutter contre le froid, notamment aux températures négatives de la troposphère. Face au froid, les bactéries peuvent aussi produire des protéines « anti gel » qui sont encore mal connues mais dont la structure est similaire aux protéines responsables de l'activité glaçogène décrite chez *P. syringae*. Feil *et al.* (2005) identifié un gène homologue chez *P. syringae* codant pour une protéine antigel Afp de *P. putida*.

(5) Même si les gènes *ina* confèrent un avantage au niveau du pouvoir pathogène de *P. syringae*, ce trait pourrait également être sélectionné dans l'atmosphère à travers son rôle dans la « bioprécipitation » (Morris *et al.*, 2004; Sands *et al.*, 1982). En effet d'après les études d'un ensemble d'auteurs comme Gregory (1961), Rodhe et Grandell (1972) ou Bauer *et al.* (2003), le processus de nucléation serait le moyen le plus efficace pour une bactérie comme *P. syringae*, d'être déposé à la surface de la Terre une fois émise dans l'atmosphère. Les gènes *ina* seraient donc nécessaires à la poursuite de la dissémination de longue distance de *P. syringae* dont la présence a été reporté dans le génome de plusieurs pathovars (Feil *et al.*, 2005; Joardar *et al.*, 2005), tout comme l'expression du phénotype (Hirano and Upper, 2000). Au-delà du rôle dans la déposition à la surface de la Terre par les précipitations, on peut supposer que le fait de disposer de

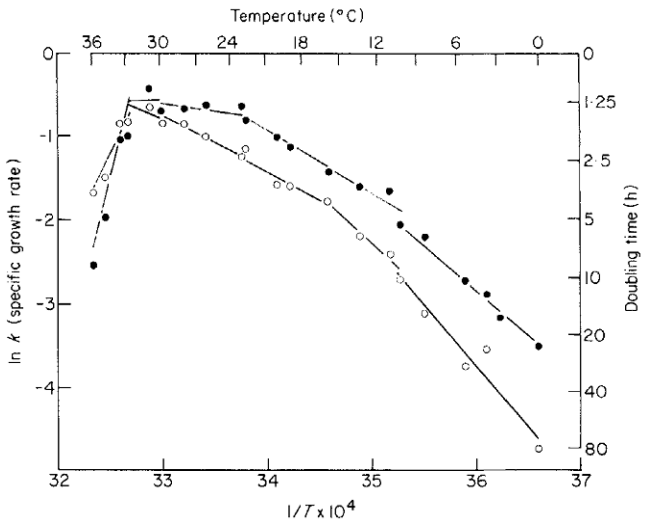


Figure II-5. Taux de croissance *k* (lignes noires) et temps de doublement, de *P. syringae* (●) et *Xanthomonas pruni* (○) en fonction de la température d'incubation (Young *et al.*, 1977)

Les courbes de régression ln *k* ont été calculées séparément pour chaque gamme de température — de 0,0 à 10,0°C ; 10,0 à 16,1 ; 16,1 à 22,6°C ; 22,6 à 30,0°C ; 30,0 à 32,8°C et de 32,8 à 36°C — et suivant l'équation d'Arrhenius. La croissance bactérienne a été déterminée grâce à des mesures de turbidité au cours du temps, dans des tubes d'eau distillée contenant une source nutritive — peptone extrait de levure. Les auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet consistent dans les temps de doublement entre isolats de la même espèce.

telles protéines peut être un moyen de contrôler la formation de glace à l'extérieur des parois cellulaires et donc d'éviter les pressions mécaniques exercées par la glace.

(6) Feil *et al.* (2005) ainsi que Buell *et al.* (2003) ont déjà identifié des gènes codant pour des enzymes synthétisant des solutés comme la bétaine ou l'ectoine. De tels composés permettent de stabiliser les membranes et de protéger d'autres enzymes quand les conditions d'humidité sont trop faibles. Ce trait pourrait conférer une résistance à la réduction de l'eau disponible pour *P. syringae* (ou l'osmotolérance) qui est un élément important dans la phyllosphère mais également lors de son transport à travers l'atmosphère.

(7) L'analyse du génome de *P. syringae* pv. *tomato* a non seulement mis en évidence plus de 12% de gènes associés à la régulation, la transduction de signaux et la

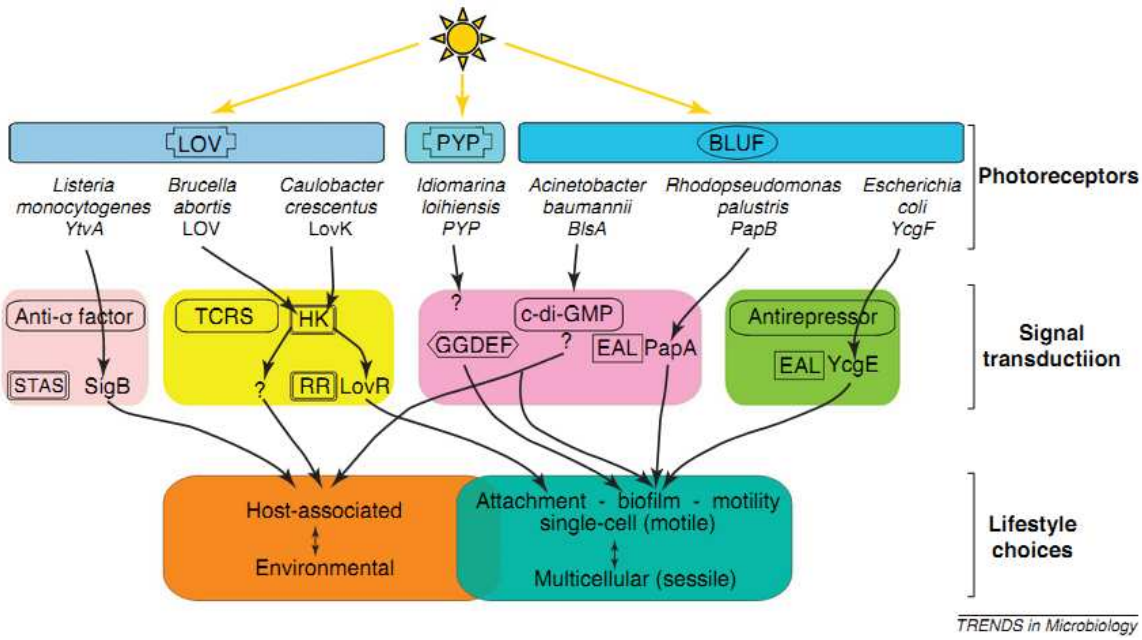


Figure II-6. Illustration des voies qui permettent aux bactéries d'utiliser la lumière pour faire des choix de mode de vie (Gomelsky and Hoff, 2011)

LOV, PYP[16] et BLUF[17] correspondent à des domaines récepteurs de la lumière bleue qui sont associés à des systèmes régulateurs à deux composants de type Histidine Kinase. Leur activation entraîne une voie de signalisation modulant l'expression de certains gènes.

transcription (Buell *et al.*, 2003), mais également des senseurs de type histidine kinase activés par les longueurs d'ondes émises dans les 450 nm par un domaine LOV[18] et associé avec un régulateur (Cao *et al.*, 2008; Swartz *et al.*, 2007). Ces senseurs sont généralement impliqués dans la régulation de l'expression de fonctions comme le chimiotactisme et la virulence. La présence d'un tel domaine sensible à la lumière bleue chez *P. syringae* indique que la lumière est un facteur clé dans la régulation de certains de ces gènes. Chez d'autres bactéries, ce type de senseur par la lumière est responsable de l'induction de plusieurs mécanismes (Figure II-6). Par exemple, il augmente l'attachement aux surfaces chez les α-Protéobactéries des eaux douces *Caulobacter crescentus* augmente la virulence de certains pathogènes opportunistes humains comme *Acinetobacter baumannii* (Gomelsky and Hoff, 2011). Etant donné que la lumière bleue est celle qui passe le mieux à travers l'eau, on peut supposer que de tels senseurs pourraient aider à l'adaptation de *P. syringae* au milieu aquatique.

---

[16] PYP (*photoactive yellow protein*) est un domaine d'un récepteur sensible à la lumière bleue contenant un chromophore de type acide p-coumarique.

[17] BLUF (*blue light sensing using FAD*) une famille de protéines senseurs sensible à la lumière bleue et qui utilise un chromophore de type flavine et contenant un pli FAD-binding

[18] LOV (*light, oxygen, and volatage*) est un domaine d'un récepteur sensible à la lumière bleue contenant un chromophore flavine.

En effet, selon Cases *et al.* (2003) leur style de vie peut être déterminé à partir du nombre de protéines impliquées dans la transcription. Cette taille pourrait être expliquée par le fait que la bactérie soit dans un environnement instable et changeant et qu'elles auraient alors besoin d'un ensemble de protéines régulatrices pour répondre de manière efficiente, et qu'elles intégreraient des signaux environnementaux comme des changements physico-chimiques ou la quantité et la qualité des nutriments.

II.4. Gestion des interactions avec d'autres microorganismes

P. syringae produit un ensemble d'antibiotiques par la voie de synthèse des polyketides et peptides comme la mupirocine (acide pseudomonique), la pyoluterorine et 2,4-diacetyl-phloroglucinol (Bender *et al.*, 1999), qui peuvent lui permettre d'être résistante aux agressions des autres microorganismes. Plusieurs souches possèdent également des résistances à la streptomycine, la gentamycine, la kanamycine, la tetracycline ou encore l'acide oxolinic (Morris *et al.*, 2007). De tels traits sont favorables quelque soit l'environnement considéré.

Alors que le système de sécrétion de type III est un déterminant du pouvoir pathogène, il pourrait permettre à *P. syringae* d'assurer d'autres fonctions le long du cycle de l'eau. Par exemple l'acquisition d'un îlot de pathogénicité de ce type chez *Vibrio parahaemolyticus,* un pathogène de l'Homme, lui confère un avantage contre la prédation par les protistes du plancton marin (Matz *et al.*, 2011). Comme discuté dans la synthèse de Pallen *et al.* (2005), le T3SS a été découvert chez beaucoup de bactéries « environnementales » de l'eau et du sol comme *Desulfovibrio vulgaris* qui est une sulfato-réductrice anéarobie, *Myxococcus xanthus* qui n'a jamais eu de lien avec quelconque maladie, ou encore *Verrucomicrobium spinosum*, bactérie hétérotrophe des milieux aquatiques eutrophisés. L'association du T3SS avec des styles de vie non associés aux maladies de plantes et animales, suggèrent que ce dernier serait d'abord un moyen d'interaction des bactéries avec les eucaryotes « primitifs » avant de l'être avec les végétaux supérieurs ou les animaux. Dans le cas de *P. syringae*, on peut supposer que le T3SS aurait un autre rôle également contre la prédation ou dans les interactions avec le phytoplancton.

TRAVAUX DE RECHERCHE

Chacun des chapitres suivants correspond à mes travaux de recherche sur les différentes parties du cycle de vie de *P. syringae*. Ils sont tous introduit en français, puis ils sont suivis d'un article en anglais ayant été soumis à un journal ou en cours d'élaboration. Enfin, un paragraphe à la fin de chaque chapitre permet d'apporter des résultats complémentaires et de faire une synthèse des avancées produites dans le cadre de la thèse. Les références de chaque article ont été regroupées dans la bibliographie générale à la fin de ce document.

Les travaux présentés dans ces chapitres ont été réalisés grâce à un important effort d'échantillonnage dans les Alpes du Sud et en basse Durance qui a permis de collecter plus de 310 échantillons (de neige, de pluie, de sol, d'eau et de végétation sauvage) et dont la majeure partie a été analysée d'un point de vue de leur chimie. Les tailles des populations des bactéries totales cultivables et de *P. syringae* ont été déterminées sur chacun d'eux et plus de 4100 souches ont été mises en collection pour être ensuite caractérisées.

I. Caractérisation de la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux, rôle d'autres intrants (i.e., populations autochtones) contribuant aux populations dans la neige

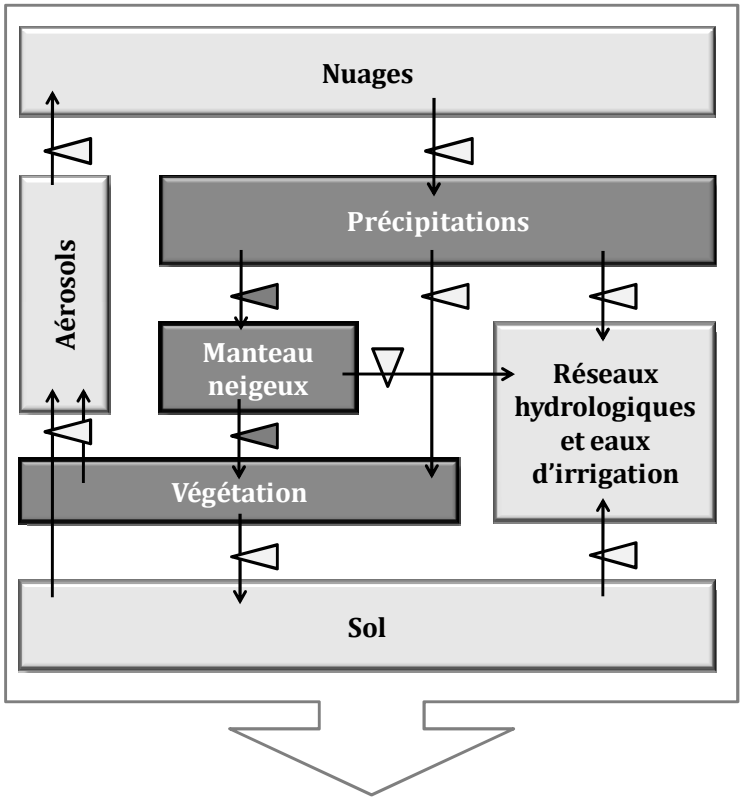
I.1. Introduction

Le premier compartiment du cycle de l'eau sur lequel j'ai focalisé ma recherche est le manteau neigeux. Cette recherche a été fondée sur trois observations précédentes : (i) Morris *et al.* (2008) ont été détecté *P. syringae* dans le manteau neigeux et la neige fraîche, (ii) le manteau neigeux est un participant majeur à l'alimentation des réseaux hydrologiques dans les moyennes et hautes latitudes et (iii) des millions de km^2 sont couverts par la neige au moins trois mois dans l'année en Europe (Edwards *et al.*, 2007).

L'objectif de ma recherche était d'évaluer la structure des populations dans le manteau neigeux dès qu'il se soit mis en place (à partir de du mois de mars) et d'évaluer le rôle des précipitations et des autres intrants possibles dans cette structure. Dans cette optique, deux campagnes d'échantillonnage ont été menées en 2009 et 2010 sur 4 sites des Alpes du Sud (illustrations de la page 232 à 234) à travers lesquelles nous avons testé les hypothèses suivantes :

- *P. syringae* est présente dans le manteau neigeux quelque soit la date et le site.
- La taille des populations est homogène avec la profondeur du manteau neigeux
- Les intrants majeurs sont les précipitations de neige.
- La diversité génotypique et phénotypique représente seulement quelques lignées génétiques et traits de vie liés au pouvoir pathogène.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article soumis en août 2011 à *Environmental Microbiology* (qui aborde les compartiments du cycle de l'eau colorées en gris foncé dans le diagramme ci-dessous).



Prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations d'un bassin versant

RÉSUMÉ

La récente découverte de l'ubiquité de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* dans les eaux de source et les écosystèmes alpins dans le monde entier ouvre de nouveaux champs d'investigation sur l'écologie et l'évolution de cette espèce bactérienne et les conséquences ultérieures pour l'épidémiologie des maladies. En raison de la contribution majeure de la neige à eaux de ruissellement pendant la croissance des cultures, nous avons évalué la dynamique des populations de *P. syringae* dans la neige et de la litière sous-jacente pendant deux ans sur quatre prairies des Alpes du Sud. En plus d'avoir révélé les densités de population élevées de *P. syringae* sur les herbes des prairies alpines (environ 10^9 bactéries m^{-2}), cette étude a démontré que la litière de feuilles est la principale source des populations de *P. syringae* dans la neige, contribuant plus que les populations arrivant avec des chutes de neige. Les propriétés isolantes de la neige favoriseraient la survie de *P. syringae* tout l'hiver dans la couche de 10 cm de neige la plus proche du sol. La litière et le manteau neigeux étaient caractérisés par une grande diversité génétique de *P. syringae,* et de phénotypes qui représentaient un large éventail de capacités en termes d'activité glaçogène, de

production de toxines, et de pouvoir pathogène. Ni le compartiment, ni le site d'échantillonnage, n'avait un effet marqué sur la structure des populations de *P. syringae*. De plus la neige et la litière avaient des génotypes en commun avec d'autres habitats non agricoles et les cultures. Ces résultats contribuent à l'accumulation de preuves que la metapopulation de *P. syringae* est très diversifiée et facilement disséminée à travers les bassins versants entre les zones cultivées et non cultivées.

I.2. Article soumis à *Environmental Microbiology*

Leaf litter in alpine prairies is a reservoir of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* contributing to its dynamics in snowpack.

Caroline L. MONTEIL[1], Caroline GUILBAUD[1], Catherine GLAUX[1], François LAFOLIE[2], Samuel SOUBEYRAND[3], and Cindy E. MORRIS[1]*

[1] INRA, UR407 de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, BP. 94, 84140 Montfavet cedex, France.

[2] INRA, UMR 1114 EMMAH, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

[3] INRA, UR546 Biostatistique et Processus Spatiaux, F-84914 Avignon, France

Subject category: Microbial population and community ecology

Key words: ice nucleation activity, epidemiology, microbial ecology, population genetics

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 32 72 28 41; fax: +33 (0)4 32 72 28 42; E-mail: Cindy.Morris@avignon.inra.fr

ABSTRACT

The recently discovered ubiquity of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in headwaters and alpine ecosystems worldwide opens new fields of investigation about the ecology and evolution of this bacterial species and the subsequent consequences for disease epidemiology. Because of the major contribution of snow to river run-off during crop growth, we evaluated the population dynamics of *P. syringae* in snowpack and the underlying leaf litter during two years at four sites of the Southern French Alps. In addition to revealing the high population densities of *P. syringae* on alpine grasses (ca. 10^9 bacteria m^{-2}), this study has demonstrated that leaf litter is the main source of populations of *P. syringae* in snowpack, contributing more than the populations arriving with the snowfall. The insulating properties of snow foster survival of *P. syringae* throughout the winter in the 10 cm layer of snow closest to the soil. Litter

and snowpack harbored a large genetic diversity of *P. syringae* and phenotypes representing a wide range of capacities in terms of ice nucleation activity, production of toxins, and pathogenicity. Neither substrate nor sampling site had a marked effect on the structure of *P. syringae* populations, and snow and litter had genotypes in common with other non agricultural habitats and with crops. These results contribute to the mounting evidence that a highly diverse *P. syringae* metapopulation is readily disseminated throughout catchment basins between cultivated and non cultivated zones.

INTRODUCTION

The development of disease management practices has been almost exclusively based on the biology, ecology and genetics of plant pathogens in relation with the crop host or the environment surrounding the crop (agriculture *sensu stricto*). However, plant pathologists are realizing the insufficiency of this agro-centric view and its incompatibility with sustainable agriculture. Extending the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries is seen as a means to an alternative view of plant disease epidemiology (2009). Recent publications on the life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* are the first to formally demonstrate the ubiquity of a plant pathogen in non-agricultural substrates and to propose a life history framework well beyond agricultural contexts, in this case in close association with the water cycle (Morris *et al.,* (2010; 2008)). In addition to cultivated plants, *P. syringae* is frequently found in rain and cloud water, in alpine rivers, in wild plants and in seasonal snowpack. Headwaters worldwide harbor *P. syringae* populations with different combinations of phenotypes in different climatic and geologic contexts. The whole of these observations has raised novel questions about how each substrate of the water cycle structures the pathogenic population and how transfer from one substrate to another can affect the population dynamics and diversification of *P. syringae*.

In this present study we have focused on the sub-alpine environment and especially on the fate of *P. syringae* in snowpack covering leaf litter. Snowfall and the resulting snowpack are immense reservoirs of water and therefore are potential reservoirs for the bacterium. Snowfalls represent 12.5×10^3 km^3 of water / year which corresponds to between one quarter and one third of the total annual freshwater

discharge (Oki and Kanae, 2006). In certain valleys of the United States, such as the Green Valley in Colorado, snowfalls can constitute as much as 80% of total precipitation (Brooks and Williams, 1999). Approximately one-third of the Northern Hemisphere land area (40 million km^2) is blanketed with snow cover for at least three months per year. Moreover, in middle and high latitude areas, snowmelt is a major source of runoff for irrigating crops. In Europe in particular, alpine headwater streams contribute water to four major rivers, the Danube, Rhine, Rhone, and Po, draining a total land area of 1.1 million km^2 entering coastal waters and discharging 4.37×10^{15} liters of water annually (see review by Edwards *et al.* (2007)).

Numerous studies have reported on microbial presence and activity in glacial ice and snowpack (richly reviewed by Hodson *et al.* (2008)). In stark contrast, few studies have considered non psychrophilic microbial communities in seasonal snow in sub-alpine and alpine regions. Furthermore, the natural occurrence and growth of mesophilic bacteria, considered to be associated primarily with other ecosystems, have never been explored in these environments. After artificial inoculation, Reynolds and Ringelberg (2008) showed a successful transfer of *P. syringae* inoculum from snow to soil. Their results suggest that both indigenous and non-indigenous microbial populations could survive the winter season in association with snowpack.

Much attention has been paid to the role of snowpack in the composition and functioning of the underlying soil microbial communities (Zinger *et al.*, 2009) and its impact on plant litter decomposition (see review by Gavazov (2010)), gas fluxes (see review by Williams *et al.* (2009a)) and biogeochemical cycles (Brooks and Williams, 1999; Lipson *et al.*, 1999; Schmidt and Lipson, 2004; Williams *et al.*, 2009b). Some of these studies have reported a rise of bacterial biomass in winter and a high heterotrophic microbial activity under the snow. This phenomenon occurs because snowpack can maintain unfrozen conditions at the soil-snow interface due to its capacity to effectively insulate (Brooks *et al.*, 1996). Energy balance measurements of the soil-snow-atmosphere system and experimental observations have shown that a snow depth of 30-40 cm dissociates soil temperature from air temperature (Brooks and Williams, 1999; Cline, 1995). Microscopic films of free water at the surface of soil particles and substrate availability foster the proliferation of large and diverse cold-adapted microbial communities (Ley *et al.*, 2004). Thus snowpack engenders conditions that could permit the survival and diversification of resident microorganisms including *P. syringae*.

Based on these assumptions and on our previous observation of *P. syringae* in snowpack (Morris *et al.*, 2008), our objective was to elucidate the population dynamics of *P. syringae* in the snowpack at sites representing the catchment basin of the Southern French Alps and to evaluate the contribution of snowfall to the populations in snowpack. We observed a marked density gradient of bacterial populations in snowpack which led us to investigate the role of the underlying ground cover in the population dynamics in snowpack and thereby to reveal the importance of alpine prairie leaf litter as an unsuspected reservoir of *P. syringae*.

MATERIALS AND METHODS

Field sites and substrate sampling

The field study was carried out between December 2008 and March 2010 in prairies dominated by forbs, grasses and legumes in the Southern French Alps where land was not cultivated: Col de Vars (06°42'07''E, 44°32'12''N), Super Sauze (06°42'36''E, 44°20'57''N), Ceillac (06°47'21''E, 44°38'06''N), and Col du Lautaret (06° 24' 00"E, 45° 02' 09"N) at altitudes of about 2100 m. Sites were on calc-schists bedrock.

Prior to snow fall, senescent plants and leaf litter were sampled in September 2009 and 2010 from 3 replicate plots of 20 cm^2. All vegetation from each 20 cm^2 was cut with sterile scissors and put into a clean plastic bag. The vegetation from each study site was pooled. Litter from each 20 cm^2 was scraped from the soil surface with a sterile spatula and put into a clean plastic bag. Likewise, the litter from each study site was pooled

Freshly fallen snow was collected on clean plastic tarps (1 m^2) that had been placed on the ground or on previously fallen snow before each anticipated snow event. Samples were collected by 3h after the end of the snowfall event.

Snowpack was sampled five times in two years from each site by digging pits. At each site a fresh pit (ca. 2 m^2 dug to the ground level), oriented NW-NE in zones that had been previously delimited to prevent crossing by pedestrians, was dug at each sampling date and was oriented in the delimited zone so that pits at subsequent sampling dates would not be influenced by run-off from pits dug at previous dates. Snow from the snowpack was collected from three layers; the 10-cm layer in contact with the ground,

the 20-cm layer just above this first layer, and the remaining layer of snow up to the surface. Samples were collected from the top of the pack toward the bottom layer. At least 500 g, sampled at various sites within the pit, were collected from each layer with a disinfected plastic scoop. At most dates, one bulk sample per layer per date was collected except in the cases when we evaluated within-pit variability (3 bulks /layer/pit/date). In 2010, plant material and snowpack was sampled from a delimited surface (0.04 m^2) and the leaf litter underlying the snowpack was collected by scraping it from the soil surface as described above. Samples were kept in a cooler, transported to the laboratory and processed on the following day.

Quantification and isolation of *P. syringae*

Samples of leaf litter and senescent plants were macerated in a stomacher (BagMixer, Interscience, St Nom-La Breteche, France) for 2 min in 0.1M phosphate buffer (8.75 g K_2HPO_4 and 6.75 g KH_2PO_4 per liter, pH 6.8). The volume of buffer used depended on the mass of tissue processed (about 10 - 15 g of tissue and 2 ml of buffer g^{-1}). The macerate was dilution-plated as indicated below.
Snow samples were thawed overnight at room temperature and processed within 24 h as described previously (Morris *et al.*, 2008). Samples were concentrated by a factor of 200 by filtration across sterile nitrous cellulose filters (pore diameter 0.22 µm) before dilution plating. Before filter concentration, electrical conductivity (EC) and pH were measured with an electrochemical analyser (Consort C561, UK, reference temperature at 25°C).

Aliquots of the samples as prepared above were dilution-plated on KBC medium (Mohan and Schaad, 1987), a semi-selective medium for *P. syringae* used in our previous studies (Morris *et al.*, 2008) and on 10% tryptic soy agar (TSA) to enumerate the total mesophilic bacterial flora, and plates were incubated for up to 5 days at 22-25°C. The detection thresholds were 5 colony-forming units (CFU) for *P. syringae* and 55 for total bacteria per liter of melted snow.

Strains of *P. syringae* were collected from each sample by purifying at least thirty colonies chosen randomly from a single dilution. Strains were tested for production of fluorescent pigment on King's medium B (King *et al.*, 1954) and the absence of arginine dihydrolase and of cytochrome c oxidase as described previously (Morris *et al.*, 2008). For strains meeting the phenotypic criteria, between 20 and 40 strains per sample were

stored in 0.1M phosphate buffer at 4°C and in nutrient broth with 40% glycerol at -80°C for further characterization. A set of 986 strains was randomly selected for this study for full phenotypic characterization as described below. Of these strains, 712 were from leaf litter and the snow in the 10-cm layer closest to the soil collected in 2009 and 2010 (supplementary Table I-2).

Evaluation of the transfer of *P. syringae* from leaf litter to snowpack

The transfer of indigenous *P. syringae* from plant litter to the snowpack covering the ground was investigated by establishing microcosms in February and March 2010. Litter collected from under the snowpack at the Col du Lautaret site was collected as described above and finely minced with sterile scissors. About 10 g of the litter were carefully placed at the bottom of 12 sterile cylindrical screw-cap polypropylene flasks (100 mm deep, 50 mm in diameter) and compacted to create a layer of about 8 - 10 mm in thickness. This was accomplished without touching the inner sides of the flasks above the height of the layer of leaf litter. As an additional precaution, the inner sides were swabbed with alcohol several times and allowed to dry after the litter was put into the flasks. To obtain snow for the microcosms, snow cores were collected at depths between 1.30 m and 1.50 m from the ground with sterile tools. Based on preliminary results, snow at this depth frequently had no detectable levels of *P. syringae* (verified as described below). Aliquots of 60 g of snow were then put into each flask resulting in a snow layer of about 10 cm. Flasks with snow but without leaf litter were used as controls. All flasks were then buried under 1 m to 1.80 m of snow and incubated for 9 weeks.

Microbiological analyses of the snow and leaf litter in the microcosms were conducted similarly to those described above. At 3, 6 and 9 weeks of incubation, all snow except the centimeter layer in contact with the litter was removed from each flask, melted, concentrated by filtration and dilution plated on KBC and TSA media. The remaining snow was discarded and the litter was recuperated for analysis

Phenotypic characterization of strains

At least 20 strains per each sample of snow and plant litter were characterized for ice nucleation activity (INA), the capacity to induce a hypersensitive reaction in tobacco (HR), aggressiveness on cantaloupe (AGR) and production of syringomycin-like toxins (SYR) as described by Morris *et al.* (2008). Inoculum for all tests consisted of aqueous suspensions of 48-h bacterial cultures from strains stored at -80°C. Strains were tested in blocks of up to 30 chosen at random from the entire collection. Strain CC0094 of *P. syringae*, which is virulent on cantaloupe, ice nucleation active, and produces a syringomycin-like toxin (Morris *et al.*, 2000), was used as a control in all blocks. Sterile distilled water was used as a negative control.

Phenotypic characterization was performed as described previously (Morris *et al.*, 2010). INA was evaluated by determining the freezing temperature, between -2° and -8°C of 3 drops (30 µL) containing 10^6 cells. Strains were scored positive for freezing if at least 2 drops froze. Induction of a hypersensitive reaction was tested by injecting 50 µL of a suspension of 10^8 cells ml^{-1} into the lamina of leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) at the 10-leaf stage and noting the development of necrosis at 24h after inoculation. Aggressiveness of strains on cantaloupe (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* cv. Vedrantais) was determined by infiltrating 50 µl of a bacterial suspension of 3×10^8 cells mL^{-1} into the hypocotyl of plants at the cotyledon stage. Ten plants were inoculated per strain and the intensity of symptoms was assessed after 7 days of incubation at ambient conditions of 17–25°C according to an index from 0 to 4. Production of syringomycin-like toxins was revealed on a minimal SRM medium (Gross, 1985) by measuring the inhibition zone created by antibiosis against *Geotrichum candidum* (Gross and Devay, 1977) after 6 days of incubation.

Genotypic characterization

Genotypic characterization was based on profiles from rep-PCR targeting the BOX element of genomic DNA (Morris *et al.*, 2000) and sequencing of genes in the core genome as described previously (Morris *et al.*, (2010; 2008)). For rep-PCR, primer sequences (obtained from Genset SA, Paris, France) were as described by Versalovic *et al*. (1991). The amplifications were performed with a 480 Thermal Cycler

thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) using cycles described by Louws *et al.* (1994).

For sequencing, one or all of four genes in the core genome (*rpoD*, *gyrB*, *cts* and *gapA*) were sequenced from a pure suspension of each strain adjusted to 2×10^8 cells ml^{-1}, for which DNA was amplified with primers described by Yamamoto *et al.* (2000) for the first two genes, by Sarkar and Guttman (2004) for the third and by Morris *et al.,* (2010) for *gapA*. PCR reactions were performed with a Qiagen Multiplex kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and their products were checked by electrophoresis in 2% agarose gels before sequencing.

Clustering analyses

Strains of *P. syringae* from crops, water, leaf litter and the first layer of snow (0-10 cm) were clustered as described by Morris *et al.* (2010) on the basis of their genetic relatedness, in terms of *cts* sequences, using two different individual-based clustering methods: a Bayesian algorithm and a multivariate analysis. To represent the full range of diversity observed in this study, we used the BOX-PRC profiles to select strains; 290 strains were chosen based on these profiles. Then the *cts* sequences of these 290 strains were aligned with all those from a previous global biogeographic study of *P. syringae* (323 sequences) (Morris *et al.*, 2010) using the ClustalW program and truncated to a length of 415 bp with DAMBE (version 5.2.18) (Xia and Xie, 2001). Redundant sequences were eliminated, thereby leading to the identification of 138 haplotypes among the total of 613 sequences. The sequences of these haplotypes were converted into the Structure format using xmfa2struct, which was developed by Didelot and Falush and is available at the ClonalFrame website (http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/statistics/staff/research/didelot/clonalframe/). The Bayesian clustering approach was performed using the software STRUCTURE 2.3 (Falush *et al.*, 2003; Pritchard *et al.*, 2000) and the estimation of genetic clusters (*K*) was done as described by Morris *et al.* (2010). The optimal number of clusters was further evaluated by Principal Component Analysis using the procedure available in the package *adegenet* (Jombart, 2008) for the statistical freeware R version 2.9.1 (The R Development Core Team, 2009). PCA was followed by a clustering analysis using the classical Ward method available in R, which is a hierarchical method designed to optimize minimum variance within clusters.

Phylogenetic classification of strains

The objective of the phylogenetic analysis was to assign strains isolated from the plant litter and the ground level layer of snow in 2010, to the clades described by Morris *et al.* (2010). This was accomplished for the 290 strains used for the cluster analysis above. Determination of the clade of each strain was based on the approach used in our previous study of *P. syringae* from non agricultural and agricultural habitats (Morris *et al.*, 2010) revealing that strains of *P. syringae* could be accurately assigned to one of the clades defined in that work if the dissimilarity of the *cts* gene sequence with others in the clade did not exceed a threshold of 1.8 %. Dissimilarity between strains was calculated with MEGA, version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). Via this approach only 8 of the 290 strains could not be assigned to one of the previously described clades (Morris *et al.*, 2010).

Statistical analysis of genotypic and phenotypic diversity

Frequencies of individual phenotypes (INA, HR, AGR, SYR) between samples were compared with Fisher's test using the R software version 2.9.1 (The R Development Core Team, 2009). Frequencies of the different combinations of all four phenotypes among samples were compared with a generalized linear model. One of 72 possible combined phenotype classes was attributed to each of the 712 strains isolated in 2009 and 2010 from the 10-cm snow layer closest to the ground and the litter. For each combined phenotype class, the probability for a strain with this combination to be in a site or in a substrate was assessed by fitting a generalized linear model (GLM; McCullagh and Nelder (1989)) to the data. In the GLM, the site or the substrate is the binary response variable modeled with the Bernoulli distribution, the phenotypes and their interactions are the explanatory variables and the logistic function is used for the link function. The explanatory variables were selected with a backward minimization of the Akaike's information criterion (AIC) which allowed us to choose the best model fitting the data (Burnham and Anderson, 2002). This procedure provides the distribution of probabilities DP_{obs} for the observed combined phenotype classes to be in a given site or in a given substrate; this distribution can be plotted as a histogram H_{obs}. One can test if DP_{obs} is significantly different from the distributions expected under the null hypothesis of no difference in the phenotype combinations between the sites or the

substrates. For this purpose, a permutation test[19] (Manly, 1997) was implemented: the test provides 95%-confidence envelopes for the histogram H_{obs} by assuming that this histogram is obtained under the null hypothesis; see supplemental information S1 for details. If H_{obs} does not lie in the envelopes, then the null hypothesis can be rejected at the risk level of 5%. In such a case, the combined phenotype classes with high probabilities correspond to those which have a large propensity to be in the site or in the substrate of interest. Those with low probabilities are more likely to be in the alternative site or substrate.

RESULTS

P. syringae populations in snowfalls, alpine grasses and litter all contribute to the presence of this bacterium in the catchment basin

Prior to winter snowfalls, average population densities of *P. syringae* in senescent plants and leaf litter were 3.39×10^9 and 8.51×10^8 CFU m^{-2} of ground surface, respectively and generally constituted well below 1% of the total mesophilic population (Figure I-1A.). The population densities of *P. syringae* were higher in senescent plants than in the leaf litter ($p < 0.05$), but the population densities of total culturable bacteria were lower in the phyllosphere than in the litter ($p < 0.05$).

Detectable populations (> 5 CFU L^{-1}) of *P. syringae* arrived in the catchment basin with 10% of the snowfalls whereas total mesophilic bacteria arrived with nearly all (92%) of the snowfalls during the two winter seasons between 2008-2010 (Figure I-1B). When detected, *P. syringae* densities in fresh snowfall were 80 CFU L^{-1} to 1.66×10^4 CFU L^{-1} of melted snow, whereas total mesophilic bacteria were present at 166 CFU L^{-1} to 9.88×10^8 CFU L^{-1}.

[19] An description of the permutation test procedure is given at the end of the chapter

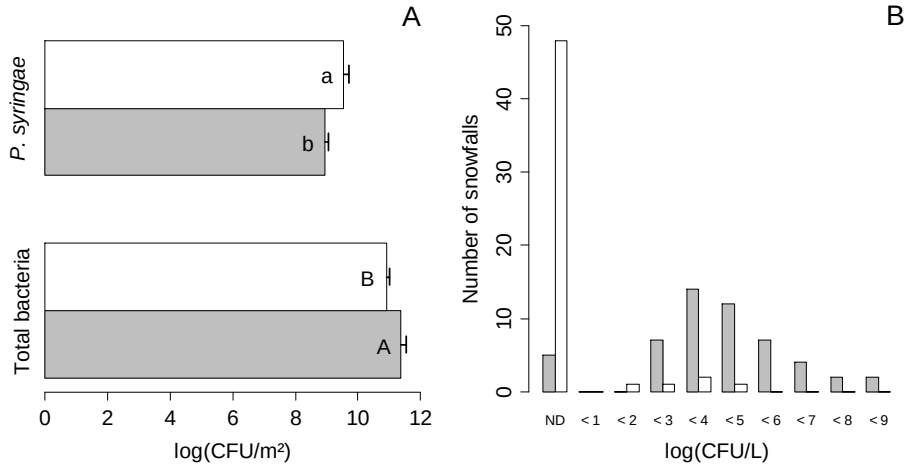


Figure I-1. Population densities of *P. syringae* and total culturable bacteria in alpine grasses, litter and snowfalls in the catchment basin before and during snowpack formation

(A) Mean population sizes in the leaf litter (grey bars) and senescent plants (white bars) for all sampling sites in September 2009 and September 2010. Population densities on leaf litter were significantly different from those on senescent plants for each of the populations (*P. syringae* and total bacteria) enumerated ($p \leq 0.05$) as indicated by the letters associated with the bars. (B) Number of snowfalls in which *P. syringae* (white bars) and total mesophilic bacteria (grey bars) were detected or below the detection threshold (5 bact / L) (ND) from November to March 2008-2009 and 2009-2010. Error bars represented standard error.

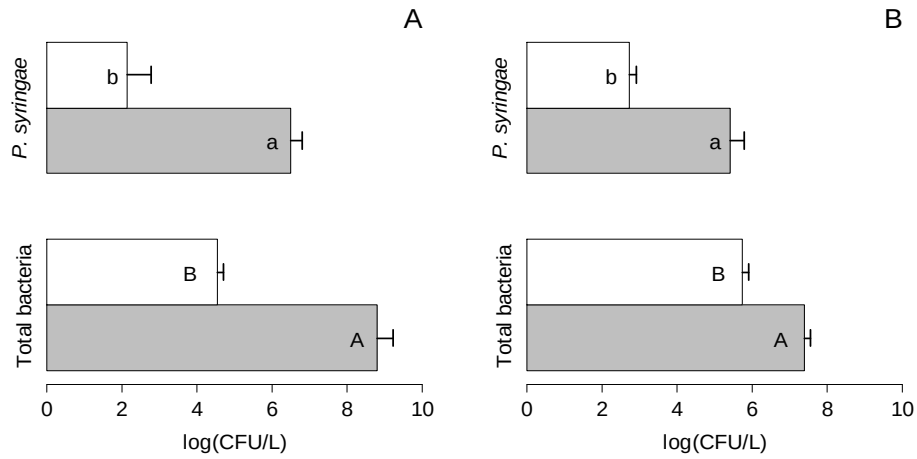


Figure I-2. Population densities of *P. syringae* and total mesophilic bacteria in two layers of snowpack in the Southern French Alps

For sites where triplicates were sampled, **(A)** Col du Lautaret and **(B)** Ceillac, values represented the mean of 3 replicate samples for the first 10 cm of snow (grey bars) and from 10 cm to the top of the snowpack (white bars) at each of the sampling dates (March 2010 for Col du Lautaret, and April 2010 for Ceillac). For each bacterial population (*P. syringae* or total) the values associated with the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$). Error bars represent standard error.

P. syringae survives in snowpack during the winter and the population density is stratified

P. syringae was systematically detected in the snowpack of all sites at all dates. Throughout the sampling periods the study sites were characterized by an abiotic environment that was stable in terms of pH (5.2 – 6.2 for melted snow) and EC (0.4 – 6.5 µS cm^{-1}). Population densities of *P. syringae* ranged from 44.6 CFU L^{-1} to 1.11 × 10^5 CFU L^{-1} of melted snow and represented 0.008 % to 8 % of the total mesophilic bacterial population. The sampling of triplicates of each snow layer at the Ceillac and Lautaret sites revealed that there was a significant effect of depth in the snow pack on the population density of bacteria (Figure I-2). On average, total mesophilic bacteria and *P. syringae* were nearly 1000 times more abundant in the 10-cm layer of snowpack that was in contact with the ground than in the layers above. This stratification along the snowpack was systematically observed at all sampling sites and dates (14 observations in addition to those for which triplicates were sampled from the Ceillac and Lautaret sites (Table I-2)). Whereas *P. syringae* was always detected in the first layer in contact with the ground at densities from 10^2 to 10^6 CFU L^{-1}, it was not always detected in the other layers and particularly for the snow on the top layer (from 30cm above ground level to the top) even though total culturable bacteria were almost always detected.

Emigration of *P. syringae* from litter to the snowpack contributes to the stratified population density in the snowpack

To compare population densities of total mesophilic bacteria and of *P. syringae* in snow and litter, samples were collected from March to April 2010 over a delimited surface. As presented in Figure I-3, triplicate samples from Col du Lautaret and Ceillac showed a decreasing density gradient of *P. syringae* and total bacterial microflora (expressed as CFU m^{-2}) that was also systematically observed for the four others dates and sites where only single samples were collected (Table I-2) In the underlying litter, the mean population densities across all sites were 2.77 × 10^{11} CFU m^{-2} of ground for total mesophilic bacteria and 3.83 × 10^8 CFU m^{-2} for *P. syringae*. These values, which represent population sizes after establishment of the snowpack, were not

significantly different from densities in leaf litter determined before the first snowfalls in September 2010 (t-test, $p<0.05$). For all sites pooled, population densities of *P. syringae* varied between 4.03×10^5 and 5.74×10^{10} CFU m^{-2} for the leaf litter, 1.11×10^4 and 2.62×10^8 CFU m^{-2} for the 10 cm of snow in contact with the ground, and 4.74×10^2 and 1.13×10^7 CFU m^{-2} for the upper 20 cm of snow.

To determine if a transfer of bacterial populations from litter to snowpack was possible, two sets of microcosms were set up in 2010 with litter and snow and buried at the Col du Lautaret site. Although no *P. syringae* was detectable in the snow at the time the microcosms were constructed, approximately 10^7 *P. syringae* per m^2 of snow were detected at the first sampling date (3 weeks of incubation) (Figure 4). Thereafter, population sizes in snow and litter were stable over the 9 weeks until the end of the experiment. Those in the litter were about 10^{10} CFU m^{-2}. No *P. syringae* was detected in microcosms without leaf litter at any of the sampling dates. The ratio between population densities in the two substrates showed that about 0.01% of the population of *P. syringae* from litter transferred to the snow if we assume that there was no growth of *P. syringae* in the snow during the period of incubation.

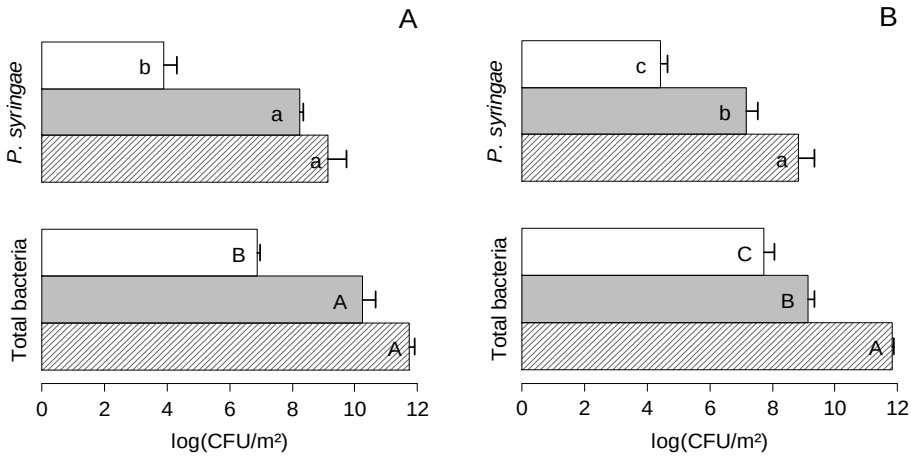


Figure I-3. Population densities of *P. syringae* and total mesophilic bacteria in litter and two layers of the covering snowpack in sub-alpine meadows of the Southern French Alps for sites where triplicates samples of litter and snow were sampled

At **(A)** Col du Lautaret and **(B)** Ceillac, values represent the mean of 3 replicate samples for leaf litter (hatched bars), the first 10 cm of snow (grey bars) and the overlaying 20 cm of snow (white bars) at two dates in March 2010 for Col du Lautaret and April 2010 for Ceillac. Densities were expressed in terms of numbers per surface of ground cover. For each bacterial population (*P. syringae* or total) the values associated with the same letter are not significantly different ($p \leq 0.05$). Error bars represent standard error.

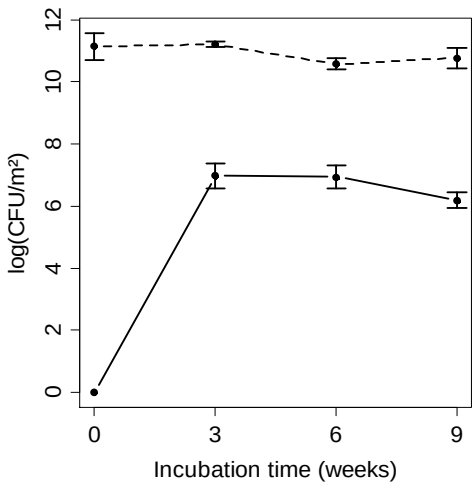


Figure I-4. Population Dynamics of population densities of *P. syringae* in litter (dashed line) and snow (solid line) in microcosms incubated for 9 weeks under snowpack in the Southern French Alps

This data illustrate the transfer of *P. syringae* from the litter to the snow. Values represent mean population densities for 3 replicates for each of the two sampling date. The population density for the first sample in snow was below the detection threshold (5 CFU L^{-1} of snowmelt which represents 4.6×10^3 CFU m^{-2}). For each variable, values were not significantly different (ANOVA, $P \leq 0.05$). Error bars represent standard error.

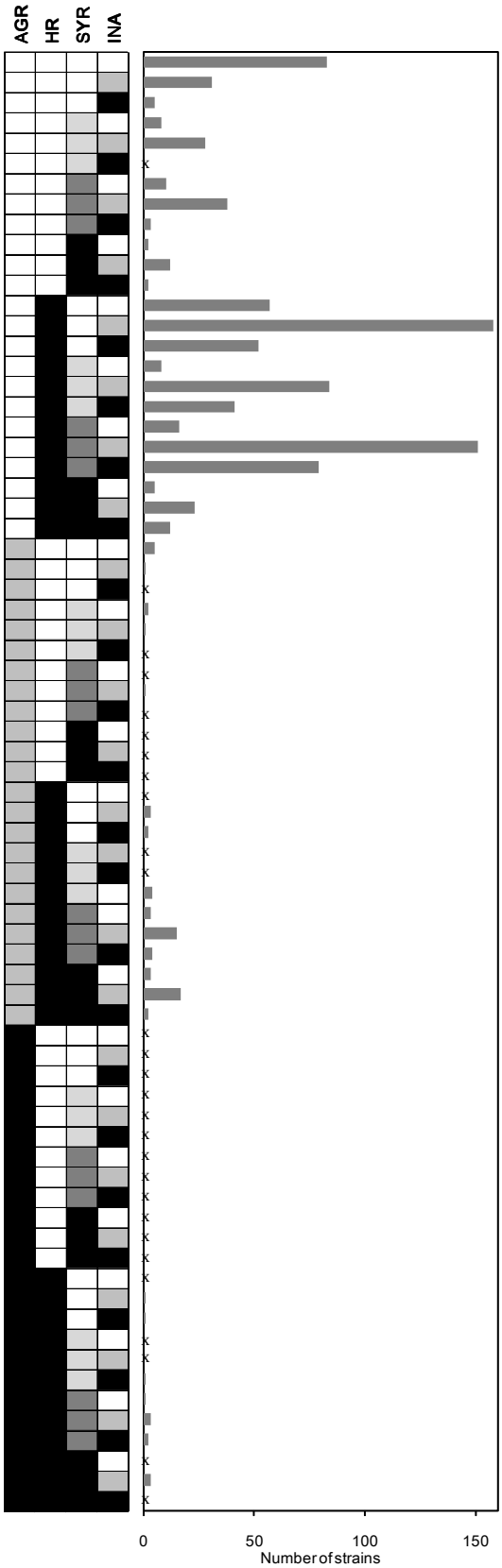


Figure I-5. Phenotypes of *P. syringae* and their frequency distribution among strains from leaf litter and the entire snowpack in the Upper Durance catchment basin in the Southern French Alps

Relative abundances of strains were represented for each of the observed combined phenotype for a collection of 986 strains characterized for each of the four phenotypes. AGR: Aggressiveness was determined on cantaloupe ranked in three class; class AGR^1 (white squares) included avirulent strains and those which the severity score was <1; AGR^2 (grey squares) strains for which more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean disease score was between 1 and 2; AGR^3 (black squares) strains for which more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean score disease >2. HR: Black squares indicate strains that induced a necrosis on tobacco leaves. SYR: Four classes were considered for the production of syringomycin-like toxins represented by squares with an increasing gradient of grey from the least productive (SYR^1 in white) to the most productive (SYR^4 in black). The class SYR^1 included strains induced a zone of antibiosis against *Geotrichum candidum* ≤ 2 mm. The zone of inhibition (in mm) induced by strains in classes SYR^2, SYR^3 and SYR^4 were respectively 2 - 6, 6 - 10 and ≥ 11. INA: Ice nucleation activity was determined with a population of 10^6 cells and consisted of three categories; strains in class INA^1 (white squares) were not ice nucleation active at -8° C or warmer; INA^2 (grey squares) showed ice nucleation activity between -7°C and -5°C ; and INA^3 (black squares) showed ice nucleation activity between -4°C and -2°C.

Table I-1. Frequency of strains of *P. syringae* from leaf litter and snow in different phenotypic classes

					Frequency of strains in each class [b]																
Year	Month	Site [a]		Substrate	HR^{+}	[c]	INA^{+}	[d]	INA^{3}	[e]	AGR^{+}	[f]	$AGR^{>1}$	[g]	AGR^{3}	[h]	SYR^{+}	[i]	$SYR^{>2}$	[j]
2009																					
	March	Ceillac		Snow 0 -10 cm	0	B	0.95	A	0	A	0.14	A	0	A	0	A	1.00	A	0.77	A
				Snow 10 -30 cm	0.60	A	1.00	A	0.20	A	0.2	A	0.07	A	0	A	0.80	A	0.27	B
		Vars		Snow 0 -10 cm	0.36		1.00		0.23		0.23		0.04		0		0.95		0.76	
		Sauze		Snow 0 -10 cm	0.90		1.00		0.05		0.62		0.38		0.09		0.81		0.67	
	May	Ceillac		Snow 0 -10 cm	1.00		1.00		0.45		0.15		0		0		0.15		0.05	
		Sauze		Snow 0 -10 cm	0.50	A	0.80	A	0.15	A	0.35	A	0.10	A	0	A	0.20	A	0.10	A
				Snow 10 -30 cm	0.33	A	0.89	A	0.17	A	0.05	B	0.05	A	0	A	0.05	A	0.05	A
2010																					
	March	Ceillac		Leaf litter	0.42	A	0.61	B	0.12	A	0.05	A	0.03	A	0.02	A	0.55	B	0.28	A
				Snow 0 -10 cm	0.57	A	0.90	A	0.25	A	0.15	A	0.15	A	0.1	A	0.9	A	0.55	A
		Vars		Leaf litter	0.98	A	0.78	A	0.22	A	0.12	A	0.10	A	0	A	0.05	A	0.17	A
				Snow 0 -10 cm	0.92	A	0.35	B	0.05	A	0	A	0.10	A	0	A	0.05	A	0.05	A
		Sauze		Leaf litter	0.92	A	1.00	A	0.36	A	0.45	A	0.32	A	0.03	A	0.93	A	0.83	A
				Snow 0 -10 cm	0.69	B	0.70	B	0.30	A	0.05	B	0	B	0	A	0.85	AB	0.60	AB
				Snow 10 -30 cm	0.75	AB	0.65	B	0.15	A	0.05	B	0	B	0	A	0.60	B	0.30	B
	April	Ceillac		Leaf litter	0.79	B	0.82	B	0.28	A	0.05	A	0.03	A	0.02	A	0.52	A	0.23	B
				Snow 0 -10 cm	0.98	A	0.95	A	0.17	A	0,00	A	0,00	A	0,00	A	0.60	A	0.25	B
				Snow 10 -30 cm	0.92	A	0.76	B	0.03	B	0.07	A	0.02	A	0,00	A	0.63	A	0.28	B
				Snow > 30 cm	0.80	B	0.90	AB	0.25	A	0.03	A	0.02	A	0,00	A	0.68	A	0.43	A
		Vars		Leaf litter	0.95	A	0.88	A	0.12	A	0.64	A	0.47	A	0.10	A	0.81	A	0.78	A
				Snow 0 -10 cm	0.53	B	1.00	A	0.30	A	0.10	B	0.05	B	0.05	A	0.90	A	0.45	B
		Sauze		Leaf litter	0.28	B	0.47	B	0.07	B	0.28	A	0.10	A	0,00	A	0.38	B	0.17	B
				Snow 0 -10 cm	0.67	A	0.52	B	0.14	AB	0.05	B	0,00	A	0,00	A	0.50	B	0.30	AB
				Snow 10 -30 cm	0.40	AB	0.95	A	0.25	A	0.05	B	0.05	A	0,00	A	0.85	A	0.50	A
2010, replicates																					
	March	Lautaret	(r1)	Leaf litter	1.00	A	1.00	A	0.40	A	0	A	0	A	0	A	0.95	A	0.70	A
				Snow 0 -10 cm	1.00	A	1.00	A	0.35	A	0	A	0	A	0	A	1.00	A	0.75	A
				Snow 10 -30 cm	1.00	A	0.94	A	0.35	A	0	A	0	A	0	A	0.82	B	0.58	A
				Snow > 30 cm	1.00	A	1.00	A	0.30	A	0.05	A	0	A	0	A	1.00	A	0.75	A
			(r2)	Leaf litter	1.00	A	0.85	A	0.50	A	0	A	0	A	0	A	0.80	A	0.55	A
				Snow 0 -10 cm	1.00	A	1.00	A	0.15	B	0.05	A	0.05	A	0.05	A	0.95	A	0.60	A
			(r3)	Leaf litter	1.00	A	1.00	A	0.20	A	0	A	0	A	0	A	0.47	B	0.26	B
				Snow 0 -10 cm	1.00	A	1.00	A	0.45	A	0	A	0	A	0	A	0.85	A	0.60	A
				Snow 10 -30 cm	1.00	A	1.00	A	0.50	A	0	A	0	A	0	A	1.00	A	0.75	A
				Snow > 30 cm	1.00	A	1.00	A	0.44	A	0	A	0	A	0	A	1.00	A	0.66	A
	April	Ceillac	(r1)	Leaf litter	0.87	AB	0.95	A	0.25	A	0	A	0	A	0	A	0.55	A	0.25	A
				Snow 0 -10 cm	0.97	A	0.90	A	0.25	A	0	A	0	A	0	A	0.70	A	0.35	A
				Snow 10 -30 cm	0.93	AB	0.85	A	0.25	A	0.10	A	0.05	A	0.05	A	0.50	A	0.10	B
				Snow > 30 cm	0.73	B	1.00	A	0.20	A	0.05	A	0	A	0	A	0.20	B	0	B
			(r2)	Leaf litter	0.80	A	0.70	B	0.35	A	0.10	A	0.1	A	0.05	A	0.70	A	0.25	AB
				Snow 0 -10 cm	0.97	A	1.00	A	0.15	A	0	A	0	A	0	A	0.65	A	0.15	B
				Snow 10 -30 cm	0.87	A	0.84	AB	0.16	A	0.10	A	0	A	0	A	0.70	A	0.25	B
				Snow > 30 cm	0.85	A	1.00	A	0.45	A	0	A	0	A	0	A	0.90	A	0.70	A
			(r3)	Leaf litter	0.70	B	0.80	A	0.25	A	0.05	A	0	A	0	A	0.30	c	0.10	Bc
				Snow 0 -10 cm	1.00	A	0.95	A	0.10	A	0	A	0	A	0	A	0.45	Bc	0.20	B
				Snow 10 -30 cm	1.00	A	0.55	A	0.05	A	0	A	0	A	0	A	0.70	AB	0.50	Ac
				Snow > 30 cm	0.85	AB	0.70	A	0.10	A	0.05	A	0.05	A	0.05	A	0.95	A	0.60	A

[a] The specific location of sites is indicated in Table 1. In 2010, the three replicates of snow from each layer collected at Ceillac and Lautaret at the same date are labeled r1, r2 and r3.
[b] For each site and each date, Fisher tests (using the integer number of strains tested) were conducted to evaluate if there was a significant effect of substrate (snow layers and litter) on the frequency of strains for each phenotype. Values followed by the same letter are not significantly different from the frequencies for the other substrates for the same sampling date and site. At some sampling dates only one substrate was available and hence no comparisons could be made at these dates.
[c] Frequency of strains capable of inducing a hypersensitive reaction on tobacco.
[d] Frequency of strains that were ice nucleation active at -8°C or warmer in a test of 10^6 cells.
[e] Frequency of strains that were ice nucleation active between - 4°C and - 2°C in a test of 10^6 cells.
[f] Frequency of strains inducing symptoms on more than half of the cotyledons and having a mean score severity ≤ 1.
[g] Frequency of inducing symptoms on more than half of the cotyledons and having a mean score severity > 2.
[h] Frequency of strains for which the mean disease severity induced on cantaloupe seedlings was > 3.
[i] Frequency of strains for which there was a detectable zone of inhibition (> 0 mm) of *G. candidum*.
[j] Frequency of strains producing a zone of antibiosis against *G. candidum* > 2 mm.

There is no consistent effect of substrate, site or sampling date on phenotypic structures of *P. syringae* populations in alpine prairies

Phenotypes of strains from all litter and snow samples were assessed. A wide range of intensities of the different phenotypes was observed leading us to rank each phenotype into a range of categories. The capacity to induce a hypersensitive reaction consisted of two categories (HR^- or HR^+). Aggressiveness on cantaloupe consisted of three categories: low (AGR^1, less than half of the cotyledons showed symptoms or if more than half showed symptoms the severity score was <1), intermediate (AGR^2, more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean disease score was between 1 and 2), and high (AGR^3, more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean disease score >2). Ice nucleation activity consisted of three categories: weak (INA^1, no ice nucleation activity at -8° C or warmer among 10^6 cells), moderate (INA^2, ice nucleation activity between -7°C and -5°C in a population of 10^6 cells), and intense (INA^3, ice nucleation activity between -4°C and -2°C in a population of 10^6 cells). Intensity of production of a syringomycin-like toxin was classed into four categories: weak (SYR^1, zone of inhibition < 2 mm), low (SYR^2, zone of inhibition between 2 mm and 6 mm), moderate (SYR^3, zone of inhibition between 6 mm and 10 mm) and intense (SYR^4, zone of inhibition ≥ 11 mm). Overall, about 67 % of strains induced hypersensitivity on tobacco. Most (81%) of the strains were ice nucleation active at -8°C or warmer and for some samples between 20% and 67% of strains were in the INA^3 class. On average, 14.6 % of strains were pathogenic on cantaloupe (frequency of cotyledons infected > 0.5) and 75 % of these strains induced symptoms on cantaloupe with a high average of intensity ($AGR^{2,3}$). About 60% of the strains produced syringomycin-like toxins, resulting in a zone of antibiosis of at least 3 mm ($SYR^{>1}$) and in some cases up to 15 mm.

The frequency of occurrence of strains with each of the different phenotypes varied with substrate, site and date (Table I-1). Although there were significant differences in the frequency of occurrence of the different phenotypes due to substrate in some cases, these differences were not consistent (Table I-1). For the 14 sets of comparisons (different dates for the different sites) we made among substrates (between layers of snow or among layers of snow and litter), substrate had a significant structuring effect on the frequency of any of the individual

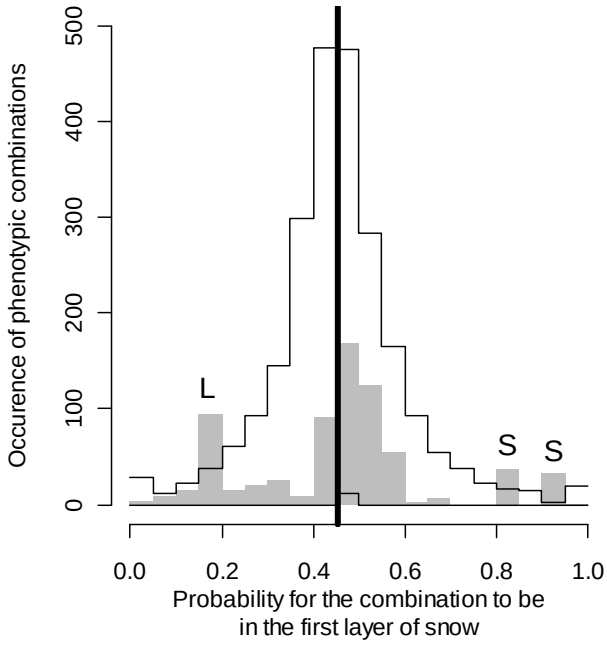


Figure I-6. Example of phenotypic structure comparison with the GLM approach: frequency distribution of the probability for each combination of phenotypes to be in the first layer of snow

Grey bars represent the observed frequencies (F_{obs}) of the phenotypic combinations. The white area represents the confidence interval of the frequency distribution for 2000 permutations of the phenotypic combinations in the whole data set. The thick vertical black line represents the mean of this distribution. By comparing the observed frequencies with the confidence intervals of the expected frequencies, significant effects of the substrate on the frequency of occurrence of different phenotypic combinations can be identified. In this example, combinations whose probability >0.5 tend to be most represented in the first layer of snow, and those <0.5 in the leaf litter. The frequency associated with "L" was significantly higher in the litter (in this example this corresponds to [AGR^1, HR$^-$, SYR^1, INA^1]), and frequencies associated with "S" were significantly higher in the snow (here they correspond to the phenotypes [AGR^1, HR$^-$, SYR^2,INA^2] and [AGR^1, HR$^-$, SYR^4,INA^2]).

phenotypes in only half or fewer of the cases. Substrate had no significant effect on the occurrence of highly aggressive strains (AGR^3), but there was a trend for the frequency of highly aggressive strains to be greater in leaf litter than in snow (in 4/5 comparisons).

We also determined the frequency of occurrence of the combinations of the four phenotypes assessed for the 986 strains characterized here (Figure I-5). A total of 45 combinations of the possible 72 combinations of the 4 phenotypes and their different intensities were observed. To determine if there was a significant effect of substrate (litter or snow) on the frequency of the different combined phenotypes we used a generalized linear model (GLM). For this approach we used the combined phenotypes

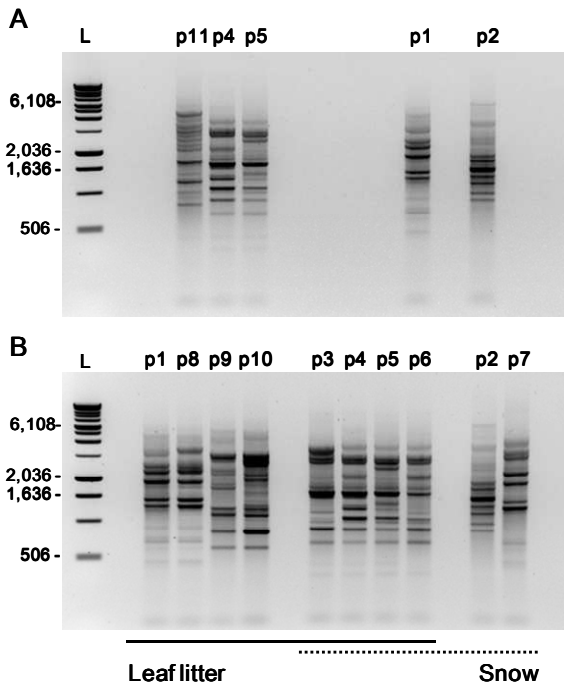


Figure I-7. Example of BOX-PCR profiles in leaf litter and the first layer of snow at one site and two dates

Occurrence of the 11 profiles (p1 to p11) found in the two substrates at Col de Vars in March 2010 (A) and April 2010 (B). For both figures, profiles found in the leaf litter are underlined by the solid black line, and those underlined by the hatched line were in the snow. Those underlined by both solid and hatched lines were found in both substrates. The lanes labeled L show the DNA molecular size marker (1-kb ladder; Gibco BRL, Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France); the sizes are indicated in base pairs.

corresponding to the 712 strains isolated from litter or the first 10 cm layer of snow. The observed frequencies of occurrence for each combination were compared to the expected frequency under the null hypothesis of no difference in frequency of combined phenotypes due to substrate. Figure I-6 illustrates an example of phenotypic structure comparison with the GLM approach. The grey histogram represents the observed frequencies for the phenotypic combinations relative to the probability that they are in the 0-10 cm layer of snow. The white histogram represents the confidence interval of the frequency of occurrence for each combination to be in the snow for the entire collection of strains from litter and the 0-10 cm layer of snow under the null hypothesis. A significant structuring effect of either snow or litter is revealed when the frequency of occurrence of the phenotype is outside of the confidence interval. Hence, for the grey bars labeled "S", the associated phenotypes are more significantly frequent in snow than expected and for the bar labeled "L" the associated phenotypes are more frequent in

litter than expected. This approach was used to evaluate the effect of date and site in addition to the effect of substrate.

Results of the whole GLM comparisons are presented in supplementary information S2. Overall, there was no consistent effect of substrate, site or date on the combined phenotypic population structure. All the tests showed at least one combined phenotype for which differences were significant, but this was not consistently a particular phenotypic combination for substrate, site or date. All samples consisted of a mix of dominant and rare phenotypes and showed no consistent trend in population structure. The most dominant combined phenotype in the collection [AGR^{1}, HR^{+}, $SYR^{1,2,3,4}$, $INA^{2,3}$] was found in all samples where leaf litter or snow from the 0 – 10 cm layer were collected and the second most dominant combined phenotype [AGR^{1}, HR^{-}, $SYR^{1,2,3,4}$, $INA^{1,2,3}$] was found in 66% of these samples.

P. syringae populations in leaf litter and snow are genetically diverse, comprised of pandemic strains also found in water and crops and strains endemic to non agricultural habitats

Assessment of genotypic divesity by BOX-PCR revealed 45 different BOX-PCR profiles at Ceillac, 11 at Col de Vars, 18 at Col du Lautaret and 21 at Super Sauze. Within a site, some profiles were specific to the snow or litter, and about 20 % to 50 % were shared between substrates and/or dates. An example of BOX-PCR profiles is shown in Figure I-7. This high number of different genetic profiles was not readily compatible with statistical tests to quantify the significance of the differences in structure observed between snow and litter (Morris *et al.*, 2002). Therefore, the effect of substrate on the genetic structure of *P. syringae* populations was evaluated by a population genetics approach based on the sequence of the *cts* housekeeping gene.

The *cts* sequences of the 290 strains from snow and litter collected in this study and those from 323 water and crops strains from a previous study (Morris *et al.*, 2010) represented 138 unique haplotypes, 59 of which were each represented by a single strain, and the dominant haplotype was represented by 81 strains. Among the 290 strains from snow and litter considered apart, there were 64 unique haplotypes. Bayesian analysis of the 138 unique haplotypes revealed that they were most optimally grouped into 3 clusters based on the *K* statistic of Evanno *et al.* (2005). A subsequent

principal-component analysis (PCA), followed by clustering based on Ward's method, also revealed three clusters of *P. syringae* strains (Figure I-8). Axes 1 and 2 of the PCA accounted, respectively, for 28.3% and 16.6% of the total genetic variability. Assuming a threshold of Q = 0.8 for assignment to a cluster, about 93% of the distinct haplotypes clearly belonged to only one cluster, indicating that the three clusters were highly divergent.

The three clusters represented strains with a specific range of affiliation in the phylogenetic tree designed by Morris *et al.* (2010). Cluster 1 represented strains from the Group 2a to Group 3 clades in the tree as depicted by Morris and colleagues (2010), Cluster 3 represented strains in the Group 3 clade to the UB-246 clade and Cluster 2 represented only strains from the CC1524 and UB-246 clades as well as 2 strains that could not be attributed to the previously described clades but had the closest genetic distance to the UB-246 clade relative to all other clades. Strains in Cluster 1 and 3 were ubiquitous, present in crops, water, leaf litter and snow (Figure I-9), while Cluster 2 contained haplotypes only found in leaf litter, snow and water but not in crops. All three clusters were represented in the snow and leaf litter at all sampling sites.

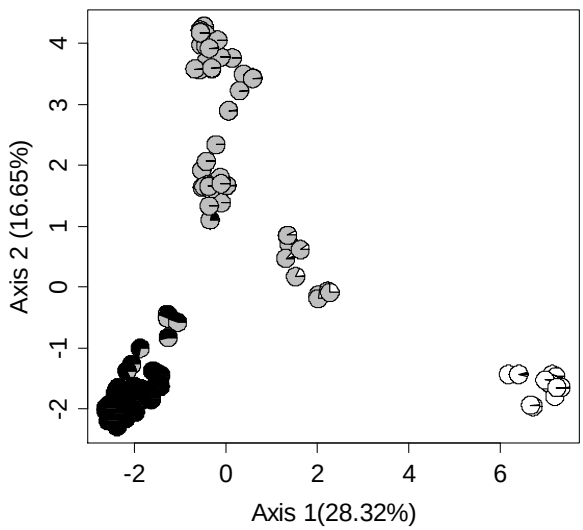


Figure I-8. PCA performed on 138 haplotypes of *P. syringae*, followed by a nonhierarchical classification with clustering based on Ward's method

For each strain, the probability of assignment to each of the four clusters obtained with the STRUCTURE software is reported on the PCA using a pie chart legend as follows: cluster 1, black; cluster 2, white; cluster 3, light grey.

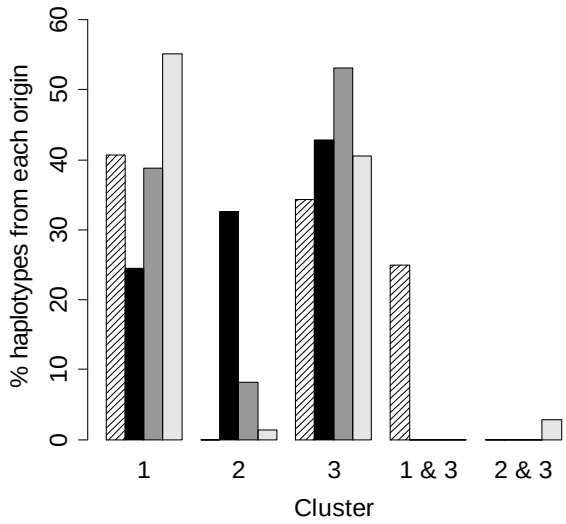


Figure I-9. Distribution of *cts* haplotypes of *P. syringae* into three genetic clusters inferred with the Bayesian clustering algorithm of the STRUCTURE software

The frequency of haplotypes assigned to each of the clusters is indicated for haplotypes of strains from crops (hatched bars), from leaf litter (solid black bars), from snowpack (dark gray bars) and of strains from water (light gray bars). Of the 138 haplotypes analyzed, 128 were assigned to clusters with probabilities of inferred ancestry between 0.75 and 0.99. Eight haplotypes were assigned at equal probabilities (ca. 0.50) to clusters 1 and 3, and two haplotypes were assigned at equal probabilities to clusters 2 and 3.

DISCUSSION

Knowledge about the impact of non agricultural habitats on the ecology and dissemination of plant pathogens at a global scale is limited to a few recent studies focusing on the bacterium *P. syringae*. This ubiquitous species has a life history closely linked to the hydrosphere through which water is naturally circulating and stocked in reservoirs (Morris *et al.*, 2008). The bacterium is found in several compartments of surface freshwater (Morris *et al.* ,(2010; 2008)), in crop and wild plants (Hirano and Upper, 2000; Mohr *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008), in aerosols and clouds (Amato *et al.*, 2007a; Lindemann *et al.*, 1982). However, the role and significance of dead plant material of the soil–vegetation interface as a durable habitat has not been investigated. One of the few works mentioning the presence of *P. syringae* in decomposing vegetation was by Maki *et al.* (1974) whose strains were isolated from decaying alder leaves (*Alnus tenuifolia*) leading to the discovery of the ice nucleation activity of this bacterium. Crop debris has also been recognized as a reservoir of *P. syringae* for some disease epidemics but the debris-associated populations decline

rapidly (McCarter *et al.*, 1983; van Overbeek *et al.*, 2010). In our study, through the systematic detection of *P. syringae* in leaf litter of alpine meadows, we have shown that dead plant material is a common habitat. Population sizes of *P. syringae* were in the size range of populations in senescent vegetation in the prairies where litter was collected (10^3 to 10^7 CFU g^{-1} of tissue). Furthermore, these populations were not reduced in size by the snow cover in the winter.

The survival of *P. syringae* in such conditions raises questions about the role of snowpack as a protective environment for plant pathogen populations at the soil surface. It is well known that the insulating properties of the snow permit the overwintering of microbial communities and the realization of biogeochemical cycles in the several centimeters of soil near the surface (Brooks *et al.*, 1996; Ley *et al.*, 2004; Lipson *et al.*, 1999; Schmidt and Lipson, 2004). Most of the microbial communities adapted to cold temperatures studied to date utilize complex substrates such as cellulose or vanillic acids, and simple amino acids to a lesser extent (Lipson *et al.*, 2002). This metabolic activity is essentially due to fungi including the plant pathogens known as snow molds which constitute the dominant microorganisms (Lipson *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2009). The ability of these active fungi to degrade complex substrates in such environments could benefit Gram negative bacteria such as *P. syringae* by producing less complex nutrients. This relation was previously demonstrated experimentally by the inoculation of leaf litter with the soft rot pathogens *Pectobacterium carotovorum* (formerly *Erwinia carotovora*) and *Aspergillus nidulans*. Proteome analyses coupled to analyses of extracellular degradative enzyme activities suggested that the bacterium had limited capabilities to degrade leaf litter and profited from the degradation products of the fungi (Schneider *et al.*, 2010). Furthermore, the antifreeze activity of snow molds could modify the physical environment of the bacterial community by limiting ice formation (Snider *et al.*, 2000) thereby leading to greater availability of free water. Temperature, moisture and nutrient availability may constitute favorable conditions for the survival of *P. syringae* in leaf litter as well as in association with living host plants.

A second major contribution of our results is the demonstration that, at treeline altitude in the Upper Durance catchment basin, alpine grasses and leaf litter are the major sources of *P. syringae* in the snowpack and are a more important source than

snowfalls. Because *P. syringae* is ice nucleation active (Lindow, 1983; Morris *et al.*, 2004; Vali *et al.*, 1976) and found in clouds (Amato *et al.*, 2007a) and snowfalls (Morris *et al.*, 2008), we expected that snowfalls would be the major source of *P. syringae* in the snowpack. However, *P. syringae* was detected in only 10 % of samples of freshly fallen snow (essentially at the beginning of the winter). Furthermore our microcosm studies clearly reveal that a large part of the *P. syringae* populations in the snowpack, and in particular in the 10-cm layer in contact with the soil surface, emigrates from litter. Emigration from the litter contributed to an increase in the density of *P. syringae* of several orders of magnitude in the 10-cm layer of snow near the soil surface. Irregularity of presence of *P. syringae* in snowfalls accumulating on top of this 10 cm layer contributed to the distinct stratification.

Theoretical considerations corroborate our hypothesis that *P. syringae* emigrates from litter to snowpack. At 0°C, snow is a porous medium represented by the three phases of water (solid, liquid and gas) which foster the existence of a water film on the surface of ice grains that can rise in the snow for several cm by capillary forces (Coléou *et al.*, 1999). Given that unfrozen water at the soil–snow interface carries bacteria and others microorganisms (Ley *et al.*, 2004), it is possible that *P. syringae* was transferred in the snow via the capillary rise of water. This transfer could also be coupled to snow drifting events. Alpine environments are windy and the first snowfalls can be repeatedly suspended and deposited with aerosols scrubbed from the ground (Lehning *et al.*, 2006).

Clustering analysis confirmed that the habitat compartments of the water cycle harbor ubiquitous strains that are also found on crops but also strains that seem to be more specifically associated with non agricultural habitats and related to the UB246 and CC1524 clades. These two genomic groups are the most deeply rooted in the most recent phylogenetic tree of the *P. syringae* species (Morris *et al.*, 2010). Their association with aquatic habitats and especially to litter supports the hypothesis that the species is well adapted to a lifestyle that does not necessitate pathogenicity to plants. However, the clustering analysis led us to conclude that snow and leaf litter can not be differentiated in terms of the effect that they might have on the genetic diversity. Population structure seemed to be the result of a set of conditions whose relative importance could not be distinguished between samples and likely involved exchanges between the two compartments through water transfer (capillary rise / percolation), local plant diversity

of the meadow, deposition of local aerosols, and possible multiplication of the population brought by the first snowfall. Indeed, Young *et al.* (1977) showed that *P. syringae* could grow at cold temperatures, especially at 0°C with a doubling time of 22h. The population at each site from the Upper Durance basin seemed to share the same dominant strains and to be composed of rare strains specific to the sample. Local diversity dynamics likely reflects high dispersal links in the metapopulation and seemed to show the same regional invariance observed by Östman *et al.* (2010) among microbial communities in freshwaters of Sweden. We observed that there was no significant probability for any type (phenotype) of strain of *P. syringae* to be associated with a particular site, date or substrate. Neither the properties linked to pathogenicity nor to ice nucleation activity seemed to be determinants, independently or together. Among the strains from leaf litter and snow tested in this study, 85 % induced a hypersensitive reaction on tobacco without being aggressive on cantaloupe, indicating that they have a restricted host range (Morris *et al.*, 2000). The dominance of relatively host-specific strains showed that their limited pathogenic relation with plants was not a barrier to their survival in an alpine catchment basin.

Together, the leaf litter and snow pack harbored > 10^8 pathogenic *P. syringae* per square meter. Seasonal snowpack of mountain regions is one of the most important water stocks upstream of cultures in middle and high latitudes and occupies about a quarter of the global terrestrial land surface (Edwards *et al.*, 2007). In early spring, melting of snowpack recharges groundwater tables and supplies the hydrological network of catchment areas where *P. syringae* was found from worldwide headwaters (Morris *et al.*, 2010) to rivers (Morris *et al.*, 2008) and retention basins (Riffaud and Morris, 2002). Given the population dynamics in alpine meadows and in water, these observations strongly suggest that snowpack and the associated leaf litter constitute crucial habitats for the dissemination and diversification of *P. syringae*. The slopes studied here were dominated by grasses, forbs and legumes, but lands can be occupied by other covers such as forests or shrubs. This raises questions on the association of population structure in leaf litter with land cover and how this in turn is affected by altitude and climate in general. Hence, global change is likely to have an impact on a plant pathogen such as *P. syringae* via the effects on alpine regions. As richly reviewed by Gavazov (2010), some predictions suggest that global warming may deeply affect the

functioning of alpine ecosystems via its impact on precipitation regimes, plant and microbial community structure, leaf litter quality and its decomposition rates. For example, snow cover thickness and soil moisture are predicted to decrease. The risk of freeze events in spring are likely to intensify but thermophilic species may progressively replace the present plant community. If we assume that the dissemination of *P. syringae* is strongly related to these environments, we could wonder how global warming may affect its population dynamics and what could be the impact on disease epidemiology. We could extend this question to plant pathogens in general whose life histories in relation with non agricultural habitats are still unsuspected or underestimated.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Daniel Granier and his team from the ski resort of Super Sauze, for their help with collection of samples. We are grateful to Odile Berge, Eric Michel, and Pierre Amato for their participation in sampling and for rich discussions, and Josselin Montarry for clusters analyses.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table I-2. Origin of strains from which *P. syringae* was isolated in this study

				Population density log(CFU / L of snowmelt) or log(CFU / g of plant material)		
Compartment	Site[a]	Date	Layer	*P.syringae*	Total mesophilic bacteria	Number of strains used for this study
Snowfalls						
	Ceillac	11/12/2008		nd[b]	5.22	
		18/12/2008		nd	4.82	
		07/01/2009		nd	4.82	
		06/02/2009		nd	3.36	
		24/01/2009		nd	3.91	
		20/01/2009		nd	3.72	
		08/11/2009		nd	4.28	
	Col de Vars	04/11/2009		2.91	9.00	
		08/11/2009		nd	3.71	
		01/12/2009		nd	6.19	
		18/12/2009		nd	2.32	
	Col du Lautaret	02/11/2009		nd	8.52	
		03/11/2009		1.90	3.92	
		08/11/2009		nd	3.29	
		05/05/2010		nd	2.92	
	Super Sauze	06/12/2008		nd	7.24	
		11/12/2008		nd	4.82	
		12/12/2008		nd	1.74	
		14/12/2008		nd	5.60	
		15/12/2008		nd	5.12	

	17/12/2008		nd	4.35	
	31/12/2008		nd	3.78	
	07/01/2009		nd	3.79	
	30/12/2008		nd	3.52	
	01/01/2009		nd	3.58	
	24/01/2009		nd	3.70	
	02/02/2009		nd	4.31	
	06/02/2009		nd	4.10	
	19/01/2009		3.75	3.26	
	20/01/2009		4.22	5.57	
	05/02/2009		3.80	3.83	
	01/03/2009		nd	2.65	
	04/03/2009		nd	5.55	
	06/03/2009		nd	1.74	
	29/03/2009		nd	2.44	
	02/04/2009		nd	1.74	
	29/03/2009		nd	2.22	
	08/11/2009		nd	1.74	
	01/12/2009		nd	4.35	
	08/01/2010		nd	5.59	
	23/12/2009		nd	6.00	
	06/01/2010		nd	5.64	
	02/01/2010		nd	6.94	
	13/01/2010		nd	4.82	
	15/01/2010		nd	6.00	
	30/01/2010		nd	7.60	
	24/02/2010		nd	4.11	
	19/02/2010		nd	1.74	
	12/02/2010		nd	4.75	
	14/04/2010		nd	3.00	
	04/03/2010		nd	2.96	
	02/03/2010		nd	4.47	
	28/03/2010		nd	2.86	

Snowpack and the underlying leaf litter

Ceillac	03/10/2009	layer1 (0-10 cm)	4.28	9.82	21
		layer2 (10-30 cm)	3.88	5.16	15
		layer3 (30-158 cm)	nd	4.93	
	04/23/2009	layer1 (0-10 cm)	4.89	6.54	
		layer2 (10-30 cm)	1.54	5.79	
		layer3 (30-134 cm)	1.54	5.34	
	05/05/2009	layer1 (0-10 cm)	4.18	7.07	20
		layer2 (10-30 cm)	nd	8.00	
		layer3 (30-130 cm)	nd	7.04	
	03/01/2010	leaf litter	5.62	8.08	66
		layer1 (0-10 cm)	5.92	7.91	40
		layer2 (10-30 cm)	1.48	4.00	6
		layer3 (30-170 cm)	nd	2.82	
	04/20/2010	leaf litter	6.19	8.64	30
		layer1 (0-10 cm)	5.61	7.72	30
		layer2 (10-30 cm)	2.97	5.64	30
		layer3 (30-165 cm)	2.18	5.63	30
		leaf litter	5.85	8.28	30
		layer1 (0-10 cm)	4.67	7.10	30
		layer2 (10-30 cm)	2.20	6.38	30
		layer3 (30-165 cm)	3.12	6.02	20
		leaf litter	6.44	8.57	30
		layer1 (0-10 cm)	5.92	7.30	30
		layer2 (10-30 cm)	2.27	5.30	20

		layer3 (30-165 cm)	2.82	5.61	20
Col de Vars	03/11/2009	layer1 (0-10 cm)	5.61	8.68	22
		layer2 (10-30 cm)	nd	6.10	
		layer3 (30-122cm)	nd	5.86	
	04/15/2009	layer1 (0-10 cm)	4.48	7.49	
		layer2 (10-30 cm)	2.18	3.70	
		layer3 (30-106cm)	nd	3.87	
	03/02/2010	leaf litter	4.63	7.10	60
		layer1 (0-10 cm)	2.46	6.34	40
		layer2 (10-30 cm)	nd	4.49	
		layer3 (30-178cm)	nd	3.34	
	04/15/2010	leaf litter	2.89	6.91	59
		layer1 (0-10 cm)	2.75	6.89	30
		layer2 (10-30 cm)	nd	1.74	
		layer3 (30-140cm)	nd	1.74	
Col du Lautaret	03/24/2010	leaf litter	6.45	7.57	20
		layer1 (0-10 cm)	6.60	7.95	25
		layer2 (10-30 cm)	1.93	4.95	17
		layer3 (30-175cm)	3.33	3.95	25
		leaf litter	5.23	8.18	20
		layer1 (0-10 cm)	6.97	9.12	25
		layer2 (10-30 cm)	1.40	5.12	
		layer3 (30-175cm)	1.00	4.67	
		leaf litter	4.45	8.12	20
		layer1 (0-10 cm)	6.78	9.31	20
		layer2 (10-30 cm)	2.85	5.12	25
		layer3 (30-175cm)	1.70	4.54	9
Super Sauze	03/11/2009	layer1 (0-10 cm)	5.23	8.96	21
		layer2 (10-30 cm)	nd	9.77	
		layer3 (30-158cm)	0.93	5.62	3
	04/13/2009	layer1 (0-10 cm)	4.87	7.95	
		layer2 (10-30 cm)	1.65	4.60	
		layer3 (30-125cm)	nd	4.55	
	05/06/2010	layer1 (0-10 cm)	5.32	8.34	20
		layer2 (10-30 cm)	2.01	6.66	18
		layer3 (30-102cm)	1.54	5.73	7
	03/02/2010	leaf litter	4.44	7.30	60
		layer1 (0-10 cm)	6.04	8.80	36
		layer2 (10-30 cm)	3.01	5.58	20
		layer3 (30-155cm)	nd	3.90	
	04/15/2010	leaf litter	4.68	7.90	60
		layer1 (0-10 cm)	5.30	8.55	30
		layer2 (10-30 cm)	3.06	7.19	20
		layer3 (30-145cm)	1.30	5.70	
Senescent plants and leaf litter					
Ceillac	09/23/2009	senescent plants	6.87	7.82	
		senescent plants	6.64	7.68	
		senescent plants	6.68	7.75	
		leaf litter	5.24	7.10	

		leaf litter	5.61	7.56
		leaf litter	3.78	7.15
	09/20/2010	senescent plants	6.26	8.31
		senescent plants	6.50	8.17
		senescent plants	7.04	7.97
		leaf litter	6.44	8.92
		leaf litter	6.02	8.55
		leaf litter	5.56	8.54
Col de Vars	09/23/2009	senescent plants	7.05	7.63
		senescent plants	6.69	7.58
		senescent plants	6.33	7.51
Col du Lautaret	09/20/2010	senescent plants	6.80	8.18
		senescent plants	6.56	8.41
		senescent plants	7.62	8.25
		leaf litter	5.95	8.13
		leaf litter	6.24	8.66
		leaf litter	6.55	8.28
Super Sauze	09/23/2009	senescent plants	5.00	8.02
		senescent plants	5.25	8.67
		senescent plants	6.04	8.29
		leaf litter	3.80	8.88
		leaf litter	5.47	8.91
		leaf litter	5.29	8.71
	09/20/2010	senescent plants	7.48	8.40
		senescent plants	6.55	8.11
		senescent plants	6.49	8.02
		leaf litter	5.72	8.51
		leaf litter	6.25	8.72
		leaf litter	6.21	8.59

[a]The latitude, longitude, and altitude were 44°38'05"N, 06°47'22"E (2,200m) for Ceillac ; 44°32'14"N, 06°42'06"E (2,100m) for Col de Vars ; 45°02'12"N, 06°24'08"E (2100m) for Col du Lautaret and 44°20'40"N, 06°41'57"E (2000m) for Super Sauze
[b] not detected

Supplementary information S1: The permutation test

The permutation test allows us to see if DP_{obs} (distribution of the observed probabilities) is significantly different from the distributions expected under the null hypothesis (H_0: no difference in the phenotype combinations between the sites or the substrates). It was implemented as follows. The response variable was randomly re-ordered 2000 times. For each of the 2000 permutations, the distribution of probabilities DP^* for the observed strains to be in a given site or in a given substrate was assessed by the procedure described in the statistical analysis paragraph (GLM and backward selection of the explanatory variables). The 2000 DP^* were then used to draw 95%-confidence envelopes for the histogram H_{obs} corresponding to DP_{obs} by assuming that this histogram was obtained under the null hypothesis. These envelopes were drawn by determining, for each cell of the histogram, a confidence interval for the height of the corresponding histogram bar. To reach a confidence level of at least 95% for the envelopes, we applied the Bonferroni procedure (Miller Jr., 1981): using 20 cells for the histogram, we fixed the level of the confidence intervals for the heights of the histogram

bars at the value (100-5 / 20) % = 99.75 %. Then, the null hypothesis is rejected or not rejected graphically: if H_{obs} does not lie in the envelopes, then the null hypothesis can be rejected at the risk level less than 5%.

Table I-3. Synthesis of frequency distributions of the probability for each combination to be in a given substrate, site, date or sample

A probability was assigned to each combination and comparison thanks the different GLM analyzes. When the observed values were significantly different from the expected value under null hypothesis, probabilities were associated to a star. Probabilities associated with a star were systematically mentioned. For the others, probabilities were mentioned only when they were < 0.05 or > 0.8.

Combination				Number of strains[j]	Comparison								
					Substrate[a]	Site[b]				Date[c]			
AGR[f]	HR[g]	SYR[h]	INA[i]		Snow	Ceillac	Col du Lautaret	Col de Vars	Super Sauze	March 2009	May 2009	March 2010	April 2010
				111					0.05<p<0.10 *	<0.05			
				96			0.40<p<0.45 *	0.05<p<0.10 *			<0.05		
				67	0.15<p<0.20 *		<0.05 *	<0.05 *	0.55<p<0.60 *	<0.05	<0.05		0.60<p<0.65 *
				54				0.05<p<0.10 *	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05		
				49		0.05<p<0.10 *	<0.05 *	0.60<p<0.65 *		<0.05	<0.05	0.70<p<0.75 *	
				49			0.50<p<0.55 *	0.05<p<0.10 *		<0.05	<0.05	0.70<p<0.75 *	
				39						<0.05	0.20<p<0.25 *		0.15<p<0.20 *
				33	0.80<p<0.85 *		<0.05 *		0.05<p<0.10 *	0.45<p<0.50 *	<0.05	0.20<p<0.25 *	
				24				0.05<p<0.10 *			<0.05		
				22			<0.05 *						
				21		0.05<p<0.10 *	<0.05 *				<0.05	0.20<p<0.25 *	
				20	0.80<p<0.85 *		<0.05 *		<0.05		<0.05	0.20<p<0.25 *	
				17	0.15<p<0.20 *	p<0.05 *	<0.05 *				<0.05		0.15<p<0.20 *
				15			<0.05 *	0.70<p<0.75 *			<0.05		
				12			<0.05 *		0.65<p<0.70 *	<0.05	<0.05	>0.8	
				10	0.90<p<0.95 *		<0.05 *			0.75<p<0.80 *	<0.05	0.20<p<0.25 *	<0.05 *
				7	0.80<p<0.85 *		<0.05 *	0.05<p<0.10 *		<0.05	<0.05	0.70<p<0.75 *	<0.05 *
				5			<0.05 *	0.05<p<0.10 *	0.65<p<0.70 *	<0.05	<0.05		
				5					0.65<p<0.70 *	<0.05	<0.05	0.15<p<0.20 *	
				4		p<0.05 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.95	<0.05		<0.05 *	0.60<p<0.65 *
				4			<0.05 *	0.05<p<0.10 *		<0.05		<0.05 *	>0.95 *
				4		p<0.05 *			0.90<p<0.95 *	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				3		p<0.05 *	<0.05 *	0.70<p<0.75 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				3		p<0.05 *	<0.05 *	0.85<p<0.90 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				3	0.15<p<0.20 *	p<0.05 *	<0.05 *	0.60<p<0.65 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				3			<0.05 *	0.60<p<0.65 *		<0.05			
				3	0.15<p<0.20 *	p<0.05 *	<0.05 *				<0.05	0.15<p<0.20 *	0.60<p<0.65 *
				3		p<0.05 *	<0.05 *		0.55<p<0.60 *		<0.05	0.20<p<0.25 *	
				3			<0.05 *			<0.05	<0.05		0.15<p<0.20 *
				2		>0.95	<0.05 *	0.05<p<0.10 *	<0.05	>0.95	<0.05	<0.05 *	
				2	p<0.05	p<0.05 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.95	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				2			<0.05 *			0.45<p<0.50 *	<0.05		<0.05 *
				2		p<0.05 *	<0.05 *		0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05		
				2		p<0.05 *	<0.05 *	>0.95			<0.05	<0.05 *	
				2		p<0.05 *		0.60<p<0.65 *	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05		0.60<p<0.65 *
				2	0.15<p<0.20 *		<0.05 *		<0.05	<0.05	<0.05	0.20<p<0.25 *	
				1		p<0.05 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.95	<0.05		<0.05 *	
				1	p<0.05	p<0.05 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.95	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				1	p<0.05	p<0.05 *	<0.05 *	<0.05 *	>0.95	<0.05			<0.05 *
				1		p<0.05 *	<0.05 *		0.55<p<0.60 *	<0.05	<0.05	>0.95	<0.05 *
				1	0.15<p<0.20 *	p<0.05 *	<0.05 *	0.85<p<0.90 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				1		p<0.05 *	<0.05 *			<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95 *
				1	0.15<p<0.20 *	p<0.05 *	<0.05 *			<0.05	<0.05	>0.95	<0.05 *
				1			<0.05 *		<0.05	<0.05	<0.05		>0.95 *
				1	0.95<p		<0.05 *		0.05<p<0.10 *		<0.05	>0.95	<0.05 *

[a] Comparisons consisted to confront each combination frequency of snow to the one of leaf litter independently of the site or date.

[b] Comparisons consisted to confront each combination frequency of each site to the others, independently of the substrate or date

[c] Comparisons consisted to confront each combination frequency of each date to the others, independently of the site or substrate.

[d] Comparisons consisted to confront each combination frequency of each sample of leaf litter to the others.

[e] Comparisons consisted to confront each combination frequency of each sample of snowr to the others.

[f] Aggressiveness on cantaloupe was determined by inoculation of a dozen cotyledons per strain and ranked in three class; class AGR1 (white squares) included the nonvirulent strains and those which the severity score was <1; AGR2 (grey squares) whose more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean disease score was between 1 and 2; AGR3 (black squares) whose more than half of the cotyledons showed symptoms and the mean score disease >2).

[g] Squares were filled with black when the strain induced a necrosis on tobacco and filled in white if it did not.

[h] Four classes were considered for the production of syringomycin-like toxins representing by squares with an increasing gradient of grey; the less productive (SYR1 in white) to the more productive (SYR4 in black). The class SYR1 gathered strains induced a zone of antibiosis against Geotrichum candidum ≤ 2 mm. The width range (in mm) induced by strains in class SYR2, SYR3 and SYR4 were respectively of 2 < μ ≤ 6, 6 < μ ≤ 10 and ≥ 11.

[i] Ice nucleation activity was determined with a population of 106 cells and consisted in three categories ; strains in class INA1 (white squares) no ice nucleation activity at -8° C or warmer ; INA2 (grey squares) ice nucleation activity between -7°C and -5°C ; and INA3 (black squares) ice nucleation activity between -4°C and -2°C.

[j] Combinations were presented as a function of their rank of representativeness into the whole set of strains phenotyped in the leaf litter and the first layer of snow.

Table I-3. Continued. Legend is on the previous page.

Combination				Number of strains[j]	Leaf litter[d]							Snow[e]											
AGR[f]	HR[g]	SYR[h]	INA[i]		CEL1	CEL2	CVL1	CVL2	SZL1	SZL2	LAL3	CEN1	CEN9	CEN12	CEN15	CVN1	CVN14	CVN17	LAN14	SZN1	SZN9	SZN12	SZN15
				111	0.05<p<0.10 *		0.40<p<0.45 *		<0.05	<0.05		<0.05 *	0.20<p<0.25 *	<0.05	0.35<p<0.40 *	<0.05				<0.05		<0.05	<0.05
				96	0.05<p<0.10 *		<0.05 *				0.35<p<0.40 *	<0.05 *	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05		0.50<p<0.55 *		<0.05		<0.05
				67	0.30<p<0.35 *		<0.05 *	<0.05	<0.05	0.45<p<0.50 *	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05 *		0.30<p<0.35 *	<0.05	0.40<p<0.45 *
				54	0.05<p<0.10 *	0.45<p<0.50 *	<0.05 *	<0.05	<0.05			<0.05 *	<0.05 *		0.35<p<0.40 *	<0.05	<0.05				<0.05	<0.05	
				49	<0.05	<0.05	0.40<p<0.45 *					<0.05 *	<0.05 *	<0.05		<0.05	0.45<p<0.50 *	<0.05	<0.05 *	<0.05			
				49	0.05<p<0.10 *		<0.05 *	<0.05		<0.05		<0.05 *	<0.05 *	<0.05			<0.05	<0.05	0.50<p<0.55 *	<0.05	<0.05		<0.05
				39	0.05<p<0.10 *		0.40<p<0.45 *	<0.05		<0.05		<0.05 *	0.45<p<0.50 *			<0.05	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05	<0.05
				33	0.40<p<0.45 *	<0.05	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05	0.25<p<0.30 *	<0.05 *				<0.05	0.15<p<0.20 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
				24	0.05<p<0.10 *		<0.05 *	<0.05		<0.05		<0.05 *	<0.05 *	<0.05			<0.05	<0.05		<0.05	<0.05		
				22	0.40<p<0.45 *		<0.05 *		<0.05		<0.05	<0.05 *	<0.05 *		<0.05		<0.05	0.15<p<0.20 *	<0.05 *		0.30<p<0.35 *	<0.05	<0.05
				21	0.05<p<0.10 *	<0.05		0.80<p<0.85 *	0.35<p<0.40 *	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	<0.05			<0.05		<0.05 *	0.45<p<0.50 *	<0.05		<0.05
				20	0.40<p<0.45 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05 *				<0.05	0.15<p<0.20 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
				17	<0.05				0.35<p<0.40 *	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05 *	>0.95 *	<0.05		<0.05
				15	<0.05	<0.05		0.65<p<0.70 *		<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *		<0.05	<0.05	<0.05		0.50<p<0.55 *	0.70<p<0.75 *	<0.05		<0.05
				12	0.05<p<0.10 *					<0.05		<0.05 *	<0.05 *				<0.05	<0.05	<0.05 *		<0.05		<0.05
				10	0.40<p<0.45 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	0.60<p<0.65 *	<0.05	<0.05	0.55<p<0.60 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	0.40<p<0.45 *	<0.05	0.15<p<0.20 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
				7	0.30<p<0.35 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	0.35<p<0.40 *	<0.05	<0.05	0.25<p<0.30 *	<0.05 *			<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		
				5	0.30<p<0.35 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05
				5	<0.05		<0.05 *		<0.05	0.45<p<0.50 *		<0.05 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		0.40<p<0.45 *
				4	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05	>0.95	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05	>0.95	<0.05	0.40<p<0.45 *
				4	<0.05		<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05												
				4	<0.05	<0.05	<0.05 *		<0.05			<0.05 *	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05		0.50<p<0.55 *
				3	<0.05	<0.05		0.85<p<0.90 *		<0.05	<0.05												
				3	<0.05	<0.05		>0.95	<0.05	<0.05	<0.05												
				3	<0.05	<0.05		>0.95		<0.05	<0.05												
				3	<0.05	<0.05			<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	0.20<p<0.25 *	<0.05	<0.05	<0.05				0.45<p<0.50 *	<0.05	<0.05	<0.05
				3		<0.05	<0.05 *	0.85<p<0.90 *		<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *		<0.05	<0.05	<0.05		0.50<p<0.55 *		<0.05		<0.05
				3		<0.05	<0.05 *	0.60<p<0.65 *	0.35<p<0.40 *	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	<0.05	<0.05		<0.05		<0.05 *	0.90<p<0.95 *	<0.05		<0.05
				3		<0.05	<0.05 *			<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *	0.85<p<0.90 *	<0.05		<0.05	<0.05	<0.05 *		<0.05		<0.05
				2								0.55<p<0.60 *	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
				2	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05	>0.95	<0.05												
				2								0.25<p<0.30 *	<0.05 *		<0.05		<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
				2	<0.05	<0.05		0.60<p<0.65 *		<0.05	<0.05	<0.05 *	0.45<p<0.50 *		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05			<0.05	<0.05	<0.05
				2	<0.05	<0.05		>0.95		<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05 *		<0.05		<0.05	<0.05			<0.05		
				2	<0.05	<0.05				<0.05	<0.05												
				2		<0.05	<0.05 *	0.60<p<0.65 *		<0.05	<0.05			0.60<p<0.65 *									
				1								<0.05 *	<0.05 *		<0.05		<0.05	0.15<p<0.20 *	<0.05 *	<0.05	>0.95	<0.05	<0.05
				1	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05 *	<0.05	<0.05	>0.95	<0.05												
				1	0.05<p<0.10 *	<0.05	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05												
				1	<0.05	<0.05	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05												
				1	<0.05	<0.05	<0.05 *	>0.95	<0.05	<0.05	<0.05												
				1	<0.05					<0.05	<0.05	<0.05 *	0.20<p<0.25 *	<0.05	<0.05	<0.05					<0.05	<0.05	<0.05
				1	<0.05					<0.05	<0.05												
				1		>0.95	<0.05 *	<0.05		<0.05	<0.05												
				1								<0.05 *	<0.05 *	0.50<p<0.55 *	<0.05		<0.05	<0.05			<0.05		

I.3. Synthèse

Ces travaux se sont intéressés à la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux saisonnier, ainsi qu'à sa dynamique durant l'hiver. À travers les deux campagnes d'échantillonnage qui ont été menées en 2009 et 2010 sur 4 sites des Alpes du Sud, nous avons validé l'hypothèse selon laquelle *P. syringae* est présente dans le manteau neigeux sur l'ensemble du bassin versant jusqu'à la période de fonte. Cependant, alors que nous pensions que la taille des populations était distribuée de manière homogène sur toute l'épaisseur de neige, nous avons mis en évidence une stratification décroissante de la strate en contact avec le sol jusqu'à sa surface. La faible fréquence de déposition de *P. syringae* avec les précipitations de neige ne suffisait pas à elle seule pour expliquer les fortes densités de populations dans le manteau neigeux. Nous avons donc soupçonné le rôle d'autres intrants. L'essentiel des populations étant concentré dans la couche en contact avec le sol, nous avons émis les hypothèses que (i) la litière abrite des populations résidentes de *P. syringae* et (ii) la structure des populations dans la neige est définie par l'émigration des populations de la litière. Nous avons validé les deux hypothèses.

Ainsi, la détection systématique de *P. syringae* sur la litière et les herbes, en automne et sous le manteau neigeux en hiver, a montré que la matière végétale morte et en décomposition était un habitat régulier pour la bactérie. Nous avons mis en évidence des densités de populations parfois aussi importantes que celles sur la surface de plantes saines et malades ayant été reportées auparavant. Ces résultats donnent un nouvel aperçu du cycle de vie de *P. syringae* en montrant que la litière et la végétation des prairies alpines sont des réservoirs majeurs.

Le processus d'émigration de ces populations vers le manteau neigeux a été validé par la mise en place des microcosmes de neige au Col du Lautaret. Nous n'avons pas reproduit les mêmes tailles des populations dans la neige que celles estimées par les observations de terrain. La dynamique des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux serait alors le fruit de son émigration de la litière, de l'apport des précipitations, des processus de suspension et déposition par le vent, et de sa multiplication.

Enfin nous avons mis en évidence l'inverse de ce que nous attendions sur la diversité phénotypique et génotypique du manteau neigeux. Nous supposions que les

populations de ces deux environnements (litière et manteau neigeux) ne représenteraient seulement que quelques lignées génétiques et traits de vie liés au pouvoir pathogène. Or nous avons trouvé une énorme diversité qui ne semblait pas structuré par les facteurs analysés. Les analyses de génétique des populations ont montré les importants flux à l'échelle du bassin versant. Ces résultats confirment donc l'adaptation de *P. syringae* a ces environnements agricoles quelque soit le phénotype (pathogène ou non, gamme d'hôte large ou étroite).

Dans l'objectif global de la thèse, ces recherches ont permis :

- d'identifier un nouveau réservoir (litière) à prendre en compte dans le modèle de dissémination de *P. syringae*, dont on pourrait explorer le rôle dans les cultures.
- d'estimer la taille de la metapopulation dans les prairies en milieu alpin dans le manteau neigeux et sur le sol.
- d'identifier un nouveau flux (de la litière vers le manteau neigeux)
- d'estimer l'entrée de *P. syringae* à travers les chutes de neige en hiver

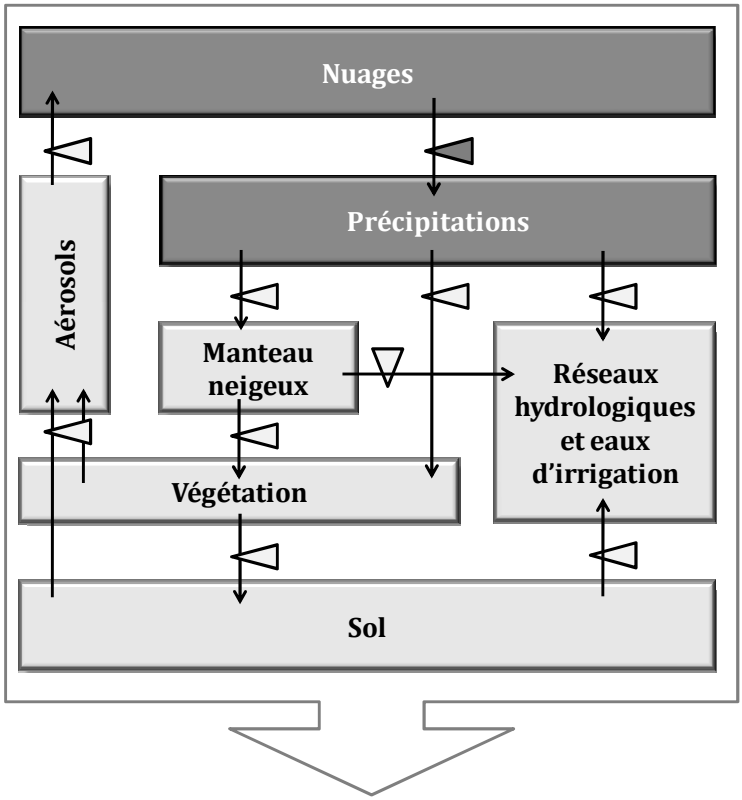
II. Estimation du transport et de la déposition de *P. syringae* par les précipitations en fonction des trajectoires des masses d'air et de leurs propriétés physiques

II.1. Introduction

Dans le chapitre précédant, nous avons remarqué l'arrivée sporadique de *P. syringae* avec les précipitations. Cette observation a soulevé des questions sur le rôle des précipitations dans la dissémination de *P. syringae* et son retour vers la surface de la Terre. Plusieurs études avaient mentionné la présence de *P. syringae* dans la pluie et les chutes de neiges (Constantinidou *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2008; Sands *et al.*, 1982), mais sans jamais déterminer les conditions propices à sa présence. En vue d'évaluer l'impact des transferts au cours du cycle de l'eau sur les populations de *P. syringae*, nous avons considéré les chutes de neige mais également celles de pluie et cela, quelque soit la saison et l'altitude. Nous avons couplés nos observations à un modèle météorologique (HYPLIT) dans les objectifs suivants : (i) évaluer la fréquence d'arrivée de *P. syringae* en fonction du type de précipitation, (ii) évaluer la taille des populations et (iii) d'identifier les conditions climatiques favorables à sa dissémination. L'échantillonnage effectué en 2008 et 2010 a été complété par une dizaine d'échantillons prélevés auparavant et a permis de tester les hypothèses suivantes :

- *P. syringae* est présente dans toutes les précipitations
- Si non, sa présence est déterminée par des paramètres climatiques, les mêmes qui sont compatibles avec son émission dans l'atmosphère
- Les conditions qui influencent sa présence dans les précipitations sont similaires de celles d'autres microorganismes phytopathogènes dispersés par le vent

Ces travaux ont fait l'objet d'un article qui va être soumis très prochainement à la revue *Biogeosciences* (qui aborde les compartiments colorés en gris foncé dans le diagramme ci-dessous).



Prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations d'un bassin versant

RÉSUMÉ

La répartition géographique mondiale des populations de la bactérie phytopathogène et glaçogène *Pseudomonas syringae* ne montre aucune tendance marquée. Sa présence régulière dans les chutes pluie et de neige suggère que les masses d'air qui contribuent à la précipitation sont des vecteurs de diffusion à longue distance de cette bactérie expliquant ainsi l'absence de motifs. Pour élucider les conditions favorables à la diffusion de *P. syringae* par les précipitations, 88 échantillons de pluie et de neige fraîchement tombée, recueillies de 2006 à 2010 dans le sud et le centre de la France, ont été analysés pour leur composition microbiologique. Les propriétés physiques des masses d'air associé à la précipitation (température, humidité relative, etc), à plusieurs altitudes de la couche limite planétaire et jusqu'à 5 jours avant l'événement de précipitation, ont été obtenues à partir du modèle HYSPLIT. La bactérie a été détectée dans 65% des échantillons de pluie, mais seulement dans 12% des échantillons de neige (le seuil de détection est de 5 bactéries cultivables L^{-1}) avec les tailles de population découlant $1,3 \times 10^5$ CFU L^{-1}. Les précipitations transportant *P. syringae* étaient moins acides, plus électriquement conductrices, et étaient portées avec

des masses d'air venant de l'Ouest et du Sud de la France. Comparé aux précipitations dans lesquelles la bactérie était absente, les masses d'air expérimentaient des températures plus élevées, moins souvent négatives, et étaient plus exposées aux rayonnements incidents du Soleil. L'ensemble des paramètres liés à la présence de *P. syringae* dans les précipitations n'est pas relié à la présence du champignon *Botrytis cinerea* se disséminant par voie aérienne, qui a été plus fréquemment détecté.

II.2. Article en cours de soumission à *Biogeosciences*

Occurrence of *Pseudomonas syringae* in rain and snowfall is markedly influenced by the origin, temperature and the incident solar radiation of the associated air masses.

Caroline L. MONTEIL, Marc BARDIN and Cindy E. MORRIS*

INRA, UR407 de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, BP. 94, 84140 Montfavet cedex, France.

Subject category: Environmental Microbiology

Key words: HYSPLIT, microbial ecology, *Botrytis cinerea,* ice nucleation activity, epidemiology

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 32 72 28 41; fax: +33 (0)4 32 72 28 42; E-mail: Cindy.Morris@avignon.inra.fr

ABSTRACT

World-wide geographic distributions of populations of the plant pathogen and ice nucleation-active bacterium *Pseudomonas syringae* have no marked patterns. Its regular occurrence in fresh rain- and snow-fall suggests that air masses contributing to precipitation are vectors for long distance dissemination of this bacterium thereby explaining the lack of patterns. To elucidate the conditions favorable for dissemination of *P. syringae* via precipitation, 88 samples of freshly fallen rain and snow, collected from 2006 – 2010 in southern and central France, were analyzed for microbiological composition. Physical properties of the air masses associated with the precipitation (temperature, relative humidity, etc), at several altitudes of the planetary boundary layer and for up to 5 days before the precipitation event, were obtained from computations with the HYSPLIT model. The bacterium was detected in 65 % of rain samples but only in 12 % of snow samples (the detection threshold was 5 culturable bacteria L^{-1}) with population sizes arising 1.3×10^5 CFU L^{-1}. Precipitations carrying *P. syringae* were less acid, more electrically conductive, and were

brought with air masses coming from South and West of France. Compared to precipitations in which the bacterium was absent, air masses experienced higher temperatures and were less frequently negative, and showed higher exposure to solar radiation. The parameters correlated with the occurrence of *P. syringae* in precipitations were not linked to the occurrence of the aerial dispersed fungus *Botrytis cinerea*, which overall was more frequently detected in both rain and snowfall.

INTRODUCTION

Plant diseases can spread across continents and beyond as illustrated by stem rust of wheat, apple scab, late blight of potato, bleeding canker of horse chestnut and bacterial blight of kiwi (Aylor, 2003; Aylor *et al.*, 2011; Ferrante and Scortichini, 2010; Gladieux *et al.*, 2008; Green *et al.*, 2010). Among the modes of dissemination of plant pathogens, air-borne transport can play a considerable role. Identifying the likely pathways of aerial dissemination and the concomitant favorable conditions are key to predicting where and when aerially-disseminated diseases might emerge. More fundamentally, describing the pathway of dissemination of plant pathogens yields important clues into the range of environmental contexts that have possibly provided selective pressures for their adaptation and diversification.

As for all air-borne micro-organisms, atmospheric dissemination of bacteria involves mechanisms related to their emission from various sources, their transport in the atmosphere via the circulation of air masses, and their deposition back to Earth's surface. This has been well documented for decades from the equator to the poles, at several meters near the Earth's surface to the troposphere as reviewed by Gregory (1961), Burrows *et al.* (2009b) and Delort *et al.* (2010). Bacterial community structure has been assessed in aerosols of different ecosystems (Bowers *et al.*, 2009; 2011; Fierer *et al.*, 2008; Pearce *et al.*, 2009; Polymenakou *et al.*, 2008), as in clouds (Amato *et al.*, 2007a; Kourtev *et al.*, 2011). Some studies have characterized bacterial fluxes, climatic parameters and mechanisms related to their emission (Lighthart, 1997; 1999; Lighthart and Shaffer, 1997; Lindemann *et al.*, 1982). More recently, the survival and metabolic activity of air-borne bacteria were also studied for their potential role in atmospheric chemistry, the formation of clouds, precipitation and radiative forcing as discussed by Morris *et al.* (2011). However, even if bacterial dispersal through the atmosphere has

been studied for many years, the climatic conditions conducive to the long-range transport and deposition of bacteria remain poorly understood, especially for plant pathogens. This information coupled to meteorological models and ecosystem types could be very useful to better forecast plant pathogen deposition on host canopies and exchanges between sources.

Such an approach has been used to understand and forecast aerial spore dispersal of fungal pathogens over short and long distances. For example, Pfender *et al.* (2006) estimated the dry dispersion of *Puccinia graminis* from infected perennial ryegrass at the landscape scale with CALPUFF. Aylor and coworkers built Lagrangian and Gaussian plume models and used meteorogical data to estimate spores dispersal within and between fields for several diseases such as apple scab, tobacco blue mold, potato late blight and stem rust of wheat (Aylor, 1990; Aylor, 1998; Aylor, 2003; Aylor and Flesch, 2001; Aylor *et al.*, 2011). Several long-range transport studies used trajectory analysis which is a standard tool for meteorologists (Davis, 1987). Currently, most of the simulations are computed with the HYSPLIT-4 model — HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory. Pan *et al.* (2006) used this model to predict the long-term spore dispersal of *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. In the same way, Wang *et al.* (2010) estimated the long-distance spore transport of *Puccinia striiformis* f. sp. *triitici*, responsible for stripe rust of wheat in southwestern China. HYSPLIT-4 was also used to evaluate spread of vectors associated to plant diseases. For example, Zhu *et al.* (2006) attempted to identify low-level jet streams bringing the green peach aphid, *Myzus persicae* and other cereal aphid species, vectors of *Potato leafroll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY) in the U.S. northern Great Plains.

Pseudomonas syringae is an aerially-disseminated plant pathogen whose life history is associated with the water cycle (Morris *et al.*, 2008). It is among the diverse microbiota in water drops in clouds (Amato *et al.*, 2007a; Sands *et al.*, 1982) and it precipitates back to the ground with rain and snow (Constantinidou *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2008). Furthermore, some cells of this species produce a highly active ice nucleating protein on their outer surface (Lindow, 1983; Möhler *et al.*, 2008; Wolber *et al.*, 1986) leading to the suggestion that when this bacterium is in clouds it can initiate freezing of super cooled droplets thereby leading to precipitation (Morris *et al.*, 2004; Sands *et al.*, 1982). Interestingly, all strains of this bacterium isolated to date from rain

and snowfall are ice nucleation active, whereas this is not the case for strains obtained from other substrates colonized by this species (Morris *et al.*, 2008). A population genetics analysis of strains from fresh water sources across several continents in the North and South hemispheres revealed the lack of a distinctive geographic distribution (Morris *et al.*, 2010), an observation that is compatible with an effective long distance dissemination via the atmosphere.

Bacterial cells such as those of *P. syringae* are at least ten-fold smaller than most fungal spores thereby being considerably light. Precipitation is likely to be the most efficient process to deposit such light particles once they are entrained in aerosols. Therefore, our objective was to identify the conditions most conducive to the deposition of *P. syringae* with precipitation. For this work we sampled rain and snowfall from 88 precipitation events between 2005 and 2010 in Southern France, and used HYSPLIT-4 to identify trajectories and conditions conducive to its deposition. Our initial hypothesis was that *P. syringae* is deposited by all precipitation events in this region of France (rain and snow) independently of the origin of the air mass or the climatic conditions of the air mass along its trajectory. To compare the behavior of *P. syringae* with another ubiquitous aerially disseminated plant pathogen, we also determined the presence of the fungus *Botrytis cinerea* in a subset of the samples.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of snowfall and rainfall.

The field study was carried out between December 2005 and November 2010 at 14 sites mostly in southern France (Table II-1). A total of 23 fresh rainfalls and 65 fresh snowfalls were collected for which sampling characteristics and microbial population sizes are presented in Supplementary Table II-4. Rain and snow were sampled from sterile plastic tubs or on clean plastic tarps (1 m^2) that had been placed on the ground or on previously fallen snow before each anticipated event. Tarps and tubs were protected from contamination by rain-splashed soil. Samples were collected no later than 3h after the end of the snowfall event or when at least 200 – 500 ml of rainwater accumulated. Samples were kept in a cooler, transported to the laboratory and processed on the following day. Measurements of electrical conductivity

Table II-1. Sampling sites and number of samples collected

County	Site	Latitude[a]	Longitude	Altitude (m)	Number of samples	
					Snow	Rain
Alpes de Haute Provence	Col de Vars	44.537	6.785	2100	4	0
	Savines le Lac	44.539	6.426	830	0	1
	Super Sauze	44.349	6.710	2000	38	0
Bouches-du-Rhône	Châteaurenard	43.881	4.859	55	0	2
Haute Savoie	La Clusaz	45.906	6.436	1104	1	0
	Les Carroz d'Araches	46.026	6.638	1111	2	0
Hautes Alpes	Ceillac	46.026	6.638	2200	7	0
	Col du Lautaret	45.036	6.400	2100	4	1
Isère	Villars de Lans	45.052	5.564	1200	2	0
Pyrénnées Orientales	Font Romeu, Aveillans	43.521	2.063	1780	1	0
	Font Romeu, Roc de la Calme	42.505	2.042	1104	1	0
Savoie	Saint-François Longchamp	45.410	6.348	1700	1	0
Vaucluse	Montfavet	43.946	4.864	25	1	6
	St. Saturnin-les-Avignon	43.959	4.923	83	3	13

[a] GPS coordonates are converted in decimal degrees.

and pH were performed directly on the unprocessed sample with an electrochemical analyser (Consort C561, UK, reference temperature at 25°C). Electrical conductivities and pH values had respectively an accuracy of ± 1µS cm^{-1} and ± 0.01 pH unit.

Quantification of micro-organisms

Snow samples were thawed overnight at room temperature. Snowmelt water and rain water were processed within 24 h as described previously (Morris *et al.*, 2008). Samples were concentrated by a factor of 200 by filtration across sterile nitrous cellulose filters (pore diameter 0.22 µm) before dilution plating. Aliquots of the same samples were used to enumerate *B. cinerea* (in 27 samples) and *P. syringae* and total culturable bacteria (in all samples) as described below.

The concentrated samples were dilution-plated on KBC medium (Mohan and Schaad, 1987), a semi-selective medium for *P. syringae* used in our previous studies (Morris *et al.*, 2008) and on 10% tryptic soy agar (TSA) to enumerate the total mesophilic bacterial flora. Plates were incubated for up to 5 days at 22-25°C. At least thirty strains of *P. syringae* chosen randomly from a single dilution were purified from each sample. Strains were tested for production of fluorescent pigment on King's medium B (King *et al.*, 1954) and the absence of arginine dihydrolase and of cytochrome c oxidase as described previously (Morris *et al.*, 2008). For the enumeration of *B. cinerea,* the processed samples were plated on selective BSTM medium (Edwards and Seddon, 2001). The number of developing colonies was recorded after 7 to 14 days of incubation

at 20°C and colonies were transferred to PDA medium. The identity of the colony was confirmed by macroscopic and microscopic (x100) observations after 7 to 10 days incubation. The detection thresholds were 5 colony-forming units (CFU) L^{-1} for the target plant pathogens, and 55 CFU L^{-1} of rain or melted snow for total bacteria.

Determination of trajectories and climatic conditions characterizing air masses

The trajectories and the associated climatic conditions of air masses arriving on the day of the precipitation event were determined with the HYSPLIT model version 4 (HYbrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory, http://ready.arl.noaa.gov/ready/HYSPLIT4.html). This model, developed by NOAA Air Ressources Laboratory and Australia's Bureau of Meteorology, calculates forward and backward trajectories in addition to the associated climatic conditions using previously gridded meteorological data, and provides simulations for atmospheric particle dispersion and deposition (Draxier and Hess, 1998). The backward trajectory of air masses for each precipitation event was determined for the period of 120 h and 48 h preceding the event for endpoint elevations of 50, 500 and 1000 m above ground level (AGL). These altitudes were chosen to represent a vertical section of the planetary boundary layer defined in the review of Gregory (1961). Hourly climatic parameters were also obtained from the data base: precipitation (mm), sun flux (W / m^2), relative humidity (%), pressure (hPa), altitude (m) and temperature (°Celsius). The meteorological data GDAS (Global Data Assimilation System) used by this model were produced by the National Center for Environmental Prediction (NCEP). The total distance traveled by air masses (km) was calculated with Quantum GIS version 1.7.0 (Quantum GIS Development Team, 2011).

Statistical analyses

To compare the frequencies of samples containing *P. syringae* with the associated air mass properties, data from all samples were used for statistical analyses. To compare the relative frequencies of occurrence of *P. syringae* and *B. cinerea* in the different samples and in relation to atmospheric conditions, only data of the subsample (n = 27), analyzed for both pathogens, were used. Frequencies of

Table II-2. Frequency of precipitations carrying *P. syringae* and *B. cinerea*
The subsample corresponded to the precipitations for which the two microorganism were quantified. Values associated with the same letter (lowercase or capital letters)were not significantly different (Fisher-exact test, $p < 0.05$).

		Frequency of sample carrying the target microorganism (%)		
Samples set used	Plant pathogen	All precipitations	Rain	Snow
Whole sample (n=88)				
	P. syringae	26.1[a]	65.2[A]	12.3[B]
Subsample (n=27)				
	P. syringae	29.6[a]	45.5[A]	18.8[AB]
	B. cinerea	59.2[b]	72.7[A]	50.0[A]

occurrence were compared with multiple pair-wise Fisher's exact test and were considered significantly different when $p < 0.05$. The minimum, maximum, average, or sum of each of the physical parameters of the air masses were calculated over 48-hr and 120-hr periods preceding the sampling time for each of the endpoint altitudes and each sample. Means were then compared with ANOVA and Kruskall Wallis tests ($p < 0.05$). Statistical analyses were done with the R software version 2.9.1 (The R Development Core Team, 2009). To compare abundances of the pathogens between samples when they were detected, values for population density were $\log_{10}$ transformed prior to calculations.

RESULTS

P. syringae is carried more frequently, but at lower concentrations, by rain than by snowfalls

P. syringae was detected in 26% of all of the 88 precipitation samples analyzed (snow and rain combined). For the subset of samples analyzed for both pathogens, *B. cinerea* was detected at twice the rate of *P. syringae* (59 % vs. 30 %, Fisher-exact test, $p = 0.06$) (Table II-2). There was a significant effect ($p < 0.05$) of the type of precipitation on the occurrence of *P. syringae*, with 65 % of the rain events carrying the bacterium vs. 12% of snowfalls. For the subset used to compare the two pathogens, this tendency was slightly less marked for *P. syringae* (46% vs 19%, $p = 0.2$) but notably insignificant for *B. cinerea* (73% vs. 50%, $p = 0.4$) (Table II-2).

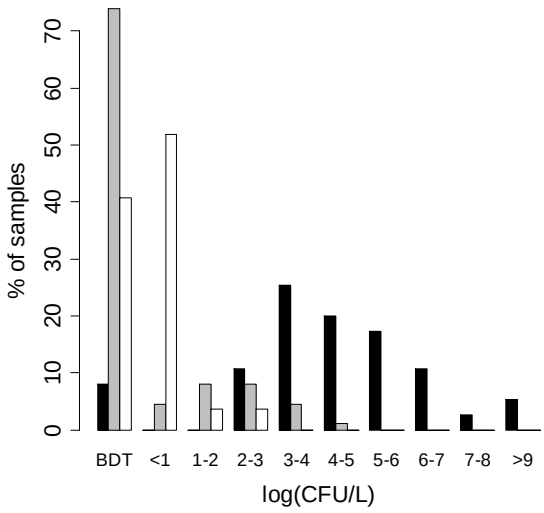


Figure II-1. Population densities of total culturable bacteria, *P. syringae* and *B. cinerea* in rainfalls and snowfalls
Total culturable bacteria were represented by black bars, *P. syringae* by grey bars and *B. cinerea* by white bars. BDT means "under Bacterial Detection Treshold".

Although rain carried *P. syringae* more frequently than snowfall, the population densities in snowfall were on average ten-fold greater than in rain when the bacterium was detected (means of about 500 CFU L^{-1} for rain vs. 5000 CFU L^{-1} in snow, ANOVA, $p < 0.05$). This difference of population size between rainfalls and snowfalls was not observed for total culturable bacteria nor for *B. cinerea* (ANOVA, $p < 0.05$) whose densities ranged from 189 CFU L^{-1} to 9.89×10^8 CFU L^{-1}, and from 2 to 1000 CFU L^{-1}, respectively (Figure II-1). Overall, the population densities of *P. syringae* in precipitation were 100-fold greater than those of *B. cinerea*.

Precipitation that carries *P. syringae* is brought by air masses coming from the south and west of France

Backward trajectories associated with each target organism and computed for the 120 h preceding the sampling for the 500 m a.g.l. elevation are shown in Supplementary Figure II-4 and Figure II-5. Each air mass trajectory of this study was classified according to the three geographical sectors defined by Celle-Jeanton *et al.* (2009) for precipitations in southeastern France: West (region 1), North and East (region 2) and Mediterranean (region 3). Among our samples, air masses coming from region 2 were dominant compared to those from the other regions (Figure II-2 and Figure II-3) in part due to the particular effort to capture fresh snowfall in this study.

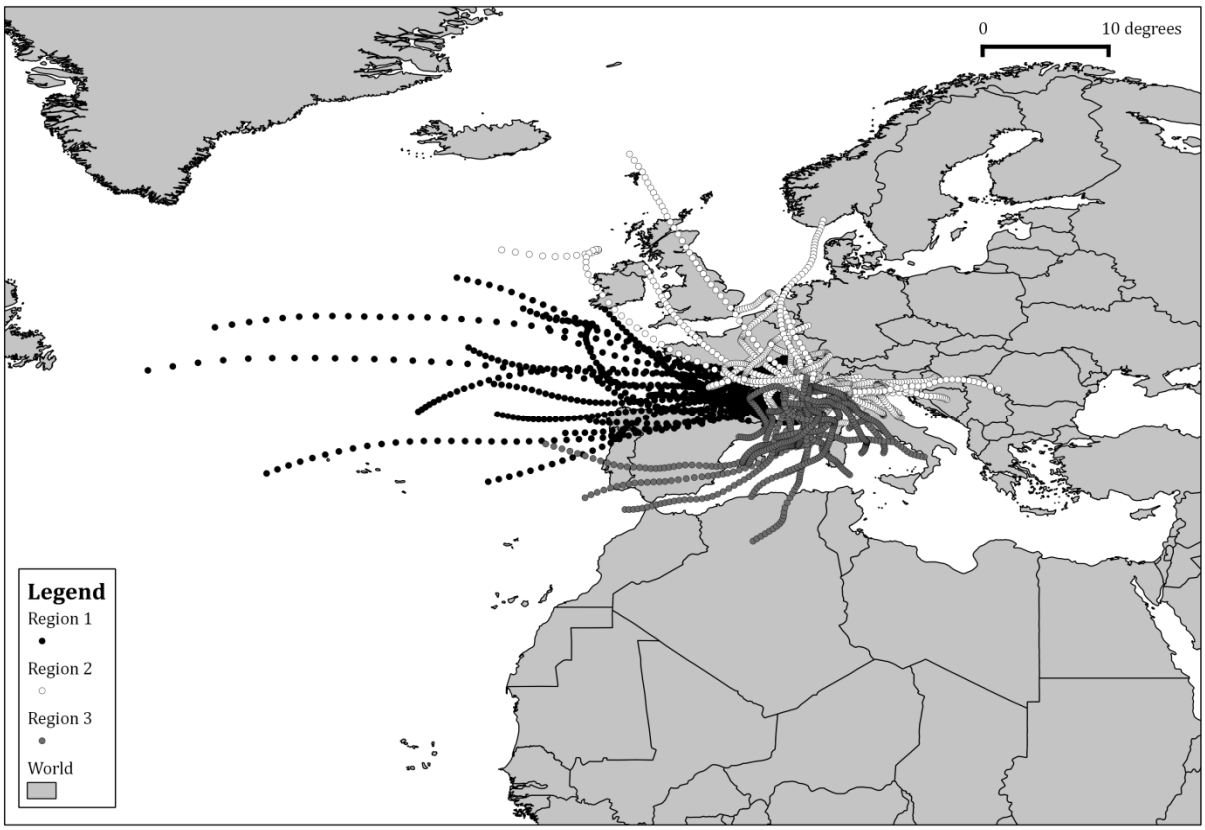


Figure II-2. Backward trajectories of air masses associated with the 88 precipitation samples
Backward trajectories are plotted for the 48 h preceding the sampling for the 500 m a.g.l. elevation. Each circle corresponds to a spatial coordinate for each hour. Each air mass trajectory was classified according to the three geographical sectors defined by Celle-Jeanton *et al.* (2009) for precipitations in southeastern France: West (region 1), North and East (region 2) and Mediterranean (region 3).

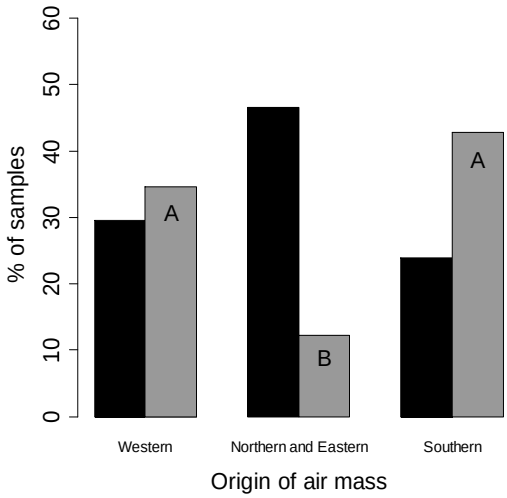


Figure II-3. Occurrence of *P. syringae* in precipitations according to the origin of air masses
The black bars represent the frequency of precipitations coming from each origin described by Celle-Jeanton et al. (2009) among the samples used in this study. Frequencies of samples carrying *P. syringae* for each origin are represented by grey bars. Values associated with the same letter are not significantly different (Fisher-exact test, $p < 0.05$).

However, they carried *P. syringae* significantly less frequently (12 %) than air masses from the other regions (35 % and 43%) (Fisher's exact test pairwise, $p < 0.05$). No significant difference was observed among the different origins of air masses in terms of the frequency of precipitations carrying *B. cinerea* (43, 67 and 67% of air masses from regions 1, 2 and 3, respectively). However, the occurrence of the pathogens in precipitation of region 2 was five times more frequent for the fungus; this difference was significant according to the Fisher-exact test ($p < 0.05$).

Electrical conductivity and pH of precipitation and the mean temperature and cumulative sun flux of the air masses during their trajectories have significant effects on the occurrence of *P. syringae* in precipitation.

Precipitation samples were characterized in terms of pH and electrical conductivity. Those carrying *P. syringae* were significantly more conductive (13 vs. 8) and less acid (6.21 vs. 5.76) (ANOVA, $p < 0.05$) than those in which *P. syringae* was not detected. Several other physical parameters were consistently significantly different between air masses carrying *P. syringae* and those without (Table II-3). For all endpoint altitudes and for both trajectory periods, the cumulative solar radiation received by the air mass was 30 to 40 % higher when *P. syringae* was detected in precipitation than when it was below the detection threshold. Temperature was the second parameter for which strong differences were observed, especially the minimum and mean temperature for the 50 m and 500 m endpoint altitude and the maximum for all endpoint altitudes, whatever the trajectory period. Air masses associated with precipitations containing *P. syringae* were warmer, by at least about 5°C, than those in which the bacterium was not detected, in terms of either the minimum, maximum or mean temperature during the trajectory period. Overall the mean temperature of air masses associated with the occurrence of *P. syringae* in precipitations were between 3 and 9°C and those without detectable levels of the bacterium were 2°C or colder. Finally, significant effect of barometric pressure for the 50 m endpoint altitude was observed for both trajectory periods. However, no significant effects of air mass altitude, distance traveled, relative humidity or cumulative rainfall during the trajectory on the occurrence of *P. syringae* were observed.

Barometric pressure, temperature, altitude and sun flux were highly intercorrelated (Spearman's rank test, $p < 0.05$). However, air pressure and altitude did not have a significant effect on the presence of *P. syringae* in air masses as consistently as did temperature and sun flux. Neither relative humidity nor cumulative precipitation from the air mass during its trajectory had a significant effect ($p > 0.05$ for all comparisons) on the detection of *P. syringae* in precipitations.

Parameters linked to the presence of *P. syringae* in precipitation are not necessarily indicative of the presence of the fungus *B. cinerea*.

The number of samples for which data were available for both *P. syringae* and *B. cinerea* was relatively small and was therefore more sensitive to the variability of the data than was the entire data set. Consequently, we did not observe a significant effect of conductivity or sun flux (Supplementary Table II-5) for *P. syringae* for the subset. Likewise, there was no significant effect of these parameters for *B. cinerea* (Table II-5), but it is difficult to determine under these conditions if this is due to the lack of importance of these parameters for *B. cinerea* or if the subsample was too small.

However, the analysis of the subset of data showed the same effect of temperature on the occurrence of *P. syringae* as revealed from analysis of the entire data set (Table II-5). However, there was no significant effect of temperature of the air mass on the presence of *B. cinerea*. For chemical characteristics of precipitation, measurements were not made for samples collected before 2008. Hence for chemical properties only 17 observations were available for samples analysed for both pathogens. Nevertheless, for this subsample the same marked effect of pH on the presence of *P. syringae* was observed (mean pH of 6.13 for samples containing *P. syringae* and 5.77 for those without, Mann Whitney test, $p = 0.064$). However, there was an inverse effect of pH on the presence of *B. cinerea*: samples carrying the fungus tended to be more acidic (mean pH of 5.80) than those without (mean pH of 6.31) (Mann Whitney test, $p = 0.13$).

Table II-3. Physical properties of air masses carrying *P. syringae* during 120 h and 48 h preceding the precipitation event

HYSPLIT gave the climatic data associated to each hour of the backward trajectories at the tree endpoint elevations (50, 500 or 100 m agl). The sum or the minimum, maximum, and mean of the whole physical properties experiencing by air masses were calculated for durations of 120 and 48h. Means of each variable were compared between air masses having produced precipitations in which *P. syringae* was detected versus the ones in which *P. syringae* was not detected. Means were associated to their standard errors. Values were significantly different when they were colored in light grey (ANOVA, $p < 0.1$) or in dark grey (ANOVA, $p < 0.05$). Upper values were in bold.

	120h backward trajectories					
	50m		500m		1000m	
Physical parameter	Present	*Absent*	Present	*Absent*	Present	*Absent*
Sum of sun flux (W / m^2)						
	16108 ± 2169	*10702 ± 1046*	**16617 ± 2357**	*10863 ± 1084*	**17623 ± 2285**	*11135 ± 1138*
Temperature (°C)						
Min	**-4.1 ± 2.8**	*-11.2 ± 1.5*	**-9.0 ± 3.4**	*-14.7 ± 1.6*	-13.7 ± 3.7	*-15.8 ± 1.9*
Max	**14.9 ± 1.0**	*9.1 ± 0.9*	**14.80 ± 1.2**	*9.5 ± 0.9*	**14.1 ± 1.5**	*9.3 ± 1.0*
Mean	**6.8 ± 1.9**	*0.8 ± 1.0*	**5.3 ± 2.4**	*0.0 ± 1.1*	**3.3 ± 2.5**	*-1.2 ± 1.3*
Pressure (hPa)						
Min	**804 ± 19**	*736 ± 13*	722 ± 24	*682 ± 14*	658 ± 29	*667 ± 14*
Max	**1001 ± 6**	*981± 5*	991 ± 8	*976 ± 6*	971 ± 11	*968 ± 7*
Mean	**932 ± 13**	*889 ± 9*	897 ± 19	*867 ± 11*	856 ± 24	*856 ± 11*
Altitude (m agl)						
Min	13 ± 4	*14 ± 3*	133 ± 36	*140 ± 22*	282 ± 62	*275 ± 40*
Max	1260 ± 223	***1828 ± 184***	2106 ± 330	*2378 ± 190*	2837 ± 413	*2437 ± 190*
Mean	482 ± 119	*721 ± 87*	876 ± 197	*997 ± 100*	1297 ± 234	*1146 ± 115*
Relative humidity (%)						
Min	51.4 ± 2.8	*46.4 ± 2.3*	42.2 ± 3.5	*40.6 ± 2.5*	37.2 ± 4.1	*41.6 ± 2.5*
Max	96.7 ± 0.7	*96.8 ± 0.5*	96.0 ± 0.8	*96.7 ± 0.7*	96.8 ± 0.9	*97.0 ± 0.7*
Mean	77.0 ± 1.6	*75.0 ± 1.4*	71.5 ± 1.8	*71.6 ± 1.4*	66.6 ± 2.4	*72.8 ± 1.4*
Sum of Rainfall (mm)						
	21.1 ± 4.0	*22.4 ± 2.1*	22.0 ± 4.0	*23.9 ± 2.5*	18.6 ± 2.7	*21.7 ± 1.8*
Distance traveled (km)						
	4102 ± 285	*3409 ± 230*	4709 ± 303	*4013 ±249*	5496 ± 339	*4465 ± 284*

	48h backward trajectories					
	50m		500m		1000m	
Physical parameter	Present	*Absent*	Present	*Absent*	Present	*Absent*
Sum of sun flux (W / m^2)						
	6169 ± 896	*3925 ± 444*	**6391 ± 922**	*4427 ± 472*	**6939 ± 941**	*4580 ± 457*
Temperature (°C)						
Min	**3.2 ± 1.6**	*-4.1 ± 0.8*	**0.6 ± 1.8**	*-5.6 ± 0.9*	-1.0 ± 1.8	*-8.4 ± 1.1*
Max	**13.9 ± 1.1**	*7.0 ± 0.9*	**13.4 ± 1.2**	*7.9 ± 0.8*	**13.0 ± 1.4**	*7.7± 0.9*
Mean	**9.4 ± 1.2**	*2.1 ± 0.9*	**8.3 ± 1.5**	*2.3 ± 0.9*	**8.0 ± 1.7**	*1.3 ± 1.0*
Pressure (hPa)						
Min	**860 ± 12**	*803 ± 7*	810 ± 14	*766 ± 7*	770 ± 15	*724 ± 8*
Max	**991 ± 6**	*965 ± 5*	976 ± 8	*962 ± 6*	963 ± 10	*946 ± 7*
Mean	**948 ± 8**	*900 ± 6*	917 ± 12	*890 ± 8*	899 ± 15	*866 ± 9*
Altitude (m agl)						
Min	18 ± 4	*17 ± 3*	162 ± 38	*173 ± 24*	327 ± 65	*375 ± 44*
Max	510 ± 77	***797 ± 76***	1106 ± 151	*1154 ± 83*	1502 ± 160	*1620 ± 105*
Mean	215 ± 49	*362 ± 51*	529 ± 97	*605 ± 66*	779 ± 127	*907 ± 81*
Relative humidity (%)						
Min	64.0 ± 1.9	*61.2 ± 2.0*	58.2 ± 3.5	*58.1 ± 2.2*	54.5 ± 3.6	*56.0 ± 2.1*
Max	94.8 ± 0.8	*95.3 ± 0.7*	94.7 ± 0.9	*94.5 ± 1.1*	94.3 ± 1.5	*94.7 ± 0.9*
Mean	80.0 ± 1.2	*80.7 ± 1.1*	77.0 ± 1.9	*77.6 ± 1.5*	71.0 ± 2.7	*75.6 ± 1.6*
Sum of Rainfall (mm)						
	14.5 ± 3.0	*15.0 ± 1.6*	14.3 ± 3.2	*14.1 ± 1.6*	12.6 ± 2.5	*14.5 ± 1.6*
Distance traveled (km)						
	1145 ± 89	*957 ± 78*	1405 ± 112	*1252 ± 100*	1760 ± 125	*1566 ± 118*

DISCUSSION

Dissemination of micro-organisms into and via the atmosphere has been studied for decades (Burrows *et al.*, 2009a; 2009b; Gregory, 1961; Lighthart, 1997) and in particular the long range spore dispersal of several plant pathogenic fungi (Aylor, 2003; Aylor *et al.*, 2011; 1982; Davis, 1987; Isard *et al.*, 2005; Pan *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). However, for plant pathogenic bacteria, dissemination via the circulation of air masses still remains relatively unexplored. Through computations with the HYSPLIT model and sampling of rain and snowfall, this study is the first to highlight some conditions that are favorable to the wet deposition of *P. syringae*.

P. syringae is a particularly interesting model because its presence in cloud water (Amato *et al.*, 2007a; Sands *et al.*, 1982) and in dry aerosols (Lighthart *et al.*, 1993) has been demonstrated. Moreover its ice nucleation activity has led to suggestions that the bacterium might incite the precipitation that would lead to its deposition (Möhler *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008). Measurements of flux of *P. syringae* from plant canopies into the atmosphere (Lindemann *et al.*, 1982) illustrate the importance of conditions fostering high sensible heat flux for this bacterium's initial ascent into the atmosphere. However, there is little information on the specific environmental conditions that favor its deposition. The small cell size (0.5 and 2.5 µm long (Monier and Lindow, 2003b)), indicative of small aerodynamic diameter, suggests that the residence time in the air could be on the order of 2 to 8 days according to the model of Burrows *et al.* (2009a) and that scavenging of cells by falling rain drops would be an ineffective method of deposition for most of the particles in dry aerosols. Indeed, Gregory (1961) showed that rain drops smaller than 0.5 cm did not scrub spores from the atmosphere when spores were smaller than 4 µm. Precipitation scavenging within the clouds, and especially for cells in cloud droplets or in ice crystals, would be the most effective means for deposition of particles the size of *P. syringae* back to the Earth's surface once emitted and transported to cloud height (Bauer *et al.*, 2003; Rodhe and Grandell, 1972). This reasoning, coupled to previous observations of *P. syringae* in rain and snowfall (Constantinidou *et al.*, 1990; Morris *et al.*, 2008) led us to hypothesize that nearly all precipitation events in temperate climates would contain *P. syringae*. Here we have demonstrated that this does not seem to be the case and that the temperature and the

solar radiation conditions of the air mass along its trajectory were significantly greater for the air masses yielding precipitation that carried *P. syringae*.

Interestingly, these conditions are known to be favorable to bacterial emission into the planetary boundary layer of the atmosphere. Lighthart (1999) suggested that population dynamics of bacteria in the alfresco atmosphere depend on the diurnal and annual solar cycles. Solar radiation heats surfaces and creates thermal convective updrafts carrying away epiphytic and soil bacteria into the atmosphere (Lighthart, 1997; 1999; Lindemann *et al.*, 1982; Tong and Lighthart, 2000). In other words, bacterial loading of the atmosphere is higher when solar radiation and temperature increase within the day and between solstices. This process is essential for an organism that does not express inherent phenomena meant to release particles into the atmosphere, such as raised conidiophores or exploding sopre sacs. When air masses receive radiation conducive to upward flux, the presence of *P. syringae* in precipitation would then depend on the strength of the bacterial source and emission. These two factors probably had a particularly important influence on the concentration of *P. syringae* in precipitation, which was highly variable. It would also depend on bacterial survival in the face of intense UV radiation. Presence of *P. syringae* could also be influenced by the combined effect of cloud droplets that reflect light as suggested by Sattler *et al.* (2001) and the inherent resistance mechanisms of *P. syringae* to UV radiation (Sundin and Murillo, 1999). As solar radiation depends on the season, our results were compatible with the unsuccessful detection of *P. syringae* in cloud water during the winter season by Bauer *et al.* (2003), its detection in rain samples of Sands *et al.* (1982) and its detection in clouds in summer by Amato *et al.* (2007a). Moreover, although Herlihy *et al.* (1987) and Gregory (1961) have reported total bacterial counts substantially higher during the warmer months of the year, we did not observe such a trend. Our estimation of total culturable bacteria were at least 1000 smaller than population sizes reported in precipitation samples of the whole literature cited in this study. It is possible that season did not have an impact on the abundance of culturable bacteria, but on the community structure.

Another major contribution of this study is to have highlighted the influence of air mass origin and the pH and conductivity of precipitations on the deposition of *P.*

syringae. As mentioned above, processes of emission of *P. syringae* into the air and means for them to survive while air-borne, are important in aerial dissemination of this bacterium in addition to climate conditions favorable for ascension. Air masses that carried the bacterium the most frequently came from the Atlantic and the Iberian Peninsula whereas the occurrence of *B. cinerea* was not exclusive to one origin. Southerly winds are known to transport a large amount of solid particles, essentially calcite dusts coming from the Sahara (Delmas *et al.*, 1996; Loye-Pilot and Morelli, 1988). Interestingly, numerous studies have reported an association of bacteria with mineral particles and dusts in clouds, with aerosols and with precipitation and suggest that they play a protective role against UV damage (Casareto *et al.*, 1996; Griffin, 2007; Kellogg and Griffin, 2006; Lighthart, 1999; Sattler *et al.*, 2001; Shaffer and Lighthart, 1997). It is unlikely that *P. syringae* is on Saharan dust particles when they are emitted in the atmosphere. However, their survival and long distance dissemination might be enhanced by the presence of these particles in the atmosphere. The higher conductivities of precipitation carrying *P. syringae* give evidence of the higher mineral content, and such results could suggest that dust particles might be involved in, or are indicative of, presence of *P syringae* in precipitation. Moreover, air masses that carried the bacterium were less acid. Our observations were also in agreement with the results of Christner *et al.* (2008) for which the highest pH values of rain and snow was correlated to the highest biological ice nuclei concentrations. Amato *et al.* (2007b) found a positive correlation between pH of clouds at the Puy de Dôme site in France and microbial counts. This study also revealed an important role of region 1 (Atlantic) as a source of total bacteria.

In addition to demonstrating the potential occurrence of *B. cinerea* in rain and snow, our study has shown that conditions favorable to the occurrence of this fungus were not the same as those for *P. syringae*. By comparing conditions favorable to the presence of *P. syringae* in precipitation to those favoring *B. cinerea* we have highlighted the conditions that might be specifically important for *P. syringae* and perhaps for other biological particles with the same physical properties. The conidia of *B. cinerea* measure about 10 µm x 8.5 µm (Pezet and Pont, 1990) and according to theory, their deposition should occur essentially by dry sedimentation and impaction with the ground or vegetation, but they can also be scrubbed from the atmosphere by precipitation

(Gregory, 1961). Washout of dry aerosol particles below clouds is believed to be more effective for fungal spores than for bacterial cells due principally to the importance of particle size in the efficiency of this process. Collection efficiencies of spores showed that between 50-70% of 10 µm diameter spores could be scrubbed from the atmosphere with rain drops of sizes > 0.5 cm (Gregory, 1961), whereas only 0 to 15 % of 4 µm diameter spores were scavenged. The differences in washout efficiency suggest an explanation for the differences in occurrence of the two pathogens in rainfall. As a common component of microbial aerosols, the conidia of *B. cinerea* could be rather effectively scrubbed out of the atmosphere by precipitation whereas *P. syringae*, once lofted into the air, would need to attain cloud height and be incorporated into cloud droplets to assure the most efficient deposition. This raises the question of how other bacteria are deposited with precipitation. Indeed, large numbers of bacteria were detected in nearly all samples analyzed. We suggest that these bacteria are part of the microbial populations associated with cloud water (Amato *et al.*, 2007a) and are also passengers on larger aggregate particles in the dry aerosols.

From an epidemiological perspective, this study permitted us to evaluate the potential impact of a precipitation event as a source of bacterial inoculum for disease. According to Oki and Kanae (2006), hydrological fluxes of snowfalls and rainfalls represent, respectively about 12.5 and 98.5 thousand km^3 of water per year. Taking into account the frequency of precipitation carrying *P. syringae* and the mean concentration found in this study, we can estimated that each year 3×10^{20} cells are deposited by rain and 7×10^{19} cells by snow across the world. Furthermore, if we consider the case where (i) a single rain event of 20 mm would bring 10^7 cells of *P. syringae* / ha of field (ii) leaf area index of a given crop = 1 and (iii) assuming that every cell fell on a leaf, these precipitations would bring only 1 bacterial cell / 100 cm^2 of leaf (i.e., 1 cell for about 5-10 cantaloupe leaves). Compared to the populations brought by irrigation water, this is much less important. Indeed, according to Riffaud and Morris (2002), retention basins can contain 100 CFU L^{-1} of *P. syringae* pv. *aptata*, and the amount transferred to cantaloupe leaves (1.36×10^6 – 4.06×10^6 per ha) for an irrigation event (2×10^5 L ha^{-1}), would represent between 5 and 15 cells for one leaf. However, snowpack is a major source of irrigation water (Edwards *et al.*, 2007). Monteil *et al.* (submitted-b) showed that the bulk of the *P. syringae* population in snowpack comes from the leaf litter due to

capillary transfer. According to those data, snowfalls should be a minor contributor (less than 1 cell per 10^3 or $/10^4$) to the total population stored in snowpack. It seems that the real important epidemiological effect of precipitations is long distance dissemination and mixing. An important perspective would be to explore the incoming diversity relative to the endogenous diversity. Furthermore, this work highlights the importance of accumulation of *P. syringae* in fresh water that eventually is used for irrigation (rain run-off into retention basins for example).

Such approach could be useful for other plant pathogenic bacteria already found in clouds and aerosols or shown to be ice nucleation active like species belonging to *Pseudomonas viridiflava*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans*, *Pectobacterium carotovorum* (Möhler *et al.*, 2008). Moreover, if plant pathogenic bacteria such as *P. syringae* are most frequently disseminated by rain and at warm temperatures, we could wonder how climate change may affect the dissemination of plant pathogens. A temperature rise might be deleterious for the growth of *P. syringae* which prefers fresh temperatures. But on the contrary, this could increase bacterial flux in the atmosphere given the fact that sensitive heat flux depends on incoming radiation. Morevover, global warming changes hydrological cycles and according to Trenberth (1998), atmospheric moisture should increase and lead to a greater precipitation efficiency. This suggests that bacterial contact with cloud droplets could increase thereby leading to their deposition back to the Earth.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Daniel Granier and his team from the Super Sauze ski resort, for their help with collection of samples. We are grateful to Odile Berge (INRA, Avignon) for rich discussions and we are especially appreciative for the help of Ghislain Géniaux and Michel Mourly (INRA, Avignon) with spatial analysis of the trajectories.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table II-4. Origin of precipitations and their population sizes of total culturable bacteria, *P. syringae* and *B.cinerea.*

When the variable was not measured, it is notified by NA for "Non analyzed" and when the value was under the detection limit threshold, it is notified by nd.

					Population size (CFU / L of rain or snowmelt)		
Site	Date	Substrate	pH	Conductivity (µS cm^{-1})	Total bacteria	*P. syringae*	*B. cinerea*
Hautes Alpes County, Ceillac							
	12/11/2008	snow	NA	NA	1.67×10^5	nd	NA
	12/18/2008	snow	6.04	8	6.67×10^4	nd	NA
	01/07/2009	snow	6.35	10	6.67×10^4	nd	NA
	01/20/2009	snow	5.82	6	5.22×10^3	nd	NA
	01/24/2009	snow	NA	NA	8.06×10^3	nd	NA
	02/06/2009	snow	NA	NA	2.28×10^3	nd	NA
	11/08/2009	snow	5.15	8	189	nd	NA
Bouches-du-Rhône County, Châteaurenard,							
	12/01/2005	rain	NA	NA	NA	nd	300
	12/08/2005	rain	NA	NA	NA	nd	nd
Alpes de Haute Provence County, Col de Vars							
	11/04/2009	snow	7.85	0	9.89×10^8	4.90×10^4	NA
	11/08/2009	snow	5.06	4	5.17×10^3	nd	NA
	12/01/2009	snow	6.63	2	1.56×10^6	nd	NA
	12/18/2009	snow	5.25	2	211	nd	NA
Hautes Alpes County, Col du Lautaret							
	11/02/2009	snow	6.58	0	3.33×10^8	nd	NA
	11/03/2009	snow	6.60	14	8.33×10^3	80	NA
	11/08/2009	snow	5.24	2	1.94×10^3	nd	NA
	05/05/2010	snow	5.64	1	833	nd	2
	06/16/2010	rain	6.34	4	8.50×10^3	331	10
Pyrénnées Orientales County, Font Romeu, Aveillans							
	02/21/2006	snow	NA	NA	NA	nd	nd

Pyrénnées Orientales County, Font Romeu, Roc de la Calme						
02/19/2006	snow	NA	NA	NA	nd	50
Haute Savoie County, La Clusaz						
02/16/2006	snow	NA	NA	NA	1.30×10^5	nd
Alpes de Haute Provence County, Savines le Lac						
04/16/2009	rain	5.83	10	2.78×10^5	1.69×10^4	NA
Haute Savoie County, Les Carroz d'Araches						
03/01/2006	snow	NA	NA	NA	nd	1.00×10^3
03/02/2006	snow	NA	NA	NA	nd	nd
Vaucluse County, Montfavet						
01/07/2009	snow	6.56	18	6.67×10^4	nd	NA
04/01/2009	rain	6.2	32	3.39×10^4	265	NA
04/16/2009	rain	4.14	24	1.94×10^4	155	NA
09/16/2009	rain	8.08	5	2.78×10^3	150	NA
05/12/2010	rain	4.1	47	2.17×10^3	nd	15
06/15/2010	rain	6.71	18	2.22×10^5	2.51×10^3	43
11/15/2010	rain	4.83	31	7.56×10^3	55	13
Savoie County, Saint-François Longchamp						
03/10/2006	snow	NA	NA	NA	nd	NA
Vaucluse County, St. Saturnin-les-Avignon						
01/26/2006	snow	NA	NA	NA	nd	nd
05/08/2006	rain	NA	NA	NA	1.00×10^4	NA
06/17/2006	rain	NA	NA	4.15×10^8	nd	nd
07/06/2006	rain	NA	NA	NA	nd	NA
07/15/2006	rain	NA	NA	nd (<10000/L)	nd	NA
11/29/2006	rain	NA	NA	2.20×10^8	100	NA
01/23/2009	rain	NA	NA	3.67×10^5	1.13×10^3	NA
01/26/2009	rain	5.83	12	1.68×10^6	7.13×10^3	NA
01/08/2010	snow	6.31	2	5.22×10^6	nd	NA
01/09/2010	snow	5.05	4	1.06×10^6	nd	NA
02/05/2010	rain	7.00	8	1.56×10^5	90	NA
03/07/2010	rain	4.88	7	4.11×10^5	nd	5
05/04/2010	rain	6.26	8	2.99×10^6	2.82×10^3	17
09/07/2010	rain	6.82	18	5.89×10^5	346	nd
09/17/2010	rain	6.05	7	1.16×10^4	62.5	NA
10/31/2010	rain	5.16	0	2.94×10^3	nd	7
Alpes de Haute Provence County, Super Sauze						
12/06/2008	snow	6.19	11	1.72×10^7	nd	NA
12/11/2008	snow	5.4	9	6.67×10^4	nd	NA
12/12/2008	snow	5.02	9	nd	nd	NA
12/14/2008	snow	5.96	12	4.00×10^5	nd	NA
12/15/2008	snow	6.06	8	1.33×10^5	nd	NA
12/17/2008	snow	5.62	18	2.22×10^4	nd	NA
12/30/2008	snow	NA	NA	3.33×10^3	nd	NA
12/31/2008	snow	NA	NA	6.02×10^3	nd	NA
01/01/2009	snow	NA	NA	3.77×10^3	nd	NA
01/07/2009	snow	NA	NA	6.22×10^3	nd	NA
01/19/2009	snow	5.78	9	1.83×10^3	5.60×10^3	NA
01/20/2009	snow	6.18	14	3.72×10^5	1.66×10^4	NA

01/24/2009	snow	5.91	10	5.00×10^3	nd	NA
02/02/2009	snow	NA	NA	2.06×10^4	nd	NA
02/05/2009	snow	5.17	15	6.72×10^3	6.30×10^3	NA
02/06/2009	snow	5.82	5	1.27×10^4	nd	NA
03/01/2009	snow	NA	NA	444	nd	NA
03/04/2009	snow	NA	NA	3.56×10^5	nd	NA
03/06/2009	snow	5.61	7	nd	nd	NA
03/28/2009	snow	5.65	13	167	nd	NA
03/29/2009	snow	6.06	22	278	nd	NA
04/02/2009	snow	5.53	6	nd	nd	NA
11/08/2009	snow	5.07	8	nd	nd	NA
12/01/2009	snow	6.26	0	2.22×10^4	nd	NA
12/23/2009	snow	6.52	6	1.01×10^6	nd	NA
01/02/2010	snow	5.15	4	8.67×10^6	nd	NA
01/06/2010	snow	5.41	4	4.33×10^5	nd	NA
01/08/2010	snow	6.61	9	3.89×10^5	nd	NA
01/13/2010	snow	5.66	6	6.67×10^4	nd	NA
01/15/2010	snow	5.89	7	1.00×10^6	nd	NA
01/30/2010	snow	5.84	8	4.00×10^7	nd	10
02/12/2010	snow	5.85	19	5.67×10^4	nd	6
02/19/2010	snow	NA	NA	nd	nd	nd
02/24/2010	snow	NA	NA	1.30×10^4	nd	6
03/02/2010	snow	6.25	9	2.94×10^4	nd	NA
03/04/2010	snow	5.98	4	903	nd	13
03/28/2010	snow	6.24	9	722	nd	nd
04/14/2010	snow	5.87	7	1.00×10^3	nd	nd
Isère County, Villard de Lans						
12/29/2005	snow	NA	NA	NA	4.00×10^3	nd
02/17/2006	snow	NA	NA	NA	150	50

Table II-5. Significance of mean comparisons for each physical parameter between air masses carrying *P. syringae* and the ones carrying *B. cinerea* considering the subsample

As in Table 4, the minimum, maximum, and mean of temperature experiencing by air masses were calculated for durations of 120 h and 48h. Means of each variable were compared between air masses having produced precipitations in which the targeted organism was detected versus the ones in which it was not detected. Means were associated to their standard errors. Values were significantly different when they were associated with a "s" and colored in light grey (ANOVA, $p < 0.1$) or in dark grey (ANOVA, $p < 0.05$). Values were not significantly different when they were associated with a "ns".

P. syringae		120h backward trajectories			48h backward trajectories		
Physical parameters		50m	500m	1000m	50m	500m	1000m
Sun flux	Sum	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temperature	Min	s	s	ns	s	s	s
	Max	s	s	s	s	s	s
	Mean	s	s	ns	s	s	s
Pressure	Min	ns	ns	ns	s	s	s
	Max	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	s	ns	ns
Altitude	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	ns	s	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	s	ns
Relative humidity	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Rainfall	Sum	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Distance traveled		ns	ns	ns	ns	ns	ns

B. cinerea		120h backward trajectories			48h backward trajectories		
Physical parameters		50m	500m	1000m	50m	500m	1000m
Sun flux	Sum	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Temperature	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pressure	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Altitude	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Relative humidity	Min	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Max	ns	ns	ns	s	ns	ns
	Mean	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Rainfall	Sum	ns	ns	ns	s	ns	ns
Distance traveled		ns	ns	ns	ns	ns	ns

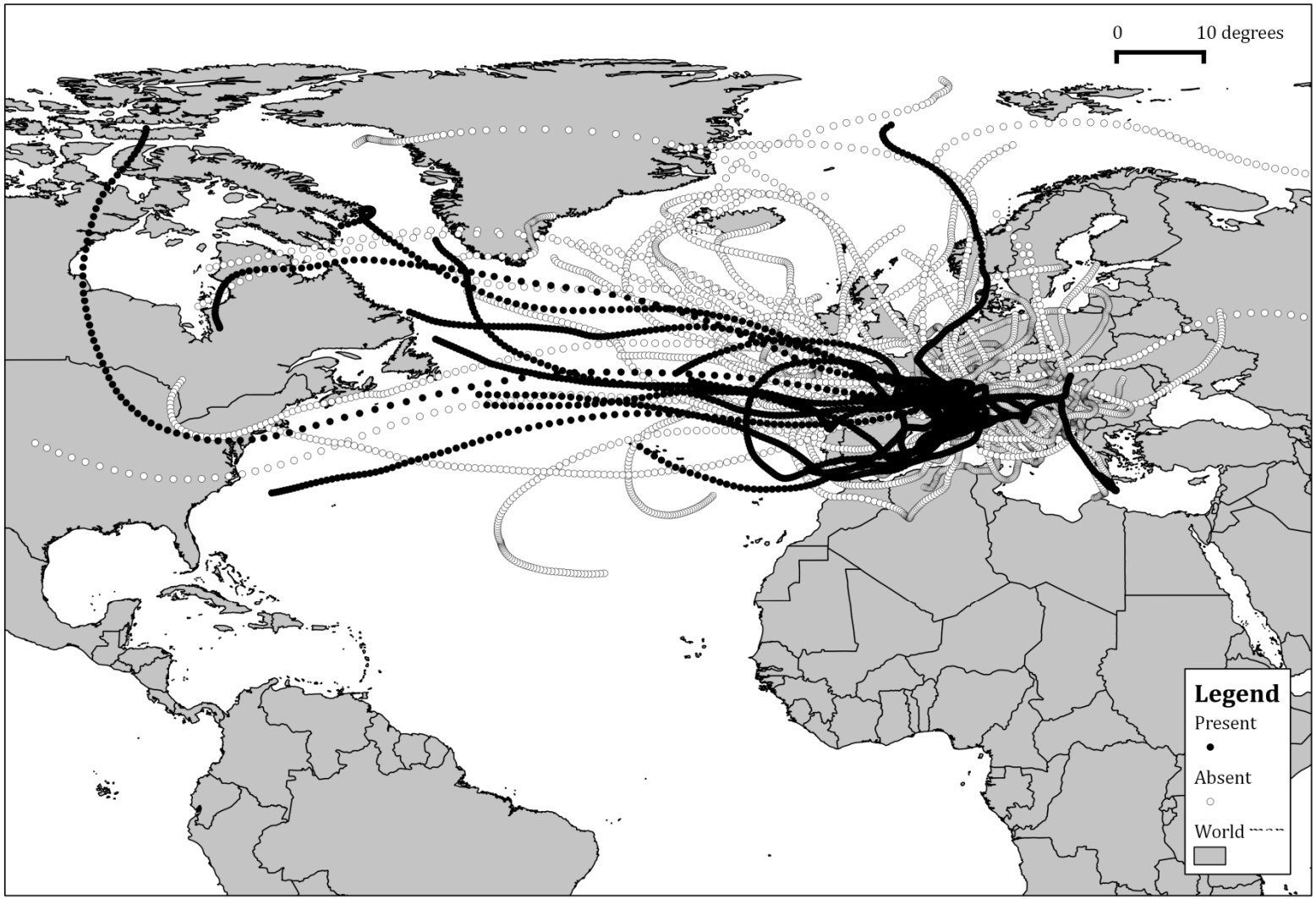


Figure II-4. Backward trajectories of air masses associated the occurrence of *P. syringae*

Backward trajectories are plotted for the 120h preceding the sampling for the 500 m a.g.l. elevation. Each circle corresponds to a spatial coordinate for each hour.

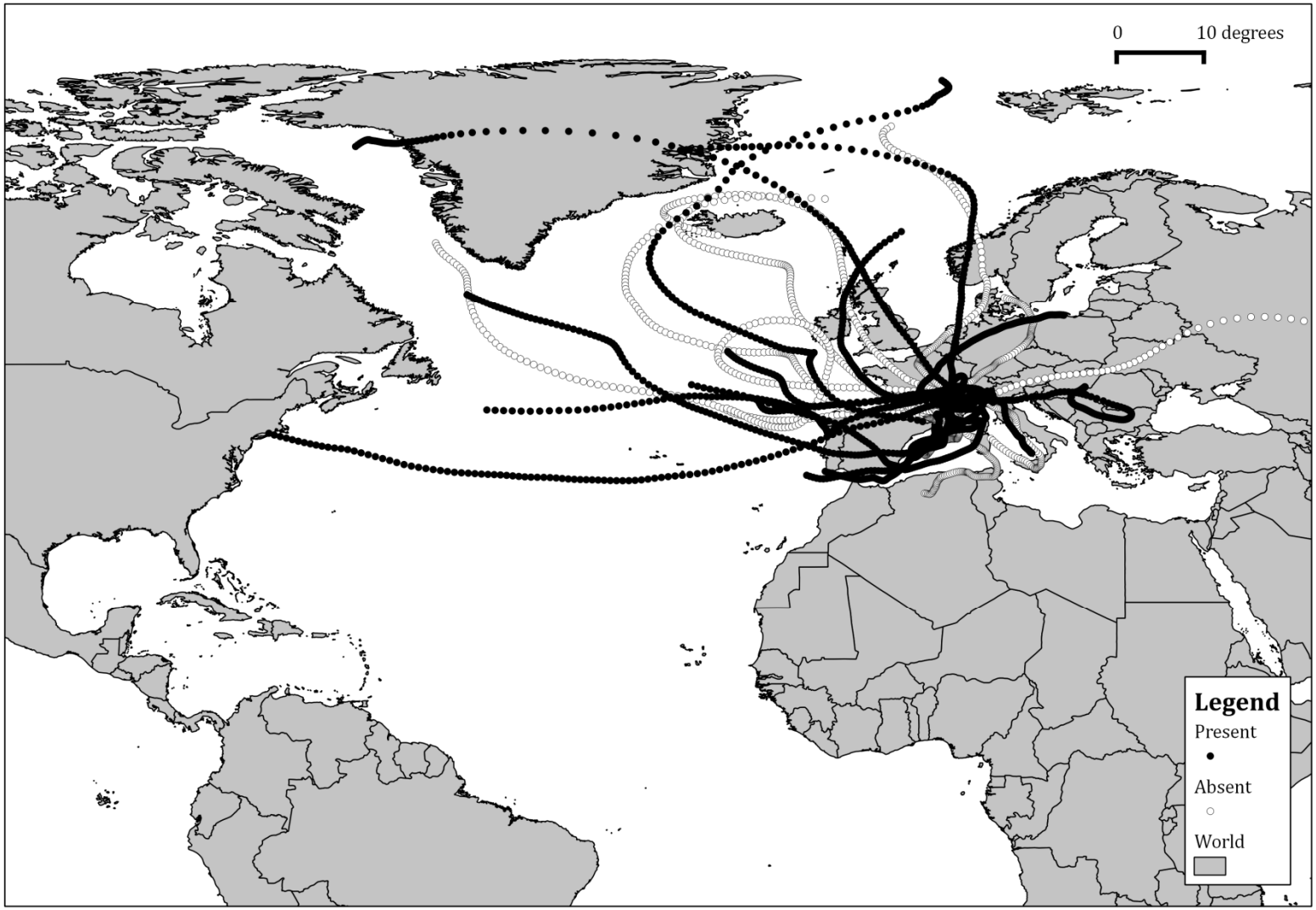


Figure II-5. Backward trajectories of air masses associated the occurrence of *B. cinerea*

Backward trajectories are plotted for the 120h preceding the sampling for the 500 m a.g.l. elevation. Each circle corresponds to a spatial coordinate for each hour.

II.3. Complementary results on phenotypic diversity

HYPOTHESIS, MATERIALS & METHODS

In addition to estimating *P. syringae* transport through snowfalls and rainfalls, we wanted to know if the type of precipitation may deposit specific strains in terms of phenotypes and genotypes. This could permit us to assess the selective pressures exerted by the deposition process. We tested the hypothesis that populations of *P. syringae* in snow and rain have the same phenotypic structure. At the present time we have only characterized the capacity to induce hypersensitive reaction on tobacco of 460 strains isolated in this study. Phenotypic characterization was performed as described previously (Morris *et al.*, 2010). Induction of a hypersensitive reaction (HR) was tested by injecting 50 µL of a suspension of 10^8 cells ml^{-1} into the lamina of leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) at the 10-leaf stage and noting the development of necrosis at 24h after inoculation. Only samples for which enough strains were put in collection were used for statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Frequency of strains inducing a hypersensitive reaction on tobacco was determined for 7 snowfalls and 11 rainfalls (Table II-6). Frequency of strains inducing an hypersensitive reaction on tobacco (HR^+) strains in snow was significantly greater than in rain (94.9 % ± SE of 3.8 vs. 75.1 % ± SE of 8.9) according to the Mann Whitney U test ($p = 0.049$). For the moment, we are just able to conclude that snow has a higher potential to deposit pathogenic strains.

This analysis will be complemented in the future by, characterization of the strains in our collection in terms of ice nucleation activity (INA) and genotyping.

Table II-6. Frequency of strains from snow and rain inducing a hypersensitive reaction on tobacco

Site characteristics are given in Table II-1. Values associated with the same letter are not significantly different according the Fisher exact test ($p<0.05$).

Precipitation	Site	Date	% of strains HR^+
Snow			
	Col de Vars	11/04/2009	93.3 [a]
	Col du Lautaret	11/03/2009	70.8 [a]
	Super Sauze	01/19/2009	100.0 [a]
		01/20/2009	100.0 [a]
		02/05/2009	100.0 [a]
	Villars de Lans	12/29/2005	100.0 [ac]
	La Clusaz	02/16/2006	100.0 [ac]
Rain			
	Col du Lautaret	06/16/2010	100.0 [a]
	Montfavet	04/01/2009	86.7 [a]
		04/16/2009	100.0 [a]
		06/15/2010	96.7 [a]
		11/15/2010	72.7 [cd]
	Savine le Lac	04/16/2009	36.7 [e]
	St Saturnin-les-Avignon	01/23/2009	90.0 [a]
		01/26/2009	96.7 [a]
		02/05/2010	70.6 [d]
		05/04/2010	76.7 [bc]
		09/07/2010	0.0 [f]

II.4. Synthèse

Ces travaux ont été focalisés sur le transport et la déposition de *P. syringae* dans le bassin versant par les précipitations de neige et de pluie. Contrairement à ce que nous attendions, *P. syringae* n'est pas présente dans toutes les précipitations. Nous avons pu mettre en évidence un ensemble de facteurs physiques, chimiques et climatiques ayant un lien avec la présence ou l'absence de *P. syringae* dans les précipitations.

Ainsi, les précipitations solides et liquides n'apportent pas *P. syringae* avec la même fréquence et les mêmes abondances. La présence de *P. syringae* est 3 fois plus souvent associée à la pluie qu'à la neige, mais la taille des populations est 10 fois plus faible. Cette observation soulève de nouvelles questions quant aux rôles respectifs de la pluie et de la neige dans le flux global de *P. syringae* à travers l'atmosphère et dans la sélection de souches de génotypes ou phénotypes particuliers. Les premières analyses sur la diversité montrent que la fréquence de souches pathogènes est plus importante dans la neige que dans la pluie. Il sera intéressant d'étendre cette analyse à d'autres phénotypes pour voir si le transfert à travers l'atmosphère filtre certaines souches.

Nous avons également observé un lien entre certains paramètres chimiques de l'eau des précipitations et la présence de *P. syringae*. Les précipitations qui apportent la bactérie sont plus conductives et moins acides que celles qui ne l'apportent pas. D'autre part, le couplage des analyses microbiologiques aux computations effectuées avec le modèle météorologique HYSPLIT, ont mis en évidence que les moyennes de températures et d'exposition aux rayonnements incidents du soleil, le long des trajectoires des masses d'air, sont 30 à 40% plus importants quand *P. syringae* est présente dans la précipitation. Nous avons donc validé l'hypothèse selon laquelle les conditions propices au transport de *P. syringae* dans l'atmosphère sont celles compatibles avec son émission dans l'atmosphère.

Le modèle HYSPLIT nous a également permis d'associer une origine aux masses d'air associées à chaque précipitation. Si nous n'avons pas trouvé d'origine où la bactérie était systématiquement présente, nous avons pu en identifier une origine (Nord et Est) qui était significativement moins associée à la présence de la bactérie. Grâce à l'étude

comparative avec *B. cinerea,* nous avons infirmé notre hypothèse et montré que les conditions propices à la présence de *P. syringae* dans les précipitations n'étaient pas les mêmes que celles pour un champignon dispersé par le vent. Ce champignon était aussi bien apporté par les masses d'air venant du sud, de l'ouest ou du nord, et n'était pas sensible aux différences de températures comme l'était *P. syringae*.

Dans l'objectif global de la thèse, ces recherches ont permis :

- d'estimer la fréquence d'arrivée de *P. syringae* dans le bassin versant en fonction du type de précipitation, des trajectoires des masses d'air et de facteurs climatiques
- d'estimer les flux de *P. syringae* par les précipitations

III. Caractérisation de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les eaux de surface durant la fonte des neiges et en fonction de facteurs physico-chimiques

III.1. Introduction

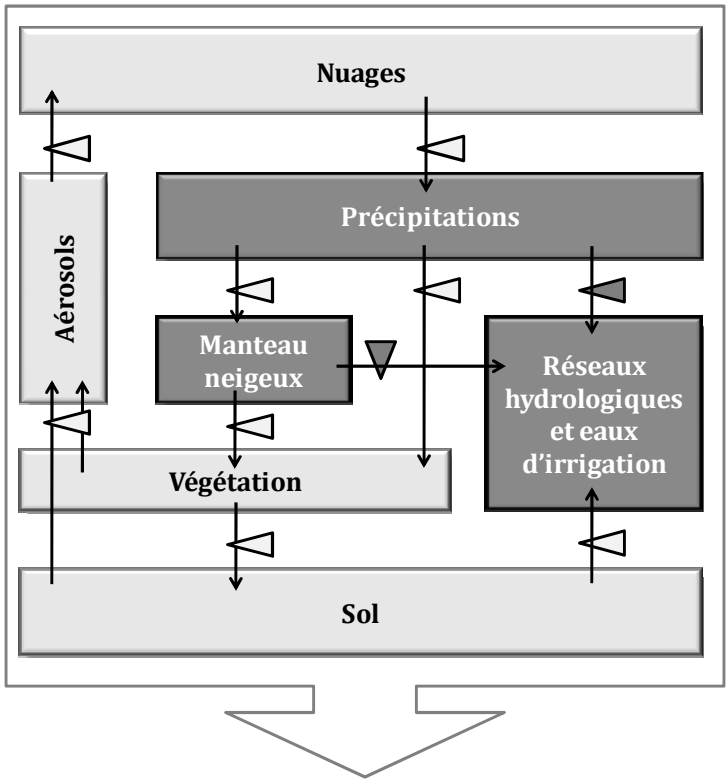
Dans le chapitre I, nous avions décrit la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux à travers l'estimation des flux associés aux précipitations et ceux associés à la litière. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la prochaine étape de transfert dans le cycle de l'eau : le devenir de ces populations dans l'eau issue de sa fonte vers les cours d'eau en milieu alpin. Les réseaux hydrologiques alpins sont particulièrement importants à considérer dans le cycle de vie de *P. syringae* car la fonte des neiges constitue la source majeure en eau des rivières dans les moyennes et hautes latitudes (Edwards *et al.*, 2007). Dans leurs travaux, Morris *et al.* (2010; 2008) avaient systématiquement détecté l'espèce bactérienne dans les eaux de source, non seulement en Europe mais également sur d'autres continents. Ils avaient également mis en évidence un effet de la chimie de l'eau sur l'abondance des souces agressives sur melon. D'autres expériences préliminaires menées par C. Ème (M2 Hydrogéologie, Université d'Avignon, 2006) suggéraient que de fortes conductivités électriques pouvaient être associées à de faibles tailles des populations de *P. syringae,* et que le contexte hydrogéologique pouvait avoir un impact sur la dynamique des populations bactériennes dans les ruisseaux.

Nous avons donc eu pour objectif (i) d'évaluer la dynamique spatio-temporelle des populations de *P. syringae* dans les sources d'eau à l'échelle d'un bassin versant, et (ii) de mettre en évidence des filtres physico-chimiques qui pourraient avoir un impact sur la structure génotypique et phénotypique des populations de *P. syringae*. Durant les mêmes campagnes d'échantillonnage du manteau neigeux en 2009 et 2010 dans 4 bassins versants des Alpes du Sud (appartenant au bassin versant de la Durance), nous avons collecté l'eau des ruisseaux associés à chacun des manteaux neigeux précédemment abordés. Grâce à leur analyse microbiologique et chimique, nous avons testés les hypothèses suivantes :

- Les tailles des populations sont différentes en fonction de la chimie de l'eau

- La taille et la structure des populations dans l'eau de source sont identiques de ces propriétés dans le manteau neigeux du même site

Ces travaux feront l'objet d'un manuscrit qui sera soumis dans un journal d'écologie microbienne (*FEMS Microbiology* par exemple). Au jour de l'écriture du manuscrit présenté ci-dessous, toutes les analyses n'ont pas été faites et par conséquent, les résultats développés ne sont pas complets. L'analyse de la structure des populations n'a pas encore été terminée, mais les premières données sont tout de même présentées. Dans leur ensemble, ces travaux abordent les compartiments colorés en gris foncé dans le diagramme ci-dessous.



Prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations d'un bassin versant

RÉSUMÉ

La bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* est omniprésente dans de nombreuses rivières dans le monde entier et ses populations présentent une grande diversité phénotypique et génotypique. Dans les zones tempérées, les cours d'eau sont essentiellement alimentés par la fonte du manteau neigeux dans lequel

d'importants réservoirs hivernaux de *P. syringae* ont été mis en évidence. Chaque cours d'eau a une chimie de l'eau spécifique témoignant de la dynamique de l'eau, de la géologie et du climat. Cela a soulevé de nouvelles questions sur la manière dont la fonte des neiges structure les populations de cette bactérie et comment elle réagit aux variations de la chimie de l'eau. Nous avons évalué la dynamique des populations de *P. syringae* et des bactéries totales cultivables au fil du temps dans les ruisseaux de plusieurs bassins versants des Alpes du Sud françaises. Nous avons démontré la stabilité des concentrations bactériennes dans le temps, ce qui suggère un transport à travers le sol à travers l'infiltration de l'eau de fonte des neiges plutôt qu'un ruissellement de surface de la bactérie dans les ruisseaux. Les comparaisons des populations dans le manteau neigeux et des cours d'eau adjacents ont montré une réduction des concentrations bactériennes. La corrélation entre *P. syringae* et le dénombrement total des bactéries suggérait que les deux étaient soumis aux mêmes pressions environnementales. L'analyse de la chimie des eaux ont montré des différences entre les sites comme la taille des populations microbiennes. Parmi toutes les variables testées, la conductance, la concentration relative des sulfates ioniques, bicarbonates et magnésium étaient liés aux concentrations bactériennes. Ces premiers résultats ont donné une estimation des flux de bactéries dans le bassin versant de la Haute Durance et ont révélé le potentiel d'utilisation de la chimie de l'eau comme des indicateurs prédictifs de la dynamique de la population *P. syringae* dans les cours d'eau.

III.2. Manuscrit en préparation

Water chemistry as a tool for predicting concentrations of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in river headwaters

Caroline L. MONTEIL[1], François LAFOLIE[2], Roland SIMLER[2], Catherine GLAUX[1], Yves TRAVI[2] and Cindy E. MORRIS[1*]

[1] INRA, UR407 de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, BP. 94, 84140 Montfavet cedex, France.

[2] INRA, UMR 1114 EMMAH, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France.

Subject category : Environmental Microbiology

Key words: hydroecology, microbial ecology, alpine watershed, population dynamics, water cycle, epidemiology.

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 32 72 28 41; fax: +33 (0)4 32 72 28 42; E-mail: Cindy.Morris@avignon.inra.fr

ABSTRACT

The plant pathogenic bacterium *P. syringae* is omnipresent in many worldwide headwaters exhibiting high phenotypic and genotypic diversity. In temperate zones, headwaters are essentially fed by the melting of snowpack in which high winter reservoirs of *P. syringae* have been observed. Each stream has a specific water chemistry testifying to water dynamics, geology and climate. This has raised novel questions of how snowmelt impacts population structure of this bacterium during spring melts and how it responds to variations of water chemistry. Here we assess the population dynamics of *P. syringae* and total culturable bacteria over time in streams of several watersheds in the Southern French Alps. We demonstrate the stability of bacterial concentrations over time, which suggests transport through the soil via the infiltration of melting snow rather than direct surface runn-off of the bacterium into

streams. Comparisons of populations in snow cover and adjacent streams showed a reduction of bacterial concentrations. Correlation between *P. syringae* and total bacterial counts showed that both were submitted to the same environmental pressures. Analysis of water chemistry showed differences between sites that corresponded to differences in microbial population sizes. Among all variables tested, conductivity and relative ionic concentrations of sulfates, bicarbonates and magnesium were linked to bacterial concentrations. These results lead us to estimate bacterial fluxes in the Upper Durance River basin and reveal the potential of using water chemistry as a predictive indicators of *P. syringae* population dynamics in streams.

INTRODUCTION

Forcasting disease epidemics and elucidating factors implicated in the emergence of plant pathogens is still a major challenge for plant disease control. To foster new perspectives on the complex factors involved in disease emergence and epidemiology, research is being oriented toward a better understanding of the dynamics of metapopulations of plant pathogens by extending the life history frameworks beyond agricultural boundaries (Morris *et al.*, 2009). These life history frameworks incorporate knowledge on how the dynamics of crop-associated populations depend not only on local environmental factors but also on exchanges between agricultural and non agricultural reservoirs and long distance dispersal. This approach is being developed in particular for the bacterium *Pseudomonas syringae* (Morris *et al.*, 2008). *P. syringae* has been detected in a large range of substrates associated with the water cycle such as, snow, clouds, rivers, wild plants or aerosols (Amato *et al.*, 2007a; Lindemann *et al.*, 1982; Mohr *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008; Sands *et al.*, 1982). Furthermore, it is ice nucleation active (Lindow, 1983; Möhler *et al.*, 2008). The whole of these observations have pointed to the close association of its life history to the water cycle. More recently, several studies have assessed the population dynamics of *P. syringae* in headwaters (Morris *et al.*, 2010), in alpine meadows and the associated snowpack (Monteil *et al.*, submitted-b). Overall, these studies have shown the mixing of populations within alpine watersheds and between the various habitats of *P. syringae*. Moreover they demonstrate the high phenotypic and genotypic diversity in snowpack, leaf litter and streams, in addition to their high potential as reservoirs of pathogenic strains. It was estimated that leaf litter and snowpack harbor about 10^8 cells of *P. syringae* per m^2 of alpine meadow

and those in freshwater worldwide would represent 10^{20} cells, a population size comparable to that estimated to be harbored by plants. These observations raises novel questions about the way water dynamics in alpine watersheds structure *P. syringae* populations in streams which in turn are sources of irrigation water.

In Europe, river runoff which is fed by alpine streams drains a total land area of 1.1 million km^2 and discharges 4.37×10^{15} liters of water annually (see review by Edwards *et al.* (2007)). The major contributor is snowmelt, but alpine streams are also influenced by the groundwater system and glacial melt to a lesser extent (Brittain and Milner, 2001; Hannah *et al.*, 2007; Ward, 1994; Ward *et al.*, 1999). During rainfalls or the snowmelt period, different processes generate runoff at different locations along the alpine watershed. This depends on hydraulic and moisture properties of the soil (Sophocleous, 2002). Directly or indirectly, water dynamics between these three hydrological reservoirs (glaciers, snowmelt and groundwater) are controlled by climate, precipitation intensity and frequency, geology, topography, vegetation and the mass balance of frozen water (Brown *et al.*, 2003). These interactions produce headwaters with a distinct flow regime, hydrochemistry, temperature, concentration of suspended sediment and channel stability (Brown *et al.*, 2003; Fenn, 1987; Sophocleous, 2002). In the past ten years, a novel interdisciplinary discipline called hydroecology tried to predict response of freshwater biota and ecosystems to variation of these abiotic factors over a range of spatial and temporal scales (see review by Hannah *et al.* (2004)). This approach links hydrology, hydraulic and geomorphological sciences with ecology and biology. It has been applied specifically for benthic macroinvertebrate communities, fish populations, and algal communities in alpine streams (Brown *et al.*, 2003; Hannah *et al.*, 2007; Hieber *et al.*, 2001; Milner *et al.*, 2009). However few studies in alpine streams have addressed the response of microbial communities to environmental changes. The few examples include the work of Battin *et al.* (2004) who assessed how hydrology controls stream microbial biofilms. Fierer *et al.* (2007) determined how biogeochemical factors impacted the bacterial biogeography in streams. But overall, studies on freshwater biota in alpine watershed have focused on describing community structure and functions in alpine lakes (Alfreider *et al.*, 1996; Felip *et al.*, 1999; Felip *et al.*, 1995; Hortnagl *et al.*, 2010; Newton *et al.*, 2011; 2010; Schiaffino *et al.*). No study has addressed the population dynamics of a single species, particularly a plant pathogen, in

relation to the variation of physical and chemical properties of streams. However, for *P. syringae* we have made preliminary observations that electrical conductivity of headwaters seem to influence the phenotypic structure of its populations (Morris *et al.*, 2010).

In this context, our objectives were to evaluate the population dynamics of *P. syringae* in several headwaters of the Southern French Alps during snowmelt to (1) assess bacterial fluxes through streams in spring and summer, (2) identify key chemical and physical predictors of the *P. syringae* population sizes in headwaters and (3) compare bacterial concentrations in the adjacent snowpack associated with the surface waters. We quantified the plant pathogen population and total bacteria as a reference, and we analyzed environmental parameters including pH, dissolved organic carbon (DOC), electrical conductivity (EC), ionic composition and temperature that are typically used to define water dynamics in alpine watersheds.

MATERIALS & METHODS

Field sites and sampling

The field study was carried out between March 2009 and June 2010 in four catchment basins where land was mown but not cultivated (Table III-1 and Figure III-4 in supplementary information). They belong to the Upper Durance Basin (UDR) (3580 km2) located in the Southern French Alps, which supplies water for crop irrigation in Southeastern France. At the source and at 1 to 2 km downstream, the water of the four streams was sampled several times during the snowmelt period. Water was collected into sterile sampling bags and kept in a cooler, transported to the laboratory and processed on the following day. The stream temperature was measured at the time of sampling (Consort C561, UK, accuracy ± 0.01°C). Each creek was about 100 m from the sites where snowpack was sampled during the same season and years (Monteil *et al.*, submitted-b).

Table III-1. Catchment basins where streams and their associated snowpack were sampled

Catchment basins	Substrate	Altitude (m)[a]	Latitude	Longitude	Nb of samples[b]
Ceillac, *Pisse creek*	Snow	2200	44°38'05"N	06°47'22"E	5
	Water	1690	44°38'54"N	06°47'33"E	9
		2200*	44°38'10"N	06°47'19"E	9
Col de Vars, *Riou Mounal creek*	Snow	2100	44°32'14"N	06°42'06"E	4
	Water	1880	44°31'49"N	06°42'38"E	7
		2100*	44°32'11"N	06°42'11"E	11
Col du Lautaret, *Roche Noire creek*	Snow	2100	45°02'12"N	06°24'08"E	1
	Water	2000*	45°02'37"N	06°24'53"E	3
Super Sauze, *Soudane creek*	Snow	2000	44°20'40"N	06°41'57"E	5
	Water	1600	44°21'14"N	06°42'05"E	11
		2000*	44°20'38"N	06°42'00"E	8

[a] Sites associated with star correspond to the official river source

Quantification of bacterial concentrations

Concentrations of *P. syringae* and total culturable bacteria, and pH and EC in snow samples were determined in the melting snow of three snowpack layers as described in Monteil *et al*. (submitted-b). The same protocol was applied to water samples. Samples were concentrated by a factor of 200 by filtration across sterile nitrous cellulose filters (pore diameter 0.22 µm) before dilution plating. Aliquots of the samples as prepared above were dilution-plated on KBC medium (Mohan and Schaad, 1987), a semi-selective medium for *P. syringae* used in our previous studies (Morris *et al.*, 2008) and on 10% tryptic soy agar (TSA) to enumerate the total mesophilic bacterial flora, and plates were incubated for up to 5 days at 22-25°C. The detection thresholds were 5 colony-forming units (CFU) for *P. syringae* and 55 for total bacteria per liter of melted snow as were those for snowpack samples (Monteil *et al.*, submitted-b).

Strains of *P. syringae* were collected from each sample by purifying at least thirty colonies chosen at random from a single dilution. Strains were tested for production of fluorescent pigment on King's medium B (King *et al.*, 1954) and the absence of arginine dihydrolase and of cytochrome c oxidase as described previously (Morris *et al.*, 2008). For strains meeting the phenotypic criteria, between 20 and 40 strains per sample were stored in 0.1M phosphate buffer at 4°C and in nutrient broth with 40% glycerol at -80°C for further characterization.

Chemical analyses

Measurements of electrical conductivity and pH were performed directly on melted snow and the stream water with an electrochemical analyser (Consort C561, UK, reference temperature at 25°C). Electrical conductivity values had an accuracy of ± 1µS cm^{-1} and ± 0.01 pH unit. For chemical analyses, bicarbonate concentrations were also determined with the unprocessed sample by Gran titration (Gran, 1952). Furthermore, about 150 ml of filtrate from each water sample were stored in polyethylene bottles in the dark at 4 °C until chemical analyses could be accomplished for analysis of the major ions (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Cl^{-}, PO_4^{2-}, SO_4^{2-}, NO_3^{-}) and about 30 ml were stored in the same conditions in brown glass bottles, stabilized with mercuric chloride, pour DOC analysis. The concentrations of the dissolved anionic and cationic species were determined by ion chromatography (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA). The detection limits of the analyzed ions were 0.01 mg L^{-1}. Chemical features of water were determined through the construction of trilinear Piper diagrams (Piper, 1944) using the DIAGRAMMES software version 5.1 (developed by R.Simler, Avignon). For DOC analysis, we used a Bioritech TOC 700 analyzer (Bioritech, Guyancourt, France) that eliminates total dissolved mineral carbon by acid dissolution and then quantifies the CO_2 released during oxidation during heating. Accuracy of this measurement was 0.05 mg L^{-1}. Absence of chemical contamination was checked by processing distilled water with the same material.

Statistical analyses

Statistical analyses were achieved with the R software version 2.9.1 (The R Development Core Team, 2009). Means were then compared with ANOVA, the Student test, the Wilcoxon rank sum test and the Kruskal-Wallis rank sum test ($p < 0.05$). To compare bacterial concentrations between snow and water samples, arithmetic means were calculated for the whole snowpack. Means took in account the proportion of each layer in the total snowpack thickness. To compare abundances of the pathogens between samples when they were detected, values for population density were $\log_{10}$ transformed prior to calculations. Degrees of correlation and their significance ($p < 0.05$) were determined with Pearson's product-moment correlation or Spearman's rank correlation rho.

Table III-2. Populations sizes of microorganisms, pH and electrical conductivities in streams
Values correspond to means and standard error. For each variable, those associated with the same letter are not significantly different (Wilcoxon rank sum test, $p < 0.05$). NA : not analyzed.

					Population densities (CFU L^{-1})	
Catchments basins	Substrate	pH	EC (µs cm^{-1})	DOC (mg L^{-1})	Total bacteria	*P. syringae*
Ceillac, *Pisse creek*	Snow	5.62 ± 0.16^{d}	3.5 ± 0.8^{e}	NA	7.03 ± 0.48^{a}	3.85 ± 0.31^{ab}
	Water	7.90 ± 0.04^{a}	609 ± 44^{a}	3.56 ± 1.05^{a}	5.67 ± 0.10^{d}	2.73 ± 0.11^{d}
Col de Vars, *Riou Mounal creek*	Snow	5.40 ± 0.15^{bcd}	3.7 ± 0.5^{de}	NA	6.23 ± 0.53^{abcd}	2.74 ± 0.75^{ab}
	Water	7.89 ± 0.04^{a}	216 ± 7^{c}	3.19 ± 0.67^{a}	6.46 ± 0.16^{c}	3.43 ± 0.32^{bd}
Col du Lautaret, *Roche Noire creek*	Snow$^{\alpha}$	6.30 ± 0.07	6.02 ± 0.21	NA	7.55 ± 0.35	5.54 ± 0.09
	Water	7.78 ± 0.05^{ab}	143 ± 20^{d}	3.18 ± 1.39^{a}	6.13 ± 0.20^{bcd}	3.16 ± 0.07^{bcd}
Super Sauze, *Soudane creek*	Snow	5.30 ± 0.02^{c}	3.7 ± 0.3^{e}	NA	7.65 ± 0.34^{a}	4.38 ± 0.25^{a}
	Water	7.88 ± 0.06^{a}	324 ± 15^{b}	5.28 ± 1.17^{a}	6.75 ± 0.13^{b}	3.79 ± 0.15^{b}

$^{\alpha}$ Values for snowpack of Col du Lautaret corresponds to triplicates of only one date. Thus this site is not integrated in statistical tests.

RESULTS

Chemical features of Pisse creek are distinct from the other creeks.

Waters from all four creeks shared certain common characteristics but also showed particular distinctions. All waters were alkaline with a mean pH of 7.90 for which no significant differences were observed between sites (Table III-2 and supplementary Table II-4). Mean temperatures between sites at the time of sampling, were also not significantly different and were in a range of 1.4° to 14.7°C with a global average of 5.6°C. Likewise the DOC among sites was not significantly different (3.26 mg L^{-1} on average). However total ionic concentrations and EC were significantly different between the four sites (pair wise Wilcoxon rank sum, $p < 0.05$). The total ionic concentration reached 23 meq L^{-1} (826 mg L^{-1}) for Pisse creek with a mean EC of 609 µS cm^{-1}, although for the other sites ionic concentration was 2-3 times less important, and conductivities were lower (Table III-2, supplementary Table III-5). The anion SO_4^{2-} was most abundant in Pisse creek water although for the other sites HCO_3^- dominated and the major cation in all sites was Ca^{2+} (supplementary Table III-5). According to the classification of chemical features with the Piper diagrams (showed in Annexe 5), the streams of Col de Vars, Col du Lautaret and Super Sauze catchment basins

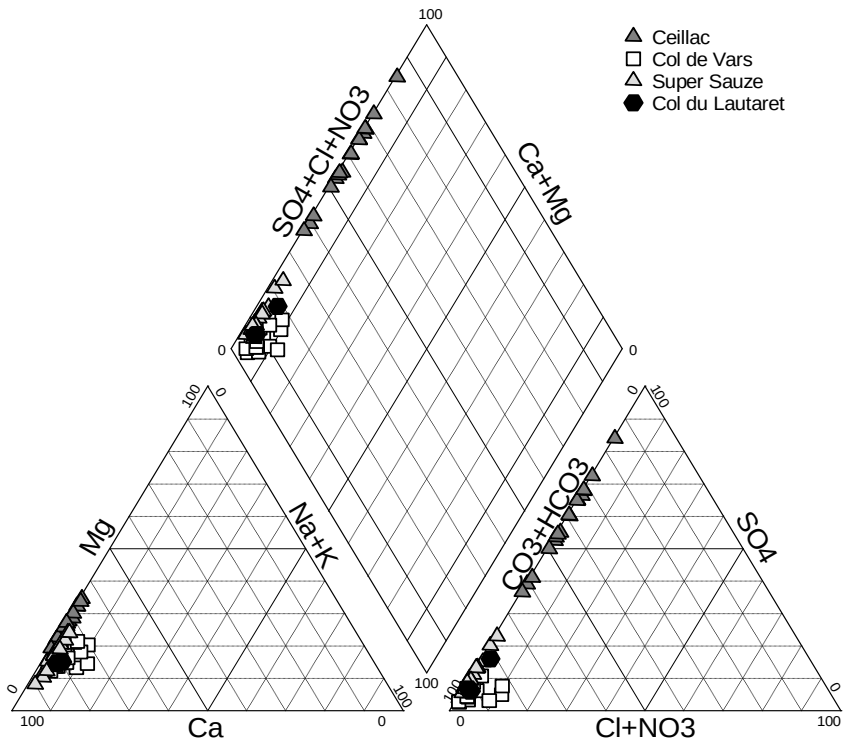


Figure III-1. Chemical features of water sampled in the Southern French Alps represented as percentage of total milligrams per liter on the trilinear Piper diagram (Piper, 1944)
The diagram is composed of two triangles representing cations and anions, and one rhombus representing global ionic composition. Its utilization is equal to a principal-component analysis (PCA).

were characteristic of calcic bicarbonated waters, whereas waters from Pisse creek were representative of calcic sulfated waters (Figure III-1).

Concentrations of *P. syringae* in creeks of the catchment basins are slightly lower than those in snowmelt, and are stable during spring and summertime

Populations sizes of *P. syringae* and total culturable bacteria were determined in water at the four sites during the snowmelt period. In three of the basins, samples were collected at 100 m from the snowpack sampling site and 1 km downstream. According to the ANOVA test ($p < 0.05$), there was no effect of sampling site along a same creek on the population sizes of microorganisms, EC and pH. Thus all data for streams were pooled per creek, and compared with those of snowpack sampled at the same sites by Monteil *et al.* (submitted-b). A summary of mean comparisons are given in Table III-2 and all data are presented in supplementary Table III-4.

Concentrations of *P. syringae* and total bacteria in water were significantly and positively correlated (Figure III-2). Moreover, for the two bacterial concentrations, there was no significant change over time from March to September (Figure III-3). Concentrations of total bacteria were significantly different between sites except for Roche Noire creek for which we had only three values (Table III-2). Concerning those of *P. syringae*, even if they followed the same trend of total bacteria, differences were significant only between waters of the Ceillac and Super Sauze catchment basins (5×10^2 CFU L^{-1} vs. 6.2×10^3 CFU L^{-1}).

When all sites were considered together, there were significant differences for all the variables between snow and water. EC and pH were lower in snowpack than in streams but concentrations of *P. syringae* and total culturable bacteria were higher. However, when snowpack and stream values were compared within a site, differences were not significant for the Riou Mounal creek (Wilcoxon rank sum test, $p = 0.55$), which could be due to the small number of samples for snowpack for this basin. Population sizes of *P. syringae* in water represented between 8%, 484%, 0.4% and 26% of the corresponding values in snowpack at Ceillac, Col de Vars, Col du Lautaret and Super Sauze. Thus, in the case of the Col de Vars watershed, the trend was the opposite of the others sites. For the three basins, these ratios were about 2 times greater than for total culturable bacteria.

P. syringae concentrations in streams are inversely correlated with conductivity and with SO_4^{2-} and Mg^{2+} abundance, but positively correlated with carbonate abundance

We attempted to determine if microbial concentrations in streams were correlated with chemical features. EC and the concentrations of sulfates and magnesium relative to the entire ionic concentration were negatively and significantly correlated with concentrations of total bacteria and those of *P. syringae*. However, the R^2 values were low (Table III-3).

On the contrary, carbonates were positively correlated with bacterial concentrations. High intercorrelations were observed between electrical conductivity (Table III-3). As shown in Table III-2 and Figure III-1, high electrical conductivities and high proportions

of SO_4^{2-} were particularly characteristic of Pisse creek water which had the lowest concentrations of *P. syringae* and total bacteria.

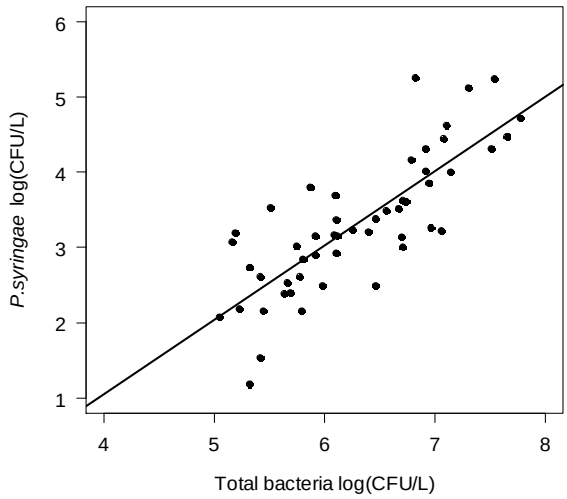


Figure III-2. Concentrations of *P. syringae* as a function of total culturable bacteria
Slopes were significantly different from 0 and correlations were significant according to Pearson's product-moment correlation with a R^2=0.77 ($P < 0.05$)

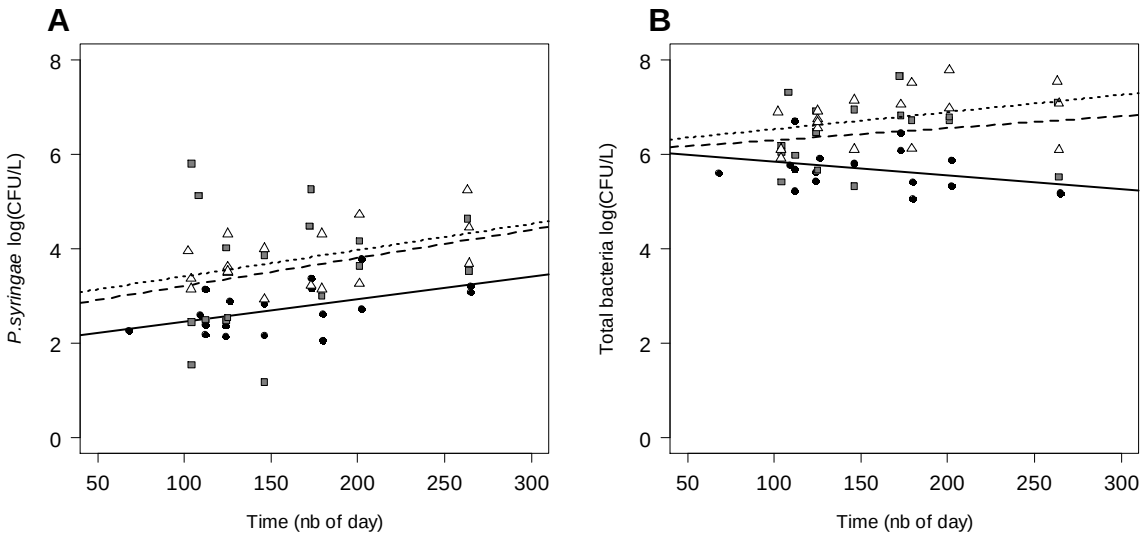


Figure III-3. Dynamics of bacterial concentrations over time
(A) Total culturable bacteria and **(B)** *P. syringae* as a function of time (Julian days). △ and the dotted line represent Soudane creek samples; ■ and the dashed line represent Riou Mounal creek samples, and ● and the solid line represent Pisse creek samples. Slopes were not significantly different from 0 and correlations were not significant according to the Spearman's rank correlation ($p > 0.05$).

Table III-3. Correlations between bacterial concentration (log(CFU/L) and water chemistry (n=52)

	R^2 Spearman sum rank test		
Variables	*P. syringae*	Total bacteria	EC
EC	-0.33*	-0.46***	
pH	0.14^{ns}	0.13^{ns}	-0.08^{ns}
DOC	0.32^{ns}	0.38^{ns}	-0.04^{ns}
SO_4^{2-}	-0.30*	-0.49***	0.87***
HCO_3^-	0.39**	0.56***	-0.83***
Cl^-	0.33^{ns}	0.33^{ns}	-0.75***
NO_3^-	-0.05^{ns}	-0.10^{ns}	-0.55***
Ca^{2+}	-0.19^{ns}	-0.29^{ns}	0.52***
Mg^{2+}	-0.41**	-0.64***	0.68***
Na^+	0.38^{ns}	0.43^{ns}	-0.85***
K^+	0.24^{ns}	0.33^{ns}	-0.82***

[a] ns denotes p >0.05, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001

DISCUSSION

Transport of *P. syringae* with the water cycle inside watersheds and between continents has been intensely studied in the past few years (Monteil *et al.*, submitted-a; Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008). *P. syringae* is omnipresent in headwaters and its populations are composed of an unsuspected high diversity in terms of genotypes and phenotypes. However, little is known about the population dynamics over time in association with water and the impact of transfer along the water cycle on population structure. This present study has demonstrated that concentrations of *P. syringae* in headwaters during the snowmelt season are rather stable. This strongly suggests that the bacteria are continuously discharged through hydrological channels that pass through the soil. This discharge should be proportional to water flow. The sink for the water in the basin studied here is the Serre-Ponçon lake, regulated for hydropower production by Electricité de France (EDF) (Lafaysse *et al.*, 2011). According to the available daily river flow measurements for the period of 1950-2006, daily mean flow at the outlet of the UDR basin is about 78 $m^3 s^{-1}$ with a range of 14 - 919 $m^3 s^{-1}$. If we consider the mean concentration of *P. syringae* in alpine streams (2×10^3 CFU L^{-1}) that feed into the lake, we could estimate that according the season, between 10^{12} and 10^{14} cells of *P. syringae* are transported daily downstream towards

irrigation basins in Southern France. This estimation assumes that water chemistry from the alpine streams to the Serre Ponçon lake is within the range of the chemistry described here and that there are no other environmental factors that change significantly along the water course that could impact *P. syringae* concentrations. Nevertheless, by coupling population dynamics over time to flood forecasting, water budgets, and hydrogeochemistry, we may be able to develop a tool to predict *P. syringae* fluxes at a given point of runoff. In the UDR basin, a hydrological model has been developped by Lafaysse *et al.* (2011), which is an improvement for alpine catchment basins of the SIM model of Habets *et al.* (2008). It combines meteorological analysis, a land surface scheme, and a distributed hydrogeological model that produces a good reproduction of the intra- and interannual variability of discharge (Lafaysse *et al.*, 2011). Such simulations may be done and confronted with field measurements.

Although we did not observe a change in bacterial concentrations over time, there were significant differences among sites. In particular, those of Pisse creek were markedly lower than those in the other creeks studied here. These observations were supported by the differences observed in several worldwide headwaters (Morris *et al.*, 2010). Here we demonstrated that these differences were due to water chemistry and that bacterial concentrations are correlated with electrical conductivity and relative ionic concentration of sulfates, magnesium and bicarbonates. *P. syringae* followed the same population dynamics as total bacteria suggesting that the plant pathogen was susceptible to the same factors as the rest of bacterial community in snow and water. One explanation could be that the observed ionic concentrations were too weak to insure favorable osmotic conditions, and thus were detrimental for *P. syringae* survival. Other factors to consider are the role that ionic concentrations play in the transport of the bacteria through the soil and as indicators of residence time of water in the soil – a factor that could be detrimental to bacterial survival in general.

Ionic strength of water is a critical factor in the adhesion of colloids to porous media such as soil. Several studies have demonstrated that the greater the ionic strength the more bacterial cells are retained by porous media and the less they are mobile (Redman *et al.*, 2004; Rijnaarts *et al.*, 1999; Takashima and Morisaki, 1997; van Loosdrecht *et al.*, 1989). However, our studies specifically with *P. syringae* at ionic strengths typical of the surface waters studied here show an inverse effect of ionic

strength on transport of this bacterium across sand columns (Monteil *et al.*, in preparation). Nevertheless, the differences in concentrations of *P. syringae* and total bacteria in snow surface water suggest that a certain fraction of bacteria are lost during passage through the soil, and that this loss is greater for total bacteria than for *P. syringae*. Water chemistry is also an indicator of the trajectory of the water. Chemical composition and electrical conductivity in a particular flow regime and geological context reflect water origin and residence time in soil. The entrance of water into a stream in response to a water-input event like snowmelt or a rainstorm occurs by subsurface lateral flow through the unsatured zone or by exfiltration from the satured zone (Sophocleous, 2002). But this quickflow initiated by such high input can be mixed with the baseflow coming from groundwater or enhanced groundwater fluxes to the stream. Waters from each origin interact differently with their environments, especially concerning processes of dissolution, oxido-reduction, chemical precipitation, sulfate reduction or hydrolysis (Toth, 1999). In this study no hydrogeological analysis was performed to assess the origin of waters in the streams. But such an approach should be done in the future and extended to more watersheds to define more precisely the way hydrochemistry can be predictive of *P. syringae* concentrations in waters. According to several landslide studies, high conductivities and high concentrations of SO_4^{2-} and Mg^{2+} in springs are indicative of deep inflow that move along discontinuities up to the surface (Bogaard *et al.*, 2007; Bogaard *et al.*, 2000; Campbell *et al.*, 1995; Montety *et al.*, 2007). On the contrary headwaters dominated by HCO_3^- indicate that waters originated from rainfall and subsurface waters. Thus, the lowest bacterial concentrations found in Pisse creeks could be due to fluxes from groundwater where water filtration and residence time of water would be strongest and thus thus reducing bacterial population sizes.

In light of these observations, we should be able to predict what type of watershed has streams with low population sizes and those where population sizes are higher, simply based on their water chemistry and hydrological context. By extending sampling specifically to sites that have chemistry beyond what was observed here, we might then see the effect of other factors such as pH and DOC concentrations as has been observed by Fierer *et al.* (2007). Indeed, authors found a correlation between biogeographical patterns exhibited by bacteria and some of these parameters. This suggests that by extending sampling to other creeks with different water chemistry or

geological and flow regimes we could elucidate responses of *P. syringae* populations to others hydrological changes. Moreover, we were interested in population sizes, but water chemistry or the underlying water dynamics it reveals, may have also have an impact on the population phenotypic diversity as suggested by observations of Morris *et al.* (2010), and especially those in relation to pathogenicity and host range. On the other hand, our study focalized on water chemistry, however other ecological parameters should be integrated into such an approach. For example, the quality of carbon and nitrogen substrates bioavailable in each stream or phytoplanktonic production (Berggren *et al.*, 2010) may affect *P. syringae* survival. This could be via predatation or competition for nutrients sources.

ACKNOWLEGMENTS

We thank Odile Berge, Eric Michel, Alain Buffière and Pierre Amato for snow sampling.

SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES

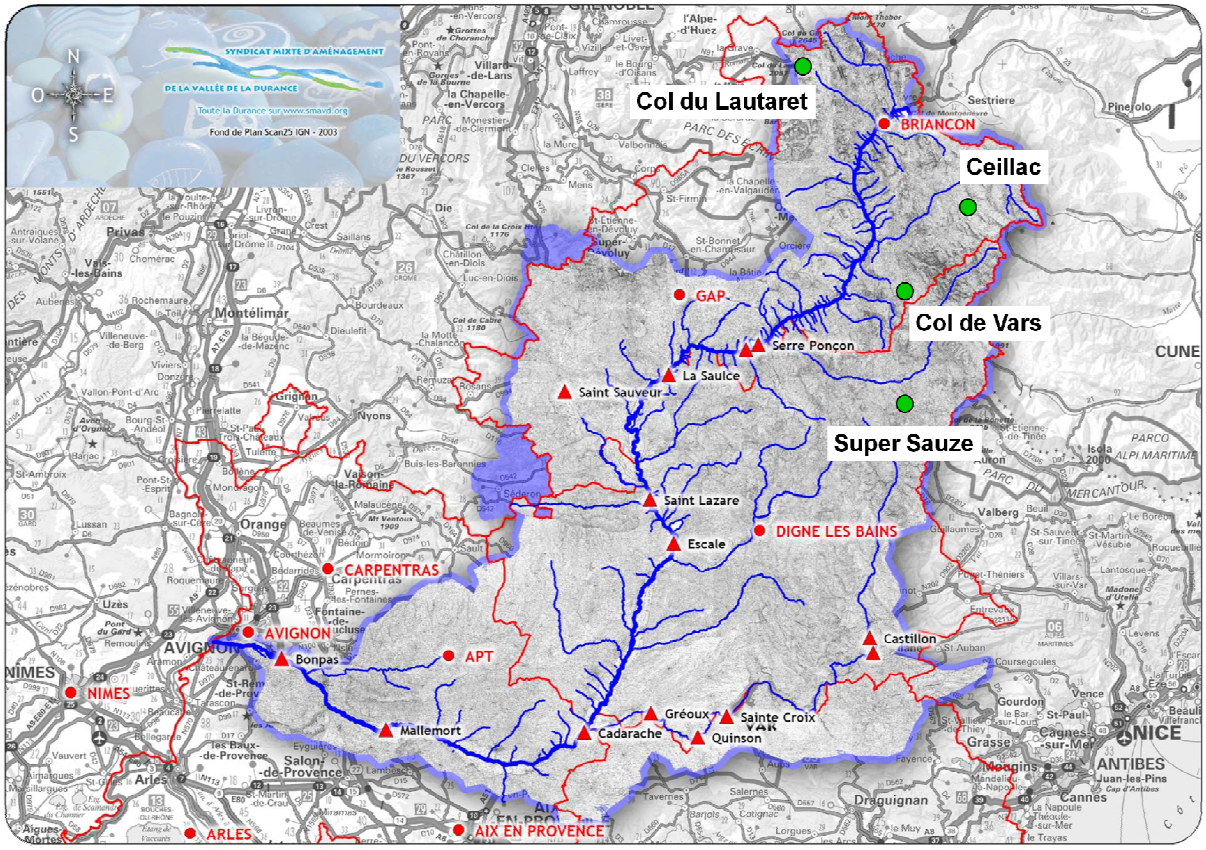


Figure III-4. Localization of the four catchment basins in the Durance river basin in France

Table III-4. Origin, chemical characteristics, and concentrations of total culturable bacteria and *P. syringae* in snowpack and rivers

NA: not analyzed and bdt: below the detection threshold.

Site[a]	Date	Sample	pH	EC (µS cm^{-1})	Temperature (°C)	Population densities (CFU L^{-1})		Ratio[b]
						Total bacteria	*P. syringae*	
Whole snowpack								
Ceillac								
	03/10/2009	CEN1g	5.34	4.0	NA	8.62	3.34	-5.28
	04/23/2009	CEN2g	6.22	0.4	NA	5.71	3.76	-1.95
	05/05/2009	CEN3g	5.42	5.3	NA	7.39	3.06	-4.33
	03/01/2010	CEN4g	5.66	3.6	NA	6.68	4.69	-1.99
	04/20/2010	CEN5g	5.45	4.1	NA	6.74	4.42	-2.32
Col de Vars								
	03/11/2009	CVN1g	5.39	5.2	NA	7.60	4.52	-3.08
	04/15/2009	CVN2g	5.22	3.2	NA	6.47	3.46	-3.01
	03/02/2010	CVN3g	5.82	3.4	NA	5.13	1.34	-3.79
	04/15/2010	CVN4g	5.18	3.0	NA	5.74	1.65	-4.09
Col du Lautaret								
	04/23/2010	LAN1g	6.30	6.0	NA	7.55	5.55	-2.01
Super Sauze								
	03/11/2009	SZN1g	5.36	4.8	NA	8.90	5.05	-3.85
	04/13/2009	SZN2g	5.32	3.8	NA	6.85	3.74	-3.11
	05/06/2009	SZN3g	5.21	3.7	NA	7.48	4.11	-3.37
	03/02/2010	SZN4g	5.30	2.9	NA	7.61	4.85	-2.76
	04/15/2010	SZN5g	5.30	3.5	NA	7.43	4.14	-3.29
River water								
Ceillac, *Pisse torrent*								
D	04/23/2009	CEW3	8.14	751	2.4	5.69	2.40	-3.291
	05/05/2009	CEW6	7.95	654	5.1	5.63	2.38	-3.245
	05/27/2009	CEW7	8.11	415	3.7	5.79	2.16	-3.626
	06/23/2009	CEW10	8.07	476	NA	6.46	3.38	-3.079
	07/22/2009	CEW12	7.91	537	9.2	5.87	3.80	-2.076
	05/27/2010	CEW15	7.96	434	3.8	5.91	2.90	-3.013
	06/30/2010	CEW17	7.9	434	NA	5.41	2.62	-2.788
	09/30/2010	CEW18	7.45	581	6.9	5.16	3.08	-2.080
	04/23/2009	CEW4	7.97	492	3.8	6.70	3.14	-3.554
H	03/10/2009	CEW1	8.25	874	NA	5.60	2.27	-3.335
	04/23/2009	CEW2	7.91	960	NA	5.22	2.18	-3.046
	05/05/2009	CEW5	7.69	796	NA	5.44	2.15	-3.298
	05/27/2009	CEW8	8.17	386	5.7	5.80	2.84	-2.963
	06/23/2009	CEW9	7.90	493	NA	6.08	3.17	-2.901
	07/22/2009	CEW11	7.72	546	4.2	5.32	2.73	-2.596
	09/23/2009	CEW13	7.69	668	4.7	5.19	3.20	-1.995
	04/20/2010	CEW14	7.75	975	4.8	5.77	2.61	-3.164
	06/30/2010	CEW16	7.81	483	NA	5.05	2.07	-2.978
Col de Vars, *Riou Mounal creek*								
D	04/15/2009	CVW2	7.89	290	4.2	6.18	5.80	-0.380
	05/05/2009	CVW4	7.77	219	5.5	5.98	2.50	-3.481
	05/27/2009	CVW5	8.18	190	7.2	6.46	2.49	-3.974
	06/23/2009	CVW8	8.00	211	NA	6.94	3.86	-3.084
	07/21/2009	CVW10	7.93	234	14.7	7.65	4.47	-3.179
	05/26/2010	CVW14	8.01	187	5.8	6.71	3.63	-3.078
	06/29/2010	CVW15	7.92	199	NA	7.30	5.12	-2.177
H	11/01/2008	CVW19	NA	NA	NA	6.77	1.52	-5.252
	04/15/2009	CVW1	7.71	262	4.2	6.05	2.45	-3.603
	05/05/2009	CVW3	7.90	220	4.4	6.91	4.02	-2.895
	05/27/2009	CVW6	8.02	192	4.5	5.32	1.18	-4.148
	06/23/2009	CVW7	8.11	220	NA	6.82	5.26	-1.565
	07/21/2009	CVW9	7.94	219	7.2	6.78	4.16	-2.620
	09/22/2009	CVW11	7.72	232	6	7.10	4.63	-2.464

	04/15/2010	CVW12	7.55	225	4.7	5.41	1.54	-3.863
	05/26/2010	CVW13	8	176	4.4	5.66	2.54	-3.116
	06/29/2010	CVW16	8	184	NA	6.71	3.00	-3.709
	09/20/2010	CVW17	7.6	209	5.8	5.51	3.53	-1.982
Col du Lautaret, *Roche Noire torrent*								
D	05/27/2010	LAW1	7.81	135	3	6.39	3.21	-3.174
	06/30/2010	LAW2	7.69	112	NA	6.25	3.24	-3.012
	09/20/2010	LAW3	7.86	181	10.4	5.74	3.02	-2.721
Super Sauze, *Soudane creek*								
D	04/13/2009	SZW2	7.37	374	4.2	6.49	3.80	-2.692
	05/06/2009	SZW4	7.93	324	5.4	6.55	3.49	-3.060
	05/27/2009	SZW5	8.25	234	6.1	6.10	2.93	-3.172
	06/23/2009	SZW8	8.09	263	NA	7.05	3.22	-3.838
	07/21/2009	SZW10	7.90	305	7.3	7.77	4.72	-3.047
	09/23/2009	SZW12	7.62	345	NA	7.07	4.45	-2.617
	04/15/2010	SZW13	8.06	385	2.1	6.10	3.37	-2.736
	04/15/2010	SZW19	8.15	351	3	5.91	3.15	-2.756
	05/26/2010	SZW15	8.06	246	5.6	6.73	3.61	-3.121
	06/29/2010	SZW17	7.96	245	NA	6.11	3.15	-2.955
	09/20/2010	SZW18	7.65	311	5.9	6.09	3.69	-2.409
H	04/13/2009	SZW1	7.67	451	NA	6.89	3.95	-2.937
	05/06/2009	SZW3	7.51	344	1.4	6.67	3.52	-3.151
	05/27/2009	SZW6	8.25	269	9.3	7.14	4.00	-3.134
	06/23/2009	SZW7	8.10	349	NA	7.87	bdt	-7.172
	07/21/2009	SZW9	8.07	387	9.7	6.96	3.26	-3.703
	09/22/2009	SZW11	7.52	409	8.1	7.54	5.24	-2.302
	05/26/2010	SZW14	7.98	266	4.6	6.91	4.31	-2.601
	06/29/2010	SZW16	7.94	317	NA	7.51	4.31	-3.196

[a] D and H represent Downstrean and Headwater

[b] ratio represents the log of populations sizes of *P. syringae* and total bacteria

Table III-5. Ionic composition of water samples

NA: not analyzed and nd: under the detection threshold. BDT

Site	Sample	EC	Alcalinity	Anions concentrations (mg L^{-1})					Cations concentrations (mg L^{-1})				DOC
		(µS cm^{-1})	(mg L^{-1})	F^-	Cl^-	NO_3^-	PO_4^{2-}	SO_4^{2-}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+	K^+	(mg L^{-1})
Ceillac, *Pisse torrent*													
	CEW3	751	204.6	0.02	0.65	0.87	nd	300.30	130.70	22.71	0.61	0.46	1.44
	CEW6	654	140.8	0.08	0.97	0.92	nd	223.43	114.60	19.90	0.73	0.73	19.53
	CEW7	415	237.6	0.01	0.51	0.87	nd	120.97	61.59	13.44	0.41	0.47	1.72
	CEW10	476	184.8	0.21	0.66	1.19	nd	162.76	68.75	16.12	0.47	0.52	6.28
	CEW12	537	146.7	0.02	0.69	1.15	nd	176.69	86.63	19.53	0.48	0.51	3.08
	CEW15	434	145.2	0.02	0.39	0.91	nd	115.37	49.26	14.28	0.35	0.29	1.62
	CEW17	434	135.3	nd	0.35	0.85	nd	124.68	47.09	15.20	0.31	0.31	2.55
	CEW18	581	120	nd	0.39	1.18	nd	201.85	66.28	19.39	0.40	0.40	1.02
	CEW4	492	246.4	0.04	0.64	1.49	nd	136.40	76.19	13.59	0.60	0.53	1.63
	CEW1	874	NA	0.04	0.96	nd	nd	438.48	172.80	28.92	1.01	0.59	12.38
	CEW2	960	204.6	0.05	0.74	1.11	nd	427.90	162.70	27.50	0.64	0.50	0.98
	CEW5	796	233.2	0.04	0.70	0.41	nd	339.24	142.90	25.41	0.62	0.51	3.83
	CEW8	386	228.8	0.02	0.34	1.12	nd	104.60	59.70	12.57	0.28	0.29	3.56
	CEW9	493	180.4	0.49	1.18	1.30	nd	176.71	70.41	17.29	0.79	0.99	2.95
	CEW11	546	152.9	0.02	0.64	0.65	nd	185.42	78.07	20.60	0.47	0.47	4.02
	CEW13	668	152.5	0.02	0.58	0.81	nd	257.56	103.30	23.44	0.48	0.43	3.05
	CEW14	975	118.8	0.25	0.73	1.07	nd	501.82	157.28	22.79	0.75	0.43	1.63
	CEW16	483	155.1	nd	0.35	1.16	nd	148.11	54.75	17.06	0.39	0.34	1.63
Col de Vars, *Riou Mounal creek*													
	CVW2	290	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CVW4	219	112.2	0.02	6.59	3.05	nd	5.07	32.73	3.41	4.16	1.12	1.80
	CVW5	190	176.0	0.01	1.24	0.29	nd	3.52	30.73	3.12	1.62	0.83	3.98
	CVW8	211	178.2	0.02	1.40	1.09	nd	6.47	36.82	3.73	1.64	1.05	2.10
	CVW10	234	176.0	0.01	3.67	0.51	nd	10.54	37.73	4.20	2.92	0.85	2.33
	CVW14	187	124.7	nd	1.99	1.08	nd	3.45	21.11	3.24	1.94	0.90	3.07
	CVW15	199	143.0	nd	3.27	0.65	0.17	7.75	22.68	3.96	2.87	1.02	2.52
	CVW19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CVW1	262	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	CVW3	220	160.6	0.03	7.76	2.35	nd	4.40	31.50	3.73	5.30	1.02	11.87
	CVW6	192	187.0	0.03	0.71	1.03	nd	4.18	31.83	2.78	1.38	0.58	3.78
	CVW7	220	193.6	0.01	2.81	0.99	1.24	6.73	32.54	3.76	2.56	0.87	2.59
	CVW9	219	187.0	0.02	1.03	0.50	nd	11.08	35.33	4.13	1.44	0.79	5.07
	CVW11	232	176.0	0.02	1.27	1.38	nd	13.44	35.68	4.39	1.59	0.89	2.53
	CVW12	225	119.9	nd	6.74	2.54	nd	8.70	31.44	4.70	3.49	1.15	1.79
	CVW13	176	116.6	nd	0.99	1.17	nd	4.24	21.97	2.79	1.65	0.61	2.18
	CVW16	184	145.2	0.04	1.08	0.89	nd	7.44	22.76	3.95	1.50	0.80	1.78
	CVW17	209	123.2	nd	2.05	0.55	nd	11.97	24.60	4.38	1.93	0.75	0.59
Col du Lautaret, *Roche Noire torrent*													
	LAW1	135	85.8	nd	0.81	1.04	nd	4.43	17.04	1.83	0.83	0.35	5.98
	LAW2	112	75.9	nd	0.32	0.64	nd	4.38	13.87	1.54	0.60	0.30	1.83
	LAW3	181	59.4	nd	0.74	0.54	nd	9.15	24.00	2.74	1.52	0.52	1.75
Super Sauze, *Soudane creek*													
	SZW2	374	NA	0.03	1.13	nd	nd	27.82	68.32	7.59	1.50	0.58	5.77
	SZW4	324	202.4	0.03	0.64	0.01	nd	20.38	57.56	5.94	1.35	0.60	10.97
	SZW5	234	231.0	0.03	0.26	0.68	nd	10.74	40.41	4.48	0.70	0.33	1.28
	SZW8	263	226.6	0.02	0.45	0.55	nd	19.19	41.34	5.27	0.98	0.51	9.97
	SZW10	305	220.2	0.03	1.32	0.77	nd	31.17	50.92	6.60	1.66	1.00	15.25
	SZW12	345	234.3	0.03	0.42	0.86	nd	46.50	57.55	7.87	1.27	0.47	4.00
	SZW13	385	280.5	nd	1.53	3.21	nd	15.19	61.61	9.86	1.63	0.55	2.14
	SZW19	351	224.4	nd	0.43	0.58	nd	26.91	56.93	7.16	1.52	0.35	2.20
	SZW15	246	189.2	0.07	0.66	0.60	nd	12.57	31.85	5.55	0.97	0.47	2.30
	SZW17	245	157.3	nd	0.30	0.75	nd	19.28	29.98	5.91	0.88	0.39	1.62
	SZW18	311	161	nd	0.39	0.78	nd	38.41	37.57	7.52	1.32	0.47	1.58
	SZW1	451	NA	0.04	0.35	nd	nd	85.08	79.45	14.61	1.75	0.48	1.99
	SZW3	344	198.0	0.08	0.34	0.54	nd	23.87	62.43	5.19	1.61	0.47	14.50
	SZW6	269	239.8	0.05	0.18	0.22	nd	20.78	45.42	5.16	1.15	0.36	1.88
	SZW7	349	314.6	0.04	0.53	nd	0.12	18.90	63.33	4.61	1.94	0.72	3.47
	SZW9	387	206.8	0.07	0.30	nd	nd	15.82	79.39	4.32	1.62	0.53	5.23
	SZW11	409	314.6	0.08	0.67	nd	nd	37.91	77.85	6.92	2.46	0.61	2.43
	SZW14	266	195.8	nd	0.75	0.30	nd	16.22	34.45	5.08	1.19	0.38	4.13
	SZW16	317	249.7	nd	1.03	0.13	nd	14.18	42.05	4.61	1.97	0.91	5.11

III.3. Complementary results on phenotypic and genotypic diversity

HYPOTHESES, MATERIALS & METHODS

In addition to hypothesis about bacterial populations sizes during snowmelt, we were also interested in the differences of the phenotypic and genotypic population structure between the two substrates. Our hypothesis was that strains found in water were different between sites, between different chemical profiles and from those found in snow. Phenotyping and genotyping of water strains is still in progress, but we have data from the first sampling campaign of 2009, for three catchment basins.

Phenotyping and genotyping of strains was conducted as described in Chapter I. At least 20 strains per each water sample were characterized for ice nucleation activity (INA), the capacity to induce a hypersensitive reaction in tobacco (HR), aggressiveness on cantaloupe (AGR) and production of syringomycin-like toxins (SYR) as described by Morris *et al.* (2008)

Genotypic characterization was based on sequencing of genes in the core genome (*rpoD*, *gyrB*, *cts* and *gapA*) as described previously (Morris *et al.*, (2010; 2008)). The objective of the phylogenetic analysis was to assign strains isolated from water in 2009 to the clades described by Morris *et al.* (2010). To represent the full range of diversity observed in this study, we used strains with different phenotypic combinations. This was accomplished for the 139 strains. Determination of the clade of each strain was based on the approach used in our previous study of *P. syringae* from non agricultural and agricultural habitats (Morris *et al.*, 2010) and in the Chapter I.

RESULTS

Frequencies of strains per phenotypic class (HR, INA, AGR and SYR) for each sample are presented in the Table I-4, and the number of strains belonging to each phylogenetic group defined by Morris *et al.* (2010) are presented in Table I-5. For the moment the only trend we can observe is the large diversity for all variables whatever the site. Phenotypic frequencies and phylogroups found in this study, corresponded to those found in previous studies in non agricultural habitats (Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008) and confirmed the large diversity inside the

metapolulation observed in snowpack and the underlying leaf litter of the Chapter I and in non agricultural habitats in general. It was interesting to see that more than 94 % of strains were ice nucleation active and 31% were aggressive of cantaloupe, which is on average 9 % and 50% more than in the snowpack. Further analysis will permit better fit characterization of this trend.

Another new phylogenetic group was observed in snowpack (Chapter I) and in water here, closely related to the USA-102 group whose strains are HR^+, ice nucleation active and non aggressive on cantaloupe seedlings.

Table III-6. Frequencies of *P. syringae* strains in different phenotypic classes from water at three sites in 2009 and 2010

Frequencies were compared for each phenotype within a site. Values associated with the same letter are not significantly different according the Fisher exact test (p > 0.05). NA : non analyzed. Characteristic of samples are shown in Table III-4.

		Frequency of strains in each class (%)[b]						
Site	Sample[a]	HR+ [c]	INA+ [d]	INA3 [e]	AGR+ [f]	AGR>1 [g]	SYR+ [h]	SYR>2 [i]
Ceillac								
	CEW1	96[a]	100[a]	45[a]	14[d]	0[bc]	24[b]	11[b]
	CEW2	89[a]	94[a]	53[a]	20[cd]	0[bc]	20[b]	5[b]
	CEW3	86[a]	90[ab]	43[a]	24[cd]	15[ab]	67[a]	61[a]
	CEW7	100[a]	100[a]	35[ac]	25[cd]	16[ab]	26[b]	6[b]
	CEW8	76[a]	95[ab]	38[ab]	43[abc]	14[ab]	52[ab]	33[ab]
	CEW9	33[c]	71[b]	9[d]	62[a]	50[a]	5[c]	5[b]
	CEW10	44[ab]	94[a]	28[abc]	55[ab]	39[a]	20[b]	10[b]
	CEW14	NA	NA	NA	5[d]	0[bc]	30[b]	10[b]
Col de Vars								
	CVW1	33[b]	95[a]	19[a]	19[d]	5[d]	45[bcd]	32[ab]
	CVW2	76a	100[a]	29[a]	43[c]	19[c]	76[ab]	42[ab]
	CVW5	65[a]	90[a]	40[a]	25[d]	10[c]	70[ab]	47[ab]
	CVW7	NA	NA	NA	80[ab]	80[ab]	85[a]	71[a]
	CVW8	27[a]	91[a]	35[a]	64[bc]	50[bc]	18[cd]	15[b]
Super Sauze								
	SZW1	95[a]	100[a]	30[a]	20[b]	5[a]	30[b]	15[a]
	SZW2	80[a]	95[a]	40[a]	25[b]	0[a]	60[ab]	50[a]
	SZW3	90[a]	100[a]	25[a]	15[b]	5[a]	50[ab]	40[a]
	SZW5	76[a]	94[a]	23[a]	30[ab]	10[a]	20[b]	10[a]
	SZW6	88[a]	94[a]	29[a]	20[b]	0[a]	50[ab]	20[a]
	SZW8	NA	NA	NA	62[a]	56[a]	81[a]	44[a]
	SZW13	NA	NA	NA	10[b]	5[a]	45[b]	20[a]
	SZW19	NA	NA	NA	5[b]	5[a]	35[b]	20[a]

[a] The specific location of sites is indicated in Table III-1 and III-4.

[b] For each site, Fisher tests (using the integer number of strains tested) were conducted to evaluate if there was a significant effect of substrate (snow layers and litter) on the frequency of strains for each phenotype. Values followed by the same letter are not significantly different from the frequencies for the other substrates for the same sampling date and site. At some sampling dates only one substrate was available and hence no comparisons could be made at these dates.

[c] Frequency of strains capable of inducing a hypersensitive reaction on tobacco.

[d] Frequency of strains for which at least 10^{-6} cells were ice nucleation active at -8°C or warmer.

[e] Frequency of strains for which at least 10^{-6} cells were ice nucleation active between - 4°C and - 2°C

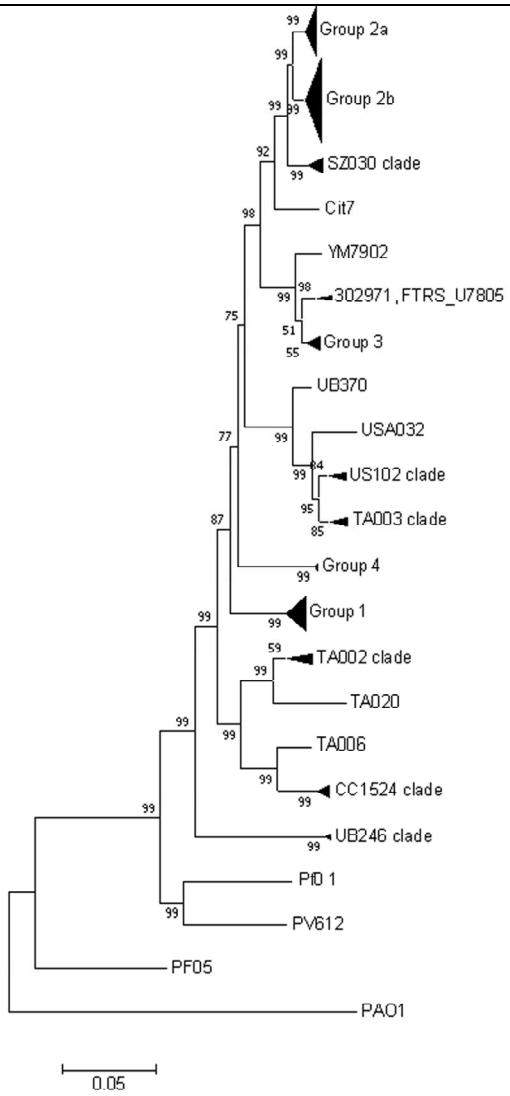
[f] Frequency of strains inducing symptoms on more than half of the cotyledons and having a mean score severity ≤ 1.

[g] Frequency of inducing symptoms on more than half of the cotyledons and having a mean score severity > 2.

[h] Frequency of strains for which there was a detectable zone of inhibition (> 0 mm) of *G. candidum* .

[i] Frequency of strains producing a zone of antibiosis against *G. candidum* > 2 mm.

Table III-7. Affiliation of the water strains to the phylogroups defined by Morris *et al.* (2010)

Phylogenetic affiliation	Group[a]	Number of strains	Frequence of strains (%)
			
	Groupe2a	33	24
	Groupe2b	5	4
	Groupe2	1	1
	SZ-030	10	7
	UB-370	1	1
	USA-032	7	5
	new group	2	1
	USA-102	22	16
	TA-003	13	10
	Groupe1	9	7
	TA-002	20	15
	CC1524	1	1
	UB-246	12	9
	Total	136	100

III.4. Complementary experiment to assess the transport of *P. syringae* through the soil

INTRODUCTION

Our results in this Chapter and those of Morris *et al.* (2010) strongly suggest that populations found in headwaters have been transported via the soil. To have direct evidence of this process we decided to take advantage of the fully controlled soil-vegetation lysimeters transplanted into *in situ* deep-seepage collectors at Col du Lautaret. This system has been set up in the framework of the Bio-CATCH project developed by Jean Christophe Clément and Sandra Lavorel from the Laboratoire d'Écologie Alpine (LECA) and the alpine station at Col du Lautaret of the Université de Joseph Fourier at Grenoble. One of their goals was to determine the effect of land use and climate change on water resources and plant diversity in mountains. Their system permitted us to test the hypothesis of an effective transfer of *P. syringae* in the water flowing through soil.

SAMPLING AND QUANTIFICATION OF MICROORGANISMS

A plot of lysimeters was set up at the Col du Lautaret site, described in the previous manuscript (Figure III-5). Each lysimeter consisted in a stainless steel cylinder (40 x 25 cm Ø) in which a core of soil and vegetation collected at Col du Lautaret was introduced. Cores were different in terms of land use (from mown or abandoned fields) and soil structure. Each lysimeter was equipped with a pumping system to collect the percolated water. The percolated water of 6 lysimeters (3 mown and 3 abandoned) was pumped with sterilized material in June 2010 after two rain events. At the time of these events, all snow had melted and lysimeters had been drained. In addition, the occurrence of *P. syringae* on the leaf litter and vegetation next to the lysimeters was verified. Samples were kept in a cooler until processing. Population sizes of total culturable bacteria and *P. syringae* per gram of plant material or per liter of percolated water were determined, and pH and electrical conductivity (EC) of the water were measured as described previously in Chapter I.

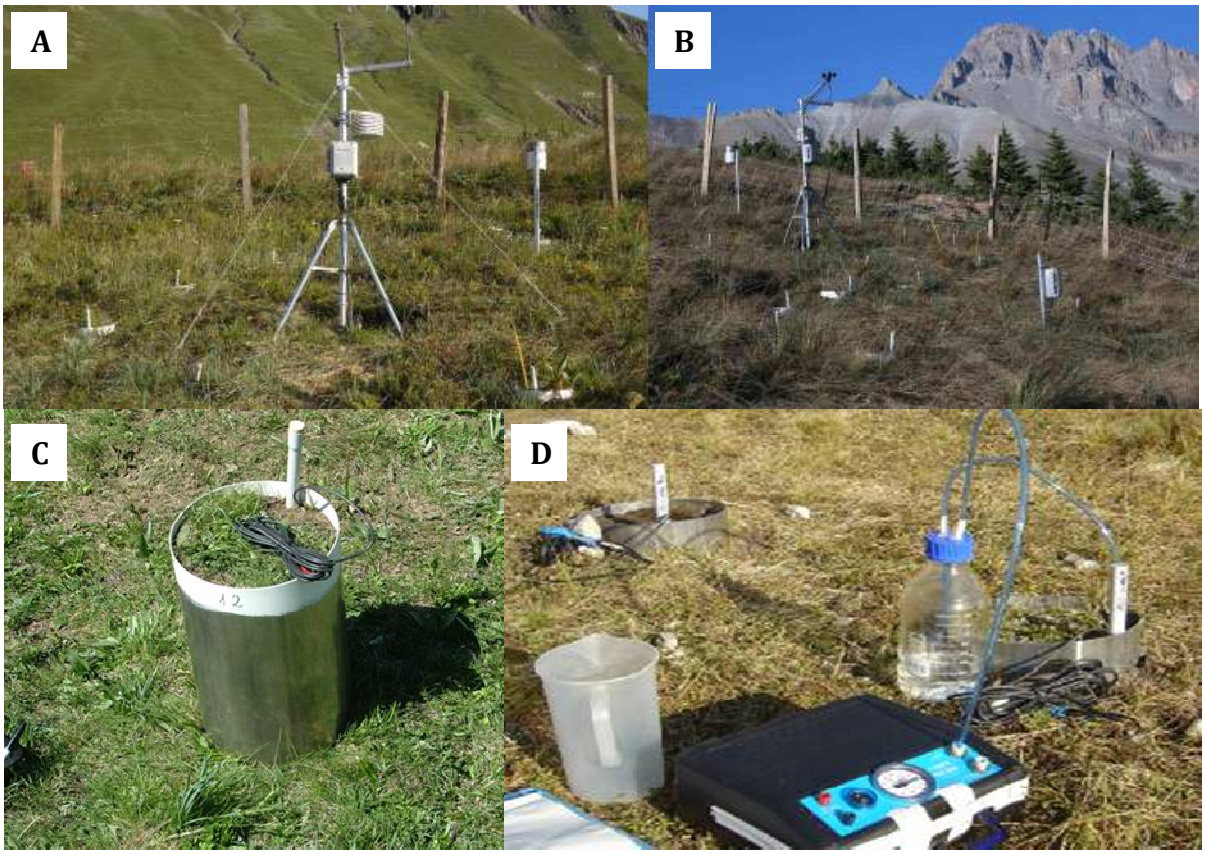


Figure III-5. The experimental system of the Bio-CATCH project.
(**A, B**) Experimental plots with the meteorological stations and the lysmiters. (**C**) An exemple of a lysimeter with the soil core. (**D**) System for pumping the percolated water from the bottom of the core.

RESULTS & DISCUSSION

P. syringae was detected in 9/12 samples of percolated water and in all leaf litter and vegetation samples (Table III-8). Although we could not determine which part of the soil the strains came from, these results showed that the bacterium could be transported by water when rain or snowmelt infiltrated the soil. These observations were completely original for *P. syringae* and highlighted the importance of considering transport via the soil in the life history of *P. syringae*. In comparison with the values obtained for plant material from September 2009 and 2010, population sizes in this study seemed to be low but confirmed its presence in such an environment. Bacterial concentrations were also lower in percolated water compared to those in waters. This could be explained by the fact that cores retained more bacteria or because the source strength was lower.

Table III-8. Population sizes of total culturable bacteria and *P. syringae* in the percolated water of lysimeters and the plant material of grasslands from the Col du Lautaret

Substrate	Date	Land use	Sample	pH	EC ($\mu S\ cm^{-1}$)	Population densities log ($CFU\ L^{-1}$) Total bacteria	*P. syringae* [a]
Percolated water							
	06/10/2010	Mown	LAS6	5.89	41.8	9.40	3.46
			LAS7	6.16	34.0	7.55	2.11
			LAS8	6.00	32.8	7.84	3.05
		Abandoned	LAS9	6.57	84.0	7.59	nd
			LAS10	6.58	68.9	6.93	2.05
			LAS11	6.46	69.0	7.35	4.17
	06/18/2010	Mown	LAS12	6.05	44.5	7.55	1.30
			LAS13	5.52	33.4	7.91	1.00
			LAS14	5.54	30.5	7.44	1.70
		Abandoned	LAS15	6.58	86.7	7.56	nd
			LAS16	6.22	65.8	7.35	nd
			LAS17	6.36	81.7	7.59	2.64
Leaf litter							
	06/18/2010	Abandoned	LAL6	/	/	6.78	5.87
			LAL7	/	/	7.03	2.61
			LAL8	/	/	6.53	4.10
Vegetation							
	06/10/2010	Abandoned	LAV1	/	/	6.78	5.87
			LAV2	/	/	7.03	2.61
			LAV3	/	/	6.53	4.10

[a] nd for non detected

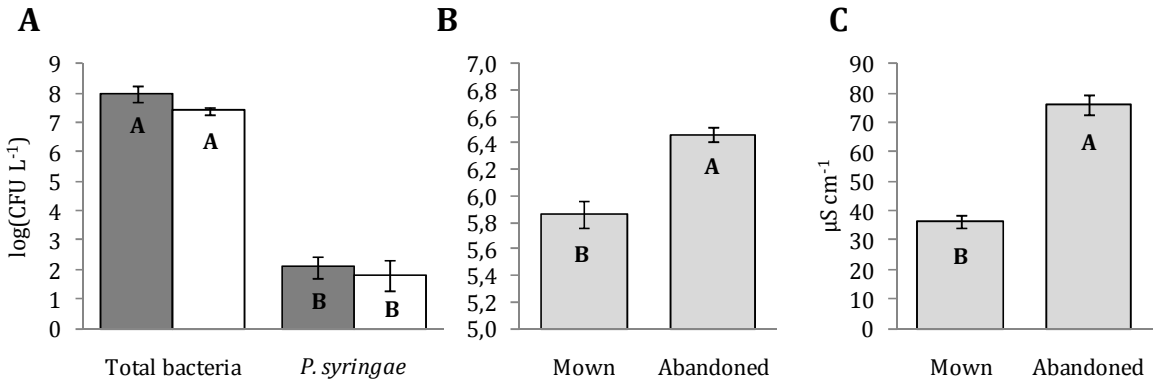


Figure III-6. Microbial and chemical characteristics of the lysimeter percolate
(A) Population sizes of total culturable bacteria and *P. syringae* in percolates of the lysimeters corresponding to mown land (grey bars) and abandoned land (white bars) **(B)** pH values and **(C)** electrical conductivty in the two types of lysimeters for which land use was different. Results are from two differents experiments of three replicates. For each graph, values associated with the same letter are not significantly different (t-test, $P < 0.05$). Errors bars correspond to the standard errors.

In addition to evaluating transfer in soil, we assessed the role of the land use and soil pH and EC on the population sizes of total bacteria and *P. syringae* (Figure III-5). We did not observe an effect of the core type on the two bacterial concentrations even if pH and EC were significantly different (t-test, $p < 0.05$). However, the sampling effort was surely too small. These results, coupled to the high diversity observed in rivers of the

Southern French Alps before, confirmed the interest in studying *P. syringae* transfer through the soil and in evaluating the impact of this transfer on the population structure. Given the difficulties to assess this process in the field, studies in laboratory with controlled conditions should provided a good framework and were hence set up for the work described in the following section.

III.5. Synthèse

Ces recherches avaient pour objectifs de mieux comprendre la dynamique des populations de *P. syringae* dans les eaux de source lors de la période de fonte des neiges et de trouver des indicateurs chimiques qui puissent témoigner de la structure des populations. Durant deux ans, l'échantillonnage régulier de quatre cours d'eau dans le bassin versant de la Haute Durance dans les Alpes du Sud au printemps et en été a validé plusieurs de nos hypothèses.

Premièrement, *P. syringae* a systématiquement été détectée dans les cours d'eau quelque soit le site et la date de prélèvement. Bien qu'aucune tendance n'ait été observée au cours du temps au niveau de la taille des populations bactériennes, il y avait des différences significatives entre sites, tout spécialement en ce qui concerne les bactéries totales. La taille des populations de *P. syringae* dans les cours d'eau pouvaient être prédite en fonction de celle des bacéries totales.

Deuxièmement, grâce à l'analyse chimique des échantillons (pH, EC, concentration en DOC, et composition ionique), nous avons pu montrer que ces différences étaient liées à la conductivité électrique et tout spécialement aux concentrations relatives, intercorrélées, de deux anions majoritaires (les sulfates et les bicarbonates) et du cation Mg^{2+}. Ces recherches ont montré l'intérêt d'une approche d'hydroécologie dans le cadre de la prédiction de la structure des populations de *P. syringae* dans les cours d'eau en milieu alpin. Elles doivent être complétées par une étude plus approfondie des régimes hydrologiques et de la géologie associés aux bassins versants, mais également par un effort d'échantillonnage supplémentaire dans des cours d'eau aux chimies plus différents. À terme, ces observations couplées au modèle SIM (Lafaysse *et al.*, 2011), et à des outils SIG sur la géologie devraient permettre de prédire plus précisément la dynamique des populations au cours du temps.

Enfin, nous avons pu infirmer l'hypothèse selon laquelle la taille des populations dans l'eau de source est identique à celle dans le manteau neigeux du même site. En effet, excepté pour le bassin versant associé au versant sud du Col de Vars, nous avons toujours mis en évidence une diminution de la taille des populations dans l'eau de source par rapport au manteau neigeux. Couplées à nos expériences préliminaires avec les lysimètres du projet Bio-CATCH, ces observations suggérent un transport de *P.*

syringae à travers le sol avec l'eau de fonte impactant sur la taille des populations. L'analyse des structures génotypiques et phénotypiques ainsi que l'estimation des taux de transfert de la bactérie à travers le sol sous des conditions contrôlées, devraient permettre d'évaluer l'impact du passage de l'eau de fonte dans le sol sur la diversité des populations de *P. syringae*.

Dans l'objectif global de la thèse, ces recherches ont permis :

- d'évaluer la dynamique des populations dans les cours d'eau au cours du temps
- d'estimer la taille des populations *P. syringae* disséminées à la sortie du bassin versant alpin par les rivières
- d'identifier les facteurs chimiques impactant sur la taille des populations
- de mettre en évidence le transport de *P. syringae* à travers le sol

IV. Estimation du transfert de la bactérie phytopathogène *P. syringae* en milieu poreux sous diverses conditions environnementales

IV.1. Introduction

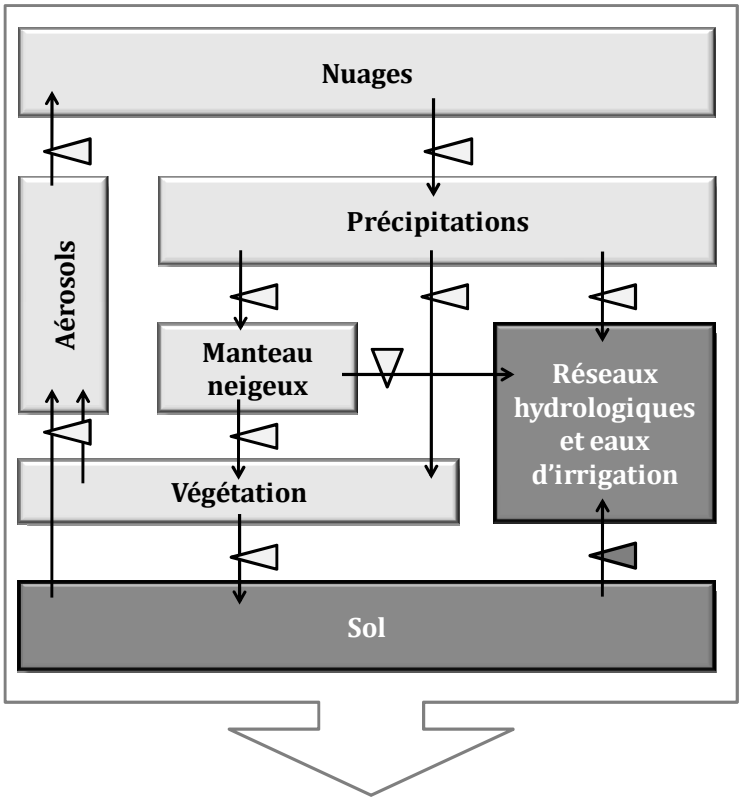
Le peu d'études qui se sont intéressées à la survie de *P. syringae* dans le sol, ont très peu ou pas détecté la bactérie (McCarter *et al.*, 1983; Riffaud and Morris, 2002; Sands *et al.*, 1982). Le sol n'était donc pas considéré comme une étape clé dans l'histoire de vie de *P. syringae*. Cependant sa détection systématique dans les eaux de source analysées dans le chapitre III et les travaux de Morris *et al.* (2010) suggéraient *P. syringae* pouvait être transportée par l'eau à travers le sol, ce qui a été confirmé par les expériences préliminaires avec les lysimètres du Col du Lautaret. Ces observations ont soulevé de nouvelles questions par rapport à la manière dont ce transfert dans le sol pourrait filtrer et structurer les populations de *P. syringae*. Cependant ces questions sont difficilement abordables sur le terrain, et nos premières analyses de la structure des populations de *P. syringae* dans les eaux de source montrent déjà une très grande diversité. Nous avons donc choisi de tester nos hypothèses à une échelle plus petite et en conditions contrôlées et en estimant le transport de *P. syringae* dans des colonnes d'un milieu poreux et de sol (illustrations de l'Annexe 6 à l'Annexe 9).

Nos objectifs étaient (i) d'estimer le transfert de *P. syringae* en milieu poreux en fonction des conditions physico-chimiques et (ii) de confronter les taux de transfert obtenus avec l'inoculation de colonnes de sol prélevées sur trois des bassins versants étudiés dans les chapitres précédents. Pour cela nous avons choisi de distinguer les souches sur la base de leur charge électrique (poteniel ζ) qui est la première propriété influençant le transport dans le sol. Avec cette approche, nous avons testé les hypothèses suivantes :

- Il n'y a pas de variabilité inter-spécifique au niveau des propriétés électriques de surface (potentiel ζ) pour *P. syringae,* ni au niveau des taux de transfert en milieu poreux.
- Si non, ces différences sont positivement corrélées à la charge électrique des souches et inversement corrélées avec la conductivité électrique de la solution.
- Les taux de transfert des populations de *P. syringae* et des bactéries totales présentes dans l'eau de fonte des neiges ne sont pas différents.

- Les taux de transfert des souches en milieux poreux et à travers les colonnes de sol ne sont pas différents.

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'un stage de M1 que j'ai encadré et feront l'objet d'un manuscrit pour soumission dans une revue comme *Environmental Science & Technology* ou *Water Resources Research*. À ce jour ils doivent encore être complétés. Ces recherches abordent les parties en gris foncé sur le model ci desous représentant notre cadre de travail.



Prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations d'un bassin versant

RÉSUMÉ

Récemment, le laboratoire a montré l'omniprésence et la diversité de la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* dans les eaux de source, le manteau neigeux et les précipitations. Ces observations et d'autres expériences préliminaires suggèraient son transport à travers le sol, soulevant ainsi de nouvelles questions sur le rôle de ce processus dans la sélection de souches pathogènes et la

diffusion des espèces en général. Pour mieux prédire la dynamique de la population dans les réseaux hydrologiques, nous avons estimé le taux de transfert de plusieurs souches avec des colonnes de sable dans des conditions abiotiques. Puis nous avons comparé ces valeurs à celles obtenues avec des colonnes de sol prélevées dans les prairies alpines et conservés à 4 °C pendant 4 mois. Pour choisir les souches pour l'estimation du transport de *P. syringae* à travers le sol, nous avons évalué sa variabilité interspécifique sa charge électrique de surface (potentiel ζ). Le taux de transfert de *P. syringae* dans les milieux poreux dépendait de la souche sélectionnée et la force ionique de la solution, mais n'était pas corrélée avec son potentiel ζ. Ces taux étaient comparables à ceux observés avec les colonnes de sol. L'injection d'un échantillone de neige fondue dans les colonnes de sable ont également montré que le taux de transport de *P. syringae* était supérieur à celui des bactéries totales des communautés de la neige. Enfin le sol s'est révélé être un réservoir de *P. syringae* dans lequel les populations ont survécu pendant plusieurs mois et pour lesquelles la taille (10^2 à 10^5 CFU L^{-1}) correspondait à la gamme trouvée dans les sources d'eau. Dans cette étude, nous avons officiellement démontré pour la première fois son passage à travers le sol.

IV.2. Article en préparation

Estimation of the rate of transfer of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in porous media relative to bacterial surface charge and water conductivity

Caroline L. MONTEIL[1], Jimmy LAURENT[1,2], François LAFOLIE[2], and Cindy E. MORRIS[1*]

[1] INRA, UR407 de Pathologie Végétale, Domaine St Maurice, BP. 94, 84140 Montfavet cedex, France

[2] INRA, UMR 1114 EMMAH, Domaine Saint-Paul, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

Subject category : Environmental Microbiology

Key words: soil, microbial ecology, water cycle, epidemiology, zeta potential, bacteria transport.

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 32 72 28 41; fax: +33 (0)4 32 72 28 42; E-mail: Cindy.Morris@avignon.inra.fr

ABSTRACT

Recently, the laboratory has demonstrated the ubiquity and the diversity of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* in headwaters, snowpack and precipitations. These observations and others preliminary experiences suggest its transport through the soil, raising novel questions about the role of this process in the selection of pathogenic strains and the species dissemination in general. To better predict its population dynamics in hydrologic networks, we estimated the transfer rate of several strains in abiotic conditions with sand columns. Then we compared these values to those obtained with soil columns sampled in alpine meadows and kept at 4°C during 4 months. To choose strains for testing *P. syringae* transport through soil, we evaluated its interspecific variability according to its surface electrostatic charge (ζ potential). The transfer rate of *P. syringae* in porous media depended on the selected

strain and the ionic strength of the solution but was not correlated with its ζ potential. These rates were comparable to those observed with the soil columns. Injection of snowmelt in sand columns also showed that *P. syringae* transport was greater than that of total bacteria of snowmelt communities. Finally soil was revealed to be a reservoir of *P. syringae* in which populations were able to survive for several months and for which population size (10^2 to 10^5 CFU L^{-1}) corresponded to the range found in water sources. In this study, we have formally demonstraded its passage through the soil for the first time.

INTRODUCTION

Survival and dispersal of microbial pathogens in surface waters is the subject of numerous studies evaluating the health risk due to fecal pollution of drinking water reservoirs. Such concern has motivated the assessment of bacterial transport and fate through subsurface and ground environments, and the evaluation of physical and biological conditions conducive to its adhesion or release through insatured and satured porous media (Abramson and Brown, 2007; Abu-Ashour *et al.*, 1994; Brown and Abramson, 2006; Fontes *et al.*, 1991; Ginn *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2007; Stevik *et al.*, 2004). Observations in the laboratory and the field have shown that micro-organisms can migrate through the soil at significant distances both vertically and horizontally (Abu-Ashour *et al.*, 1994; Chen, 1988; Stevik *et al.*, 2004). The species for which transfer has been studied include various strains of *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., and a range of species of the genus *Pseudomonas*, including *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* (Jacobs *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009a; Liu *et al.*, 2007; Rijnaarts *et al.*, 1993; Williams and Fletcher, 1996; Won *et al.*, 2007). However, from the groundwater to surface waters, no study has been addressed dispersal and transport of plant pathogens through porous media although some plant viruses, fungi and bacteria have been detected in surface waters.

We know that some plant pathogens are disseminated by water such as *Ceratocystis platani* the causal agent of canker stain of plane trees (Panconesi, 1999), or *Ralstonia solanacearum* (Pradhanang, 1999). Others plant pathogens have been detected in mountain waters such as *Pectobacterium carotovorum*, but no study assessed its origin and fate (Franc, 1988). For most of them, we don't have any information on

the ecology and fluxes outside the host context to estimate the role of these environments in pathogen dissemination. On the contrary, there is evidence of a life history closely linked to the water cycle for the plant pathogen *P. syringae.* In addition to crops (Hirano and Upper, 2000; Sarkar and Guttman, 2004), *P. syringae* was isolated from precipitation and clouds (Amato *et al.*, 2007a; Constantinidou *et al.*, 1990; Monteil *et al.*, submitted-a; Morris *et al.*, 2008; Sands *et al.*, 1982), in river water (Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008), in wild plants and weeds (Mohr *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008) and in seasonal snow cover (Monteil *et al.*, submitted-b; Morris *et al.*, 2008). Taken together, these observations have raised new questions about how each segment of the water cycle structures the pathogen population and how the transfer from one compartment to another can affect the population dynamics of this bacterium, especially in surface waters. The ubiquity and diversity of the populations of *P. syringae* in river headwaters around the world (Morris *et al.*, 2010) suggest that *P. syringae* can be transported with rainwater and snowmelt through the soil. Our preliminary experiments with lysimeters in the field have confirmed the actual passage of *P. syringae* through a soil core, thereby prompting us to investigate this phenomenon in greater detail.

Soil is characterized by a set of layers of organic matter and minerals. The thickness and the physical and chemical structure of these layers of organic matter and minerals vary according to geology, topography, climate and vegetation cover. As a complex porous medium, soil is composed of a solid phase (limon, sand and argils) with different grain sizes and porosity, but also includes areas containing air and water. Transport of microbial cells through porous media can be considered as transport of colloids, and therefore the same principles governing the transfer of colloids can be applied to their transport in the soil (Marshall, 1976; Marshall *et al.*, 1971). Various factors influence bacterial adhesion in soil. These factors may be biological or physico-chemical.

Among the biological factors modulating bacterial transport, flagella allow cells to move (Camper *et al.*, 1993), physiology state changes cell physical properties (McEldowney and Fletcher, 1986), and the production of exopolysaccharides increases the viscosity of the bacteria (Rijnaarts *et al.*, 1996; Rijnaarts *et al.*, 1999). However, the primary barriers limiting bacterial transport in porous media are physical and chemical:

these include filtration and the adhesion of bacteria to soil grains. Filtration of micro-organisms is modulated by their shape and size but also by the porosity of the porous medium, the level of water logging and clogging of pores (Stevik *et al.*, 2004). Mechanisms of adhesion process can be described by the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory (theory of colloid stability) for which the interaction between the microbial cell, soil particles and solution, is determined by apolar London–van der Waals forces, electrostatic forces and polar Lewis acid–base forces (Ginn *et al.*, 2002; Lawrence and Hendry, 1996; Van Oss, 1989). All these interactions depend on the ionic strength of the water, the pH, the hydrophobicity of the cells and the speed of flow of suspensions in the medium (Jacobs *et al.*, 2007). The first step for cell attachment to the porous medium implies the phenomenon of attraction / repulsion between the overall charge of the cells (ζ potential) and the porous medium and is the overriding factor that determines the adhesion of bacteria (Gannon *et al.*, 1991; Redman *et al.*, 2004).

We therefore hypothesized that the transfer of *P. syringae* in porous media depends on the ζ potential of its cells. To select candidates for the study of bacterial transport in homogenous porous media, we have characterized the ζ potential of a set of strains according to their phylogenetic context. We then determined the effect of cell surface charge and water conductivity on the rate of transfer. In a second step we have validated the hypothesis of survival and transfer of *P. syringae* through the soil. For this step we collected soil columns in grasslands at three sites in the Southern French Alps and monitored the transfer of indigenous cells of *P. syringae* as well as those of marked strains introduced into the column. Evaluating the potential for transfer of plant pathogens via the soil into river headwaters can lead to a better understanding of the role of soil in diversification and selection of populations of plant pathogens from melting snow or rainfall to surface waters.

MATERIAL & METHODS

Sampling sites and soil columns

Soil columns were collected in three alpine meadows in the Southern French Alps: at Super Sauze (2000 m, 44 ° 20 '57''N, 06 ° 42' 36''E), Col du Lautaret (2100 m,

Table IV-1. Strains of *P. syringae* used in this study

Strain	Clade[a]	HR[b]	INA[c]	AGR[d]	Source	Reference
CC0440	Groupe 2a	+	+	+	Cantaloup	Morris *et al*., 2000
B728a	Groupe 2b	+	+	+	Bean	Hirano *et al.* , 1997
CC94	Groupe 2b	+	+	+	Cantaloup	Morris *et al*., 2000
SZ-030	SZ-030	-	+	-	Water, crops	Morris *et al*., 2000
Cit7	Cit7	+	+	+	Orange	Lindow, 1985
1448a	Groupe 3	+	+	+	Bean	Sarkar and Guttman, 2004
UB-370	UB-370	+	NA	-	Water	Morris *et al*., 2010
USA-032	USA-032	+	+	-	Water	Morris *et al*., 2010
USA-102	USA-102	+	+	+	Water	Morris *et al*., 2010
TA022	TA003	+	+	+	Water	Morris *et al*., 2010
CC1513	Groupe 4	+	NA	-	*Hutchinsia alpina*	Morris *et al*., 2008
DC3000	Groupe 1	+	+	-	Tomato	Cuppels, 1986
CC0663	TA002	-	+	-	*Primula* sp.	Morris *et al*., 2008
TA020	TA020	+	-	NA	Water	Morris *et al*., 2010
TA006	TA006	+	-	NA	Water	Morris *et al*., 2010
CC1524	CC1524	-	-	NA	Water, biofilms	Morris *et al*., 2008
UB-246	UB-246	-	-	NA	Water	Morris *et al*., 2010

NA: non analysed.
[a] Clades according to Morris *et al.* (2010)
[b] Hypersensitive Reaction on tobacco
[c] At least one cell on 10^6 cells was nucleation active at temperatures warmer than -8°C
[d] Agressiveness on cantaloupe

45 ° 02 '09 "N, 06 ° 24' 00" E) and Ceillac (2200 m, 44 ° 38 '06''N, 06 ° 47' 21''E). The first two sites were sampled on 4 April 2011 and the third on 8 April 2011. At the time of sampling, the ground was covered with about 70 – 130 cm of snow that had begun melting. These sampling sites were in meadows that in spring are dominated by grasses, herbs and legumes. Three columns of soil per site (20 cm long and 10 cm in diameter) were sampled using PVC coring tubes. The soil columns were transported in a cooler and kept for four months in the refrigerator until they were used.

Bacterial strains and culture conditions

The reference strains used in this study represented most of the genomic groups of the species *P. syringae* defined by Morris *et al.* (2010) (Table IV-1). Strains were analyzed as aqueous suspension. These suspensions were prepared from 48 h, room temperature cultures on King's medium B (KB) (King *et al.*, 1954) initiated from stock cultures stored in glycerol at -80 °C. Each suspension was prepared with either sterile distilled water or with a sterile $CaCl_2$ solution (pH=7.5). Two concentrations of $CaCl_2$ were tested: 0.06 g L^{-1} or 0.7 g L^{-1}, equivalent to a conductivity of about 100 µS cm^{-1} and 1000 µS cm^{-1}. The bacterial concentrations were adjusted with a

spectrophotometer to 10^7 cells mL^{-1}. For the strains TA-022, spontaneous mutants were isolated on KBC that were resistant to Rifampicin at 200 mg L^{-1}.

Characterization of ζ potential

According to the DLVO theory, interactions between cells and the porous medium strongly depends on the electric charge of bacterial cells under given conditions which is defined by its ζ potential. It is characterized by measuring electrophoretic mobility of a suspension in response to an electric field. The ζ potential of each strain for each concentration of $CaCl_2$ was determined for suspensions of 10^7 CFU mL^{-1} according to the theory of Smoluchowski (Elimelech *et al.*, 2000). Each measurement was performed with a Zetasizer Nano (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Several measurements were performed per strain and per condition.

Estimation of *P. syringae* transport in porous media

The transport of *P. syringae* in porous media was estimated by measuring the relative effluent concentration of a pure strain continuously injected in saturated Plexiglas columns (L = 15 cm, diameter 5 cm) filled with a homogeneous medium (sterilized Fontainebleau sand, properties given in Table IV-2). For each strain, the measurement was made in three columns at each of three independent dates. Each column was sterilized with alcohol, filled with 480 g of cleaned sand that was autoclaved twice at 125°C for 45 minutes at 1 bar pressure and then dried at 105°C for 24 hours. The columns were first rinsed and saturated with a sterile solution of 0.06 g L^{-1} or 0.7 g L^{-1} $CaCl_2$; and then a bacterial suspension at 10^7 CFU mL^{-1} was injected for 30 minutes at 0.6 ml min^{-1}. After injection of the bacterial suspension, the $CaCl_2$ solution at the concentration used for the initial rinse was injected for 13.5 h at the same flow rate as for the bacterial suspension. Leachates were collected in sterile bottles at the bottom of the column. Concentrations of *P. syringae* were determined in the inoculum prior to injection (C_0), in the inoculum at the end of the 14 h injection and leaching period (C), in the solution containing sterile sand and solution (as negative control), and in the leachates. The rate of transfer of *P. syringae* was the ratio beween C and C_0 corrected by the recovery volume to determine the transfer rate and the multiplication rate of the inoculum.The absence of contamination due to the equipment

Table IV-2. Characteristics if the porous media

Characteristics	Fontainebleau sand
Grain diameter (µm)	230-310
Manufacturer	Merck
Column volume (cm^3)	294.5
Dry solid mass (g)	480
Density (g/cm^3)	2.65
Column density (g/cm^3)	1.61
Porosity	0.393
Pore volume (cm^3)	117.3
Pump flow (mL/min)	0.6
γ^{LW} (mJ / m^2)[a]	24.9
ζ potential (mV)	to be determined
0.06 g/L $CaCl_2$	
0.7 g/L $CaCl_2$	

[a] Lifshitz–van der Walls componant implied in the DLVO theory

used was also verified. Methods for quantification of bacterial populations are described below.

The transport of *P. syringae* and total culturable bacteria naturally occurring in snow cover was also estimated through the same device. A sample of snow (5kg of the 10 cm layer in direct contact with the ground) was collected at the Ceillac site on 8 April 2011 with sterile bags and tools. It was melted at room temperature overnight and stored at 4°C until processing. The columns were prepared and saturated with water from melting snow. The percolation was performed under the same conditions as described above and the size of the populations of total bacteria and culturable *P. syringae* was determined in the melted snow and leachates as indicated above. Methods for quantification of bacterial populations are described below.

Estimation of *P. syringae* transport through unperturbed soil columns

Transport of *P. syringae* through the soil columns collected in the Southern French Alps was determined by simulating a rain fall containing 10^8 CFU L^{-1} of sterile water of a mutant line of strain TA-022 naturally resistant to rifamycin (referred to here as TA-022-rif). Rain was simulated at a rate of 20 mm h^{-1} for 90 min to

obtain minimum of 400 mL of effluent from each column. Once percolation of water finished, bacterial concentration was determined in the effluent (C) and compared to that o the inoculums (C_0) to determine the relative bacterial effluent concentration (C/C_0). This ratio was corrected by the recovery volume and the multiplication to determine the transfer rate.

Before inoculation of the cores with strain TA-022-rif, the size of indigenous populations of *P. syringae* that could be leached from the soil core was evaluated by saturating the column and by simulating a rainfall using sterile distilled water at the same rate as indicated above. Once the flow ended, the leachates were immediately processed to determine the bacterial concentrations.

Quantification of *P. syringae* and total bacterial populations

Treatment of samples depended on their nature. The size of bacterial populations in the snow and leachates obtained from soil columns was determined by concentrating the liquid by a factor of 200 via filtration across sterile nitrocellulose membranes (0.22 µm pore diameter) and dilution plating on general media (10% tryptone soja agar) and selective media (KBC of Mohan and Schaad (1987) or KB containing 200 mg L^{-1} of rifamycin) as described previously (Monteil *et al.*, submitted-b). The detection limit was 55 CFU L^{-1} for total bacteria and 5 CFU L^{-1} for *P. syringae*. The bacterial concentrations of the pure strain inocula and those of the percolation columns of sand were determined by dilution plating on KB medium. After inoculation, all media were kept at room temperature and colonies were counted after 48 and 96 hours of incubation. To verify the identity of *P. syringae*-like colonies, a minimum of 30 fluorescent colonies per treatment were checked for the absence of cytochrome C oxidase as described by Morris *et al.* (2008).

RESULTS

The rate of transfer of *P. syringae* in porous media depends on the strain and the ionic strength of the solution, but is not related to the ζ potential

The zeta potential of the 17 strains characterized here were measured in a solution of 100 µS cm^{-1}. They were all negative, ranged from -27 mV to -11 mV (Table IV-3) and did not depend on the phylogenetic situation of the strain. We validated with some strains that the ζ potential depended directly on the ionic strength of the solution in which suspensions were made, and decreased with increasing conductivity (Figure IV-1) as shown for many bacteria (Rijnaarts *et al.*, 1999). Furthermore, we observed a great variability within a pure culture for a same strain for which high standard deviations were observed. These observations should be explored by more complete statistical analyses.

Table IV-3. Interspecific variability of ζ potential for *P. syringae* species
The ζ potential of 17 reference strains was determined in a solution having a conductivity of 100 µS cm^{-1}.

	ζ potential (mV)		
Strain	Mean	SD	SE
CC0440	-14.96	8.77	2.26
B728a	-10.81	5.44	1.41
CC94	-18.32	7.15	1.85
SZ-030	-24.16	5.41	1.40
Cit7	-16.08	5.70	1.47
1448a	-21.42	7.30	1.89
UB-370	-18.40	6.08	1.57
USA-032	-10.69	8.67	2.24
USA-102	-18.18	7.84	2.02
TA022	-19.50	7.65	1.97
CC1513	-21.76	5.54	1.43
DC3000	-23.58	6.73	1.74
CC0663	-18.18	4.77	1.23
TA020	-26.02	5.57	1.44
TA006	-24.34	4.93	1.27
CC1524	-26.76	5.50	1.42
UB-246	-23.54	5.94	1.53

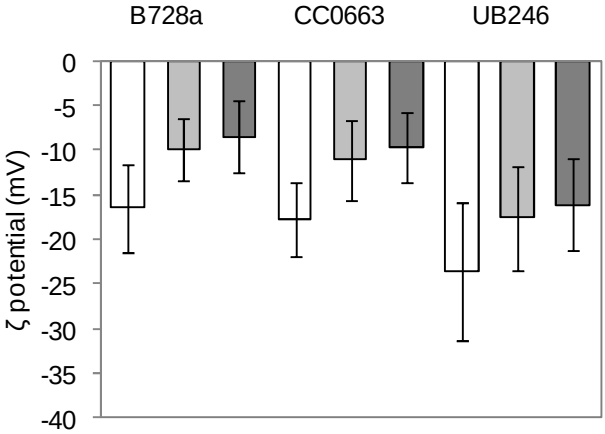


Figure IV-1. Variability of the ζ potential for three strains of *P. syringae* at three levels of conductivity (100 (white), 600 (grey) and 1200 (dark grey) µS cm^{-1})
The error bars indicate the standard deviation calculated by the machine used to measure these potentials.

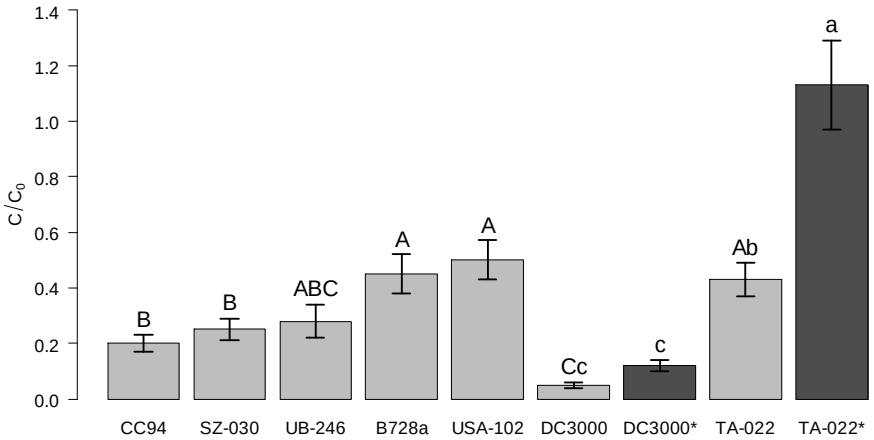


Figure IV-2. Relative effluent concentration of *P. syringae* across columns of Fontainebleau
Transfer rate (C/C_0) was calculated as the ratio of the number of bacteria injected into the column and those collected in the effluent. This was correlated by the multiplication and survival rate in the bacterial suspension over the course of the experiment. For each concentration of $CaCl_2$ (100 µS cm^{-1} (ligh grey), 1000 µS cm^{-1} (dark grey)), means associated with the same letter are not significantly different ($p < 0.05$) according to Student's test. Errors bars correspond to standard error.

The transfer of *P. syringae* in porous media in a solution of 100 µS cm^{-1} was estimated for seven strains (CC94, SZ-30, UB-246, B728a, USA102, DC3000 and TA022) that were chosen to represent the full range of ζ potentials characterized here. There were significantly different transfer rates among strains (Student's t test, $p < 0.05$) (Figure IV-2). For example, only 5% of the injected population of DC3000 leached through the columns of sand whereas for B728a, USA102 and TA022 this rate was

nearly 40%. These rates were not correlated with the average ζ potential of the strains (Pearson's correlation, $p > 0.05$), and no trend was observed concerning the relation with the phenotype of strains (HR, INA or AGR, Table IV-1). Surprisingly, when the ionic strength of the solution used for preparing the bacterial suspension was increased by a factor of 10, which thereby led to a decrease in the ζ potential of the bacteria (Figure IV-1), the transfer rate doubled, and most remarkably for strain TA002 (Figure IV-2).

The rate of transfer of populations of *P. syringae* across a porous medium is greater than that of total snowpack bacteria

The relative rates of transfer of *P. syringae* and the associated bacterial microflora in snowpack were estimated by passing melted snow across sand columns. In the melted snow used for this experiment, naturally occurring total bacterial and *P syringae* concentrations were 3.2×10^7 and 5.9×10^4 CFU L^{-1}, respectively. The transfer rates were nearly 7 times greater for *P. syringae* cells (78.7%) than for total bacterial cells (15.5%), and this difference was significant (Mann-Whitney U test, $p = 0.08$).

The rate of transfer of *P. syringae* through soil columns is of the same order of magnitude as the rate observed for sand columns

A mutant line of strain TA022 (TA022-rif) was selected for resistance to 200 ml L^{-1} of rifamycin. This antibiotic was chosen as a marker because the rate of occurrence of indigenous rifampicin-resistant lines of bacteria leaching from the soil columns was below the detection threshold for the microbiological analyses used in this study. We used distilled water (conductivity of 0 μS cm^{-1}) to introduce its population at the soil core surface. Strain TA022-rif was systematically detected in the leachates, and the size of the leaching populations represented 9% to 14% of the population introduced into the column (Figure IV-3). There was no significant effect of the origin of the soil core on the rate of leaching. Likewise, there was no significant effect of the origin of the soil core on the total number of bacteria in the leachates, which was on average 10^9 CFU L^{-1} (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$).

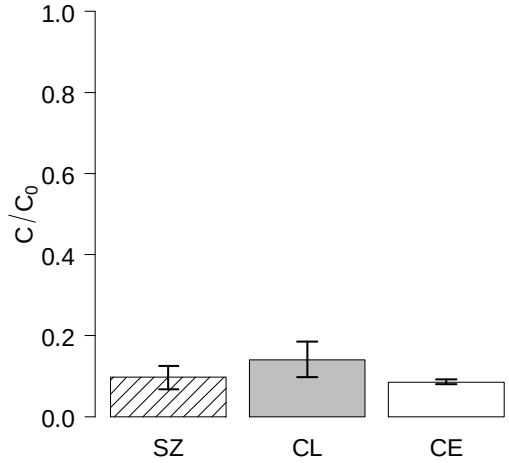


Figure IV-3. Relative effluent concentration of strains TA-022-rif of *P. syringae* across columns of soil collected in the Southern French Alps
The transfer rate (C/C_0) was calculated as described in Figure IV-2. There was no significant differences in mean transfer rates due to the site of origin of the column (Kruskall-Wallis, $p < 0.05$). SZ, CL and CE correspond to columns of Super Sauze, Col du Lautaret and Ceillac. Errror bars correspond to standard errors.

The soil is a potential reservoir of *P. syringae* allowing survival under cold conditions for at least several months

The soil cores collected in the Southern Alps had weights about 2.3 - 2.5 kg at the time of sampling which were affected by the site (Kruskall-Wallis test, p = 0.05)(Table IV-4). During the initial saturation and washing of these columns with sterile water, the columns from the Celliac site retained three times more water than the other columns, indicating that they were drier (Table IV-4). In the leachate collected from these columns before introduction of strain TA002-rif, total bacteria were detected from all columns at ca. 10^9 CFU L^{-1} of leachate. Naturally-occurring *P. syringae* was detected in 7 of the 9 columns at concentrations of 225 to 5.4×10^4 CFU L^{-1} (Table IV-5). In the columns where *P. syringae* was not detected, there were numerous tunnels from the passage of worms and the columns had a strong anoxic odor most likely from the degradation of worms or other invertebrates.

Table IV-4. Characteristics of soil columns collected in the Southern French Alps

		Soil columns									p-value (Effect of site according to Kruskall Wallis sum rank test)
		Super Sauze			Col du Lautaret			Ceillac			
Experiment	Characteristics	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Soil columns washing	Soil mass before rain simulation (g)	2376	2374	2274	2513	2540	2522	2356	2497	2502	0.051
	Soil mass after rain simulation (g)	2401	2403	2318	2537	2558	2541	2429	2580	2584	0.061
	Volume of water retained (mL)	25	29	44	23	18	19	73	83	83	0.027
	Mass of percolated water (g)	418	413	393	430	428	432	480	462	482	0.027
	Total volume of water injected (mL)	443	442	437	453	445	450	553	546	564	0.027
	Injection time (min)	90	90	90	90	90	90	110	110	112	0.021
	Flow (ml/mn)	4.92	4.91	4.86	5.03	4.95	5.00	5.03	4.96	5.04	0.055
	Comments	None. No active vegetation	None. No active vegetation	None. No active vegetation	Active worms. Numerous tunnels at the surface. Some vegetation.	Emission of gazes testifying anoxic conditions. No active vegetation	Active worms. Numerous tunnels at the surface. Some vegetation.	None. No active vegetation	No active vegetation Myceliums at the surface	No active vegetation Myceliums at the surface	
Transport of TA-22 strain through soil columns	Soil mass after rain simulation and injection of bacterial suspension (g)	2413	2412	2331	2526	2561	2543	2460	2609	2604	0.061
	Volume of water retained (mL)	12	10	14	-11	4	2	30	29	20	0.027
	Mass of percolated water (g)	461	449	442	410	430	416	409	431	417	0.066
	Total volume of water injected (mL)	465	463	465	457	458	449	477	480	455	0.191

Table IV-5. Sizes of the indigenous populations of *P. syringae* and total bacteria leached from soil cores collected in Southern French Alps

		Population sizes log (CFU L^{-1})	
Site	Column	Total bacteria	*P. syringae* [a]
Super Sauze	1	9.14	2.97
	2	9.15	2.78
	3	9.58	4.73
Col du Lautaret	1	8.70	3.05
	2	8.49	bdt
	3	8.81	1.99
Ceillac	1	9.25	bdt
	2	8.90	2.35
	3	9.12	3.50

[a] bdt : below the detection treshold

DISCUSSION

Transport of plant pathogens through the soil and its role in selection of strains has never been assessed. Recently, observations suggested that *P. syringae,* which follows water fluxes from the atmosphere to headwaters, may be transported through the soil by snowmelt and rain (Monteil *et al.*, submitted-b; Monteil *et al.*, in preparation; Morris *et al.*, 2010). Here we have shown that *P. syringae* can be readily transferred through porous media simulating soil. The rate of transfer across the medium used here varied among strains and the capacity for transfer could not be predicted from the surface charge of the cells measured in terms of their ζ potential. Furthermore, and even more surprisingly, the rate of transfer increased with ionic strength of the solution that was the vector for transport. These observations are the opposite of what would be predicted from the existing literature on bacterial and colloid transfer through porous media. According to DLVO theory, the transfer rate of a colloid is expected to decrease as the ζ potential approaches 0 mV (Elimelech *et al.*, 2000). In addition, increasing the ionic strength of a solution, both for monovalent than divalent electrolytes, should promote the retention of bacteria in a porous medium (Kim *et al.*, 2009a; Redman *et al.*, 2004; Rijnaarts *et al.*, 1999). However, the ionic strengths of the solutions used in previous studies of bacterial transfer in porous media were 10 to 1000 times more concentrated than the solutions we used here and were not always of the

same chemical composition (especially in terms of NaCl) (Kim *et al.*, 2009a; Won *et al.*, 2007). We used $CaCl_2$ solutions of ionic strength representative of the pristine surface waters in the Southern Alps where we have detected *P. syringae* (Monteil *et al.*, in preparation; Morris *et al.*, 2010), i.e. in the range of 100 – 1000 μS cm^{-1}. At these relatively low ionic strengths perhaps other cell surface properties, such as hydrophilicity or traits engendered by the production of exopolysaccharides or lipopolysaccharides, that were not measured here might have an overriding effect on transfer. It has been shown that these materials are responsible for steric interactions between the surface of microorganisms and those of the particles of the solid phase through which the bacteria are transported (Jacobs *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Rijnaarts *et al.*, 1999; Williams and Fletcher, 1996). This study could be re-enforced by the caracterisation of such traits.

We have also shown that *P. syringae* has a greater rate of transfer through the soil than the rest of the bacterial population associated with snow. Rates of transport of *P. syringae* in freshly melted snow were seven times greater than for the rest of the microbial community in the snowmelt. It is possible that the physical (ζ potential, hydrophobicity) and biological properties (motility, production of EPS and LPS) of *P. syringae* allow better transfer in porous media than for other bacteria globally. On the other hand, it has recently been shown that the combination of several bacterial species influenced transfer rates either positively or negatively (Stumpp *et al.*, 2011). This suggests that interactions of *P. syringae* with the total microflora may affect the transfer rate by preventing its adsorption to the grains of the medium. This suggests that the relatively small population size of *P. syringae* might offer an interesting advantage for passage through the soil. It also re-enforces the notion that *P. syringae* is relatively well-adapted to following the passage of water through the soil from snowmelt to rivers, trend suggested by Monteil *et al.* (in preparation).

By using an antibiotic-resistant strain of *P. syringae*, we have illustrated that the behavior of this bacterium in the model porous medium is similar to that in real soil cores. Overall, there was little variability in the transfer rate of *P. syringae* among the soil cores as a function of the site from which they were obtained. However, two cores that had abundant burrows and tunnels dug by worms yielded results that lead us to suspect that the physical and chemical properties resulting from the presence of worms

enhanced the passage of bacteria through these cores. Firstly, the transfer rate of the antibiotic-resistant strain for one of these cores was the highest among all the cores, at about 25%. Secondly, these cores harbored the lowest abundances of indigenous *P. syringae* populations. The burrows might have enhanced the porosity of the cores thereby facilitating transfer (Abu-Ashour *et al.*, 1994). In addition, the anoxic conditions of these cores due to degrading worms or other invertebrates were likely detrimental to indigenous *P. syringae* which is a strict aerobe.

By using real soil cores we have also demonstrated that during a simulated winter period with no flow of liquid water through the cores (as simulated during the 4 months storage period in a cold chamber), a certain fraction of the *P. syringae* population in these soils survives and is readily leached as soon as water flow begins. Furthermore, the concentrations of *P. syringae* that we detected in the leachate from these cores corresponded to that frequently observed in pristine mountain waters including the sites where these cores were sampled, between 10^2 and 10^5 CFU L^{-1} (Morris *et al.*, 2010). These results open questions about which part of the core harbors the populations of *P. syringae* that are leached. It would be possible to cut the cores into sections in order to determine if the populations were maintained in the upper surface and in particular the litter – which contains a very large and diverse population of *P. syringae* that survives over the winter (Monteil *et al.*, submitted-b), or if they extend throughout the core. By understanding the specific origin of the populations that leach through soil and the residence times in various compartments between precipitation and river flow, we will be able to estimate the impact on alpine prairies and their geological context on the microflora in river waters and eventually in the irrigation waters to which they contribute.

IV.3. Synthèse

Ces recherches se sont basées sur la mise en évidence d'un transfert effectif de *P. syringae* à travers des lysimètres du projet Bio-CATCH présentées précédemment et avaient pour objectif global de caractériser le transport de la bactérie en milieux poreux sous différentes conditions. Grâce à la mise en place du dispositif avec les colonnes de sable de Fontainebleau, nous avons pu infirmer notre première hypothèse et montrer qu'il y a une variabilité interspécifique autant au niveau des propriétés physiques des bactéries qu'au niveau des taux de transfert. Par conséquent, le sol pourrait filtrer certains types de souches. Malgré cela, nous ne sommes pas encore en mesure de donner un trait qui puisse expliquer ces différences de transport. Nous nous étions basé sur le potentiel ζ, or il n'existe pas de corrélation avec le transport de *P. syringae* comme prédit par la théorie. D'autre part nous avons obtenu l'inverse des observations attendues en ce qui concerne l'effet de l'augmentation de la force ionique, qui dans notre études, tend à faciliter le transport de *P. syringae* dans les colonnes de sable. L'injection un échantillon de neige fondue à travers le même dispositif, suggèrent que les comportements que nous observions n'étaient pas généralisables à toutes les espèces microbiennes. Cependant, cette observation n'est le fruit que d'une seule expérience et devrait être renouvelée.

Nous avons également en perspective (i) de compléter ces recherches avec la caractérisation d'autres souches afin de jouir d'un pouvoir prédictif plus important et (ii) de caractériser d'autres propriétés comme l'hydrophobicité et la production d'EPS. D'autre part, la caractérisation du potentiel ζ a également montré une importante hétérogénéité des populations au sein d'une culture (données non montrées) observées par d'autres études dont il sera intéressant d'identifier le rôle dans le succès de dissémination de l'espèce (Jacobs *et al.*, 2007; van der Mei and Busscher, 2001).

Ces recherches avaient également pour objectif de comparer ce que nous pouvions observer avec un milieu poreux simple et sans interactions avec une microflore, avec le comportement de rétention à travers un sol réel. Notre hypothèse était que le transport de *P. syringae* observé avec les colonnes de sables serait prédictif de ce qu'il pourrait se produire dans un sol réel. Malgré des différences d'un facteur de 2 à 3 suivant le site de prélèvement des colonnes, nous avons pu observer des taux de

même ordre de grandeur avec la souche inoculée, la différence pouvant être à d'autres composants come la fraction d'argiles, de matière organique ou la flore existante. Cependant, cette expérience devrait être répliquée sur d'autres souches pour attester de ce comportement pour l'ensemble de l'espèce de *P. syringae*.

Grâce à ce même dispositif nous avons obtenu un résultat inattendu et original en ce qui concerne la survie de *P. syringae* dans un tel milieu. L'inoculation des colonnes de sol s'est faite plusieurs mois après leur prélèvement. En attendant les colonnes de sol étaient maintenues à 4°C. Une telle température est caractéristique des conditions de températures que peut présenter un sol en milieu alpin dans les saisons froides. Ici, nous avons montré que *P. syringae* pouvait survivre, être compétitive face aux spécialistes et saprophytes du sol, et cela, pendant plusieurs mois. Le sol n'est donc pas un environnement si délétère pour *P. syringae* que ce qu'il était perçu avant.

Dans l'objectif global de la thèse, ces recherches ont permis :

- d'estimer les différences de transport en milieu poreux au sein de l'espèce *P. syringae*
- de montrer des différences de transport en fonction de la conductivité de l'eau
- de mettre en évidence une survie de plusieurs mois dans le sol

SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

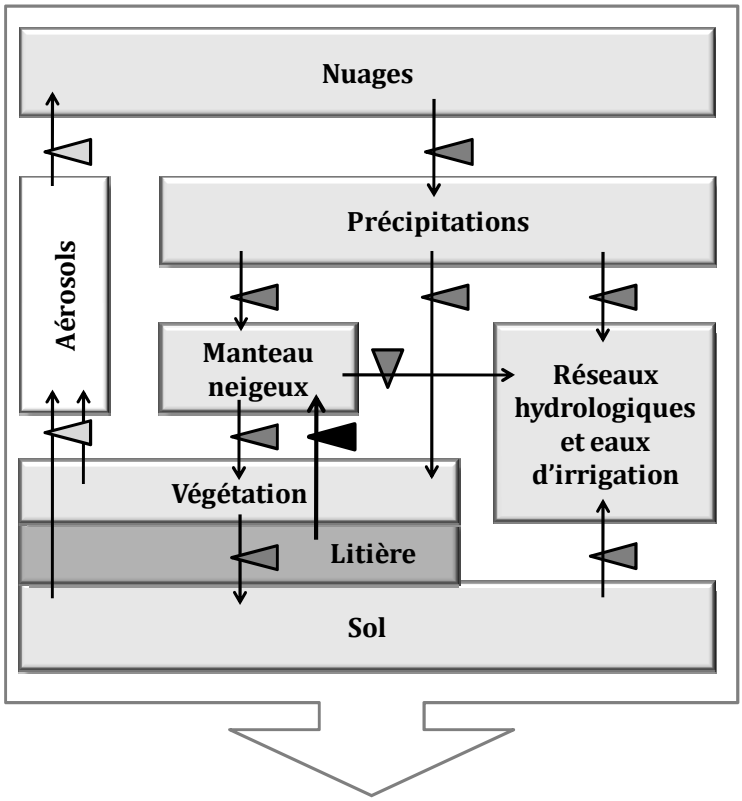
La prédiction de l'émergence et la réémergence des maladies provoquées par les agents phytopathogènes reste encore un défi majeur en santé des plantes. Un nouveau courant de pensées a vu le jour ces dernières années et s'oriente sur la caractérisation de la dynamique des populations des agents phytopathogènes en étendant les paradigmes d'histoire de vie en dehors du contexte agricole (Morris *et al.*, 2009). À ce jour, *P. syringae* est l'agent phytopathogène dont on connaît le mieux l'histoire de vie, étroitement lié au cycle de l'eau (Morris *et al.*, 2008). Prédire la dynamique des populations pathogènes le long de ce cycle nécessite un outil de modélisation. Cependant, les connaissances actuelles sur la dynamiques des populations dans chacun des compartiments du cycle de l'eau et celles sur les facteurs et les processus qui peuvent sélectionner certaines souches pathogènes, ne permettent pas de modéliser directement. C'est pourquoi ce manuscrit a essayé d'approfondir les connaissances sur l'écologie de *P. syringae* à l'échelle d'un bassin versant. Nous avons donc choisi de nous intéresser à différents compartiments et transferts afin d'identifier les processus réellement pertinents à considérer à menant études de terrain couplées à des simulations en laboratoire. Nous avons adopté une approche pluridisciplinaire mêlant écologie microbienne, climatologie et hydrogéologie, pour caractériser la dynamique des populations de *P. syringae* à l'échelle d'un bassin des précipitations jusqu'aux réseaux hydrologiques.

I. De nouveaux environnements liés à l'écologie de *P. syringae*

L'ensemble des recherches qui ont été menées durant ces trois années ont mis en évidence de nouveaux environnements[20] dont le rôle dans l'histoire de vie de *P. syringae* était jusqu'ici insoupçonné. Nous avions basé nos hypothèses sur un modèle général de ce que nous pensions être les différents environnements et transferts impliqués dans la dissémination de *P. syringae* (Figure 1). Aujourd'hui, nous avons élargi la vision de cycle avec la mise en évidence des populations résidentes dans la litière des

[20] Par « nouveaux environnements, nous voulons dire « nouvellement pris en considération » dans la compréhension de l'écologie de *P. syringae* et non pas nouveaux dans l'histoire de vie vécue par l'espèce.

prairies alpines, le transport effectif de *P. syringae* à travers le sol et l'émigration des populations de la litière vers le manteau neigeux (Figure 1 modifiée ci-dessous).



Prédire la taille des populations dans les eaux d'irrigations d'un bassin versant

I.1. Mise en évidence des populations résidentes de la litière

Lors de la caractérisation de la mise en place des populations de *P. syringae* dans le manteau neigeux, nous nous attendions à ce que ces populations soient issues principalement des précipitations étant donné le pouvoir glaçogène de *P. syringae* et son occurrence dans les précipitations (Lindow, 1983; Möhler *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2008). Au lieu de cela, nous n'avons que très peu détecté la bactérie dans les chutes de neiges alors que le manteau neigeux hébergeait d'importantes tailles de populations, suivant un gradient décroissant des premiers centimètres en contact avec le sol vers la surface. Nous avons donc supposé que ces populations provenaient de la litière. Au regard de ce que nous connaissions de l'écologie de *P. syringae* avant ces recherches, nous n'aurions pas formulé une hypothèse au tour de la litière. En effet, *P. syringae* est une bactérie épiphyte dont le métabolisme est spécialisé et restreint par rapport à d'autres bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P. fluorescens* ou *P. putida* qui

sont plutôt inféodés au sol (Mithani *et al.*, 2011) ou vivent en association avec des matières en voie de dégradation. De plus, la microflore résidente de la litière en milieu alpin est très abondante et la diversité importante où les γ-Proteobacteria sont plutôt minoritaires (Zinger *et al.*, 2009). Or, nous avons mis en évidence des tailles de populations en hiver comme en été de l'ordre de 10^8 bactérie m^{-2} de prairie (entre 10^3 et 10^7 bactéries g^{-1} de matériel végétal) ce qui correspond aux tailles des populations observées sur la phyllosphère. De plus, leur structure était composée de toutes les gammes de phénotypes possibles du pouvoir pathogène que nous avons caractérisé dans nos recherches de *P. syringae*.

De telles observations soulèvent de nouvelles questions sur le rôle de la litière dans la diversification de *P. syringae* mais également en tant que source d'inoculum en dehors du milieu alpin. En effet, certaines études ont déjà évalué le risque associé à l'enfouissement des débris végétaux infectés dans la diffusion des maladies provoquées par *P. syringae* (Kritzman and Zutra, 1983; van Overbeek *et al.*, 2010). Mais le rôle de la litière et des simples étendues d'herbes bordant les cultures n'a jamais été suspecté comme étant source de propagules, ou comme frein à la dispersion de la maladie.

I.2. La survie de *P. syringae* dans le sol

La grande majorité des études qui se sont intéressées à la survie de *P. syringae* dans le sol sont toutes allées vers la même conclusion : *P. syringae* survie très peu dans le sol (Hollaway *et al.*, 2007; Kritzman and Zutra, 1983; McCarter *et al.*, 1983; Riffaud and Morris, 2002). Or les chapitres III et IV montrent que non seulement *P. syringae* peut être transportée par l'eau sur plusieurs cm de sol, mais que dans certaines conditions d'humidité et de température, elle peut y survivre plusieurs mois. Cette composante est tout à fait nouvelle dans l'histoire de vie de *P. syringae*. Elle a été également validée en parallèle par des Reynolds and Ringelberg (2008) qui ont détecté pendant plusieurs semaines, les populations qu'ils avaient inoculées dans le sol enneigé.

Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées par rapport à ces résultats contradictoires avec la majorité de la littérature. La plus plausible est celle selon laquelle la survie de *P. syringae* est fortement liée à la nature et à la structure du sol, ainsi qu'aux conditions de températures et d'humidité. Les sols des prairies alpines sont très peu altérés, très aérés, présentent de nombreux agrégats et une forte teneur en matière organique (Annexe 6). En altitude la température est plus froide qu'en plaine et les sols

sous la neige bénéficient de forts apports en eau. Ces conditions sont à l'opposé de celles des sols analysés dans les autres études, où le sol est déstructuré, peu humide et ou la couche de matière organique est absente. L'observation de faibles concentrations bactériennes dans les effluents des colonnes de sol du projet Bio-CATCH iraient dans ce sens, puisque les colonnes de sol ont fait face à une longue période de sécheresse avant l'évènement de pluie et ne présentaient donc pas une forte humidité. Ces résultats ont donné naissances à un nouveau projet de recherche concernant l'eau des nappes dans les zones d'irrigation, conduisant à la détection de *P. syringae* à plusieurs reprises (travail d'Odile Berge de notre équipe).

II. Les dynamiques des populations de *P. syringae* au cours du cycle de l'eau

P. syringae est omniprésente dans plusieurs substrats associés au cycle de l'eau (Morris *et al.*, 2010; 2008). Cependant, aucun des processus régissant sa dynamique et ses transferts entre ces substrats n'ont été décrits auparavant. Ici, nous avons pour la première fois mis en évidence la dynamique des populations dans plusieurs compartiments du cycle de l'eau comme les précipitations, le manteau neige, la litière, l'eau et le sol, et nous avons élucidé certains processus et facteurs impactant sur cette dynamique à l'échelle d'un bassin versant.

II.1. La déposition de *P. syringae* par les précipitations dans le bassin versant

Déterminer les conditions propices à la dissémination des agents phytopathogènes dans l'atmosphère est prépondérant dans le contrôle et la prévention des maladies. Jusqu'ici aucune étude ne s'était intéressée au transport et à la déposition d'une bactérie phytopathogène par les précipitations. À travers le chapitre II nous avons pu non seulement estimer la fréquence d'arrivée de *P. syringae* dans les chutes de neige (12%) et de pluie (65%), mais nous avons également mis en évidence plusieurs facteurs climatiques et chimiques liés à sa présence. Le modèle HYSPLIT avait déjà été utilisé pour étudier le transport longue-distance de plusieurs champignons phytopathogènes. Mais notre manière d'exploiter les données qu'il génère est tout à fait nouvelle. Ainsi, le couplage des analyses microbiologiques et des paramètres climatiques associés aux masses d'air, a permis de mettre en lumière le

lien étroit entre la température et les flux radiatifs, avec la présence de *P. syringae* dans les précipitations. Ces conditions s'avèrent également être celles nécessaires à son émission dans l'atmosphère (Lighthart, 1999). De plus, nous avons pu associer une probabilité de déposition de la bactérie en fonction de l'origine des masses d'air (la plus faible étant pour les masses d'air venant du nord).

Au regard de nos résultats, même si *P. syringae* est significativement moins fréquemment apportée par la neige que par la pluie, il semble que les deux précipitations soient égales en termes de flux entrants dans le bassin versant, grâce aux abondances significativement plus importantes dans la neige. Néanmoins les analyses préliminaires sur la diversité de *P. syringae* suggèrent qu'elles pourraient sélectionner des souches différentes. Par contre, comparé aux populations se trouvant déjà à la surface de la Terre, les précipitations semblent représenter un vecteur de diversité plus qu'un important flux quantitatif de bactéries.

II.2. Le manteau neigeux : réservoir et protecteur des populations résidentes de la phyllosphère et de la litière en milieu alpin

Dans les moyennes et hautes latitudes, la fonte du manteau neigeux saisonnier est le majeur participant à l'alimentation des eaux de surface et donc à l'irrigation (Edwards *et al.*, 2007). *P. syringae* ayant été détectée dans cet environnement, il paraissait pertinent de déterminer la dynamique des populations dans cet environnement. Au regard de nos résultats, les populations de *P. syringae* se mettent très vite en place avec le brassage de des premières chutes de neige en contact avec la litière et par l'émigration des populations de la litière vers le manteau neigeux (concentrations autour de 10^3 CFU L^{-1}). Cette structure reste stable tout l'hiver jusqu'à la fonte. Peu d'études se sont intéressées aux communautés de la neige saisonnière, surtout en ce qui concerne les microorganismes non psychrophiles. Elles se sont plutôt intéressé à l'activité microbienne sous la neige et à son rôle dans les cycles biogéochimiques (Lipson *et al.*, 1999; Monson *et al.*, 2006; Schmidt and Lipson, 2004; Williams *et al.*, 2009a). Suite à la mise en évidence des populations résidentes sur la litière au cours de nos recherches, nous nous sommes aperçu que ce n'était pas tant le rôle de réservoir du manteau neigeux qui était important dans l'histoire de vie de *P. syringae*, mais plus ses propriétés isolantes qui permettent aux populations sous la neige de survivre aux conditions extrêmes d'humidité et de température en hiver.

II.3. L'impact du transport bactérien dans le sol en milieu alpin

La mise en évidence de la survie et du transport de *P. syringae* à travers le sol est un des résultats majeurs de ces travaux de recherche. L'ubiquité de la bactérie dans les eaux de sources et la stabilité des populations au cours du temps étaient des indices forts en faveur de cette hypothèse. Bien que *P. syringae* ait déjà été détectée dans les aérosols et les biofilms épilithes (Lindemann *et al.*, 1982; Morris *et al.*, 2007), il était peu probable que la taille des populations observées dans l'eau (jusqu'à 10^5 CFU L^{-1}) ne soient que le fruit d'une contamination par ces environnements. Les percolas des lysimètres du projet Bio-CATCH ont confirmé que *P. syringae* pouvait être transportée à travers le sol, ce qui a donné naissance à une étude plus approfondie sur ce processus.

Le dispositif de colonnes de sable mis en place dans le laboratoire a permis de montrer que le comportement de rétention de *P. syringae* pouvait varier d'un facteur de 5 d'une souche à l'autre et que ces différences n'étaient pas prédictibles avec les propriétés électriques des bactéries, contrairement à ce qui était prévu par la théorie. En effet, il semble que d'autres traits de vie régissent le transport de *P. syringae* en milieu poreux. L'ensemble de ces tests suggèrent donc que toutes les souches n'ont pas toutes le même succès potentiel de se disséminer à travers le sol. Mais pour l'instant il est difficile de généraliser car nous n'avons pas encore évalué la variabilité du transport entre souches du même clade. De manière surprenante, l'injection d'un échantillon de neige fondue dans les mêmes colonnes de sable a mis en évidence des différences de taux de transfert entre *P. syringae* et les bactéries totales suggérant que dans sa globalité, l'espèce se transporte mieux que les autres espèces bactériennes. Quant aux colonnes de sol prélevées dans les prairies alpines, elles ont permis d'estimer un taux de passage de *P. syringae* dans le sol (entre 9 et 14%) qui n'était pas significativement différent suivant le site.

II.4. La chimie de l'eau comme marqueur de la dynamique des populations de *P. syringae* dans les cours d'eau

Déterminer la taille des populations de *P. syringae* libérées par les rivières au cours du temps et identifier les processus et les facteurs impactant sur ce flux, sont des défis majeurs pour prédire les situations où l'irrigation comporte un risque pour les cultures et pour comprendre sa dissémination de manière générale. *P.*

syringae avait déjà été détectée dans les sources de plusieurs cours d'eau alpins à travers le monde dans des concentrations pouvant varier d'un facteur de 10^3 (Morris *et al.*, 2010). Cependant, les données ne nous permettaient pas de conclure sur la dynamique des populations au cours du temps et sur les facteurs ayant un impact sur cette dynamique. Plusieurs cours d'eau du bassin versant de la Haute Durance ont donc été suivis au printemps et en été d'un point de vue de leur chimie et de leur microbiologie. Ainsi pour la première fois nous avons mis en évidence la libération continue de *P. syringae* au cours du temps dont la taille des populations était liée à celle des bactéries totales (R^2=0.77). Le deuxième résultat important est que nous avons pu associer les concentrations bactériennes à une qualité chimique de l'eau particulière. La conductivité électrique, et tout spécialement les concentrations relatives de deux anions majoritaires (les sulfates et les bicarbonates) et du cation Mg^{2+}, étaient prédictifs de la taille des populations de *P. syringae* et des bactéries totales. Or la chimie de l'eau est associée à la dynamique des flux d'eau dans un contexte géologique, hydrologique et climatique donnée. En définissant l'ensemble de l'histoire de l'eau dans ce contexte pourrait alors nous permettre de prédire la taille des populations associée à un cours d'eau donné à une saison donnée.

III. Vers un modèle des flux de *P. syringae* dans un bassin versant : des habitats naturels vers les agro-systèmes

Les recherches développées dans le bassin versant de la Durance ont permis de mieux connaître les processus impliqués dans la dissémination de *P. syringae* à l'échelle d'un bassin versant en milieu alpin. À travers les données qui ont été acquises sur différents transferts et dynamiques des populations dans plusieurs compartiments du cycle de l'eau, nous sommes en mesure de proposer un modèle comme base de travail pour la prédiction des flux de *P. syringae* dans les eaux de surface (Figure 2).

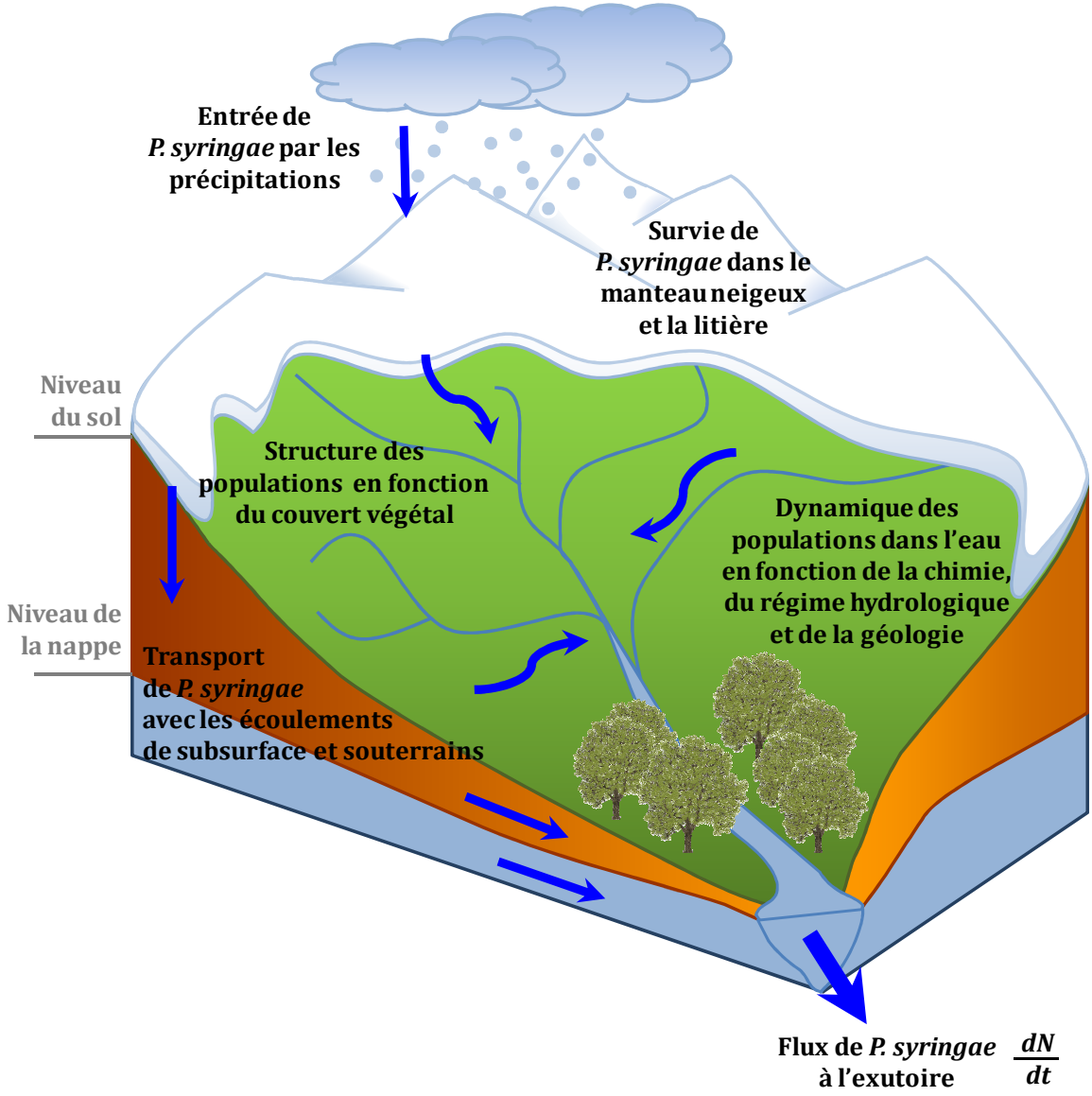


Figure 2. Les différents processus à prendre en compte dans la modélisation des flux de *P. syringae* dans un bassin versant

Grâce à nos connaissances sur le cycle de l'eau et celles nouvellement acquises sur la dynamique des populations de *P. syringae* dans plusieurs de ses compartiments, nous proposons de formuler le flux de *P. syringae* dN/dt à l'exutoire du bassin de la manière suivante :

$$\frac{dN}{dt} = f(\mu.Q.N_E).dt \quad \text{où} \quad N_E = f(S_V, N_v, N_P, N_S, \lambda, t)$$

Où dN/dt décrit la dynamique de la taille des populations N dans les cours d'eau, du débit de l'eau Q, et du taux de survie μ (ratio de la mortalité et croissance) au cours du

temps *t.* Selon nos recherches, nous pouvons estimer la taille des populations N_E dans un cours d'eau à l'instant t en fonction du taux de transfert à travers le sol λ des populations N_{v} se trouvant sur une surface du sol S_V (en m^2 de litière et végétation), de celles apportées par les précipitations N_P et de celles se trouvant dans le solN_S. Nous avons estimé N_{v} au cours du temps, N_P qui dépend de l'origine et des conditions climatiques vécues par des masses d'air et des propriétés chimiques des précipitations. Nous avons vu également estimer N_E et λ dont on connaît le lien avec la chimie de l'eau, et dont de la dynamique dans un contexte hydrogéologique et climatique donné, reste à mieux caractériser.

Pour réaliser ce défi nous avons également identifié des modèles météorologiques, hydrologiques et des outils sur les systèmes d'information géographique qui peuvent être utilisés pour estimer certaines variables comme Q, S_V, N_P au cours du temps. Grâce au modèle HYSPLIT, nous avons pu estimer la probabilité pour *P. syringae* d'être apportée par un évènement de précipitation (Draxler and Hess, 1998; Monteil *et al.*, submitted-a). Ce modèle pourrait nous permettre de prédire la fréquence de l'arrivée de *P. syringae* dans le bassin versant. D'autre part, nous avons évalué la taille des populations dans les prairies alpines en fonction de la saison. Les bases de données spatiales comme le CORINE *Land Cover* et les outils SIG comme Quantum GIS peuvent nous permettre de calculer la superficie de chacun des habitats sur une zone donnée. De telles estimations couplées à une caractérisation des tailles de chacun des habitats nous donneraient une estimation de la taille des populations à la surface du sol d'une superficie donnée. Enfin, nous avons vu que la dynamique des populations de *P. syringae* était liée à celle de l'eau. Le modèle SIM optimisé par Lafaysse *et al.* (2011) permet d'estimer cette dynamique hydrologique grâce à l'association d'un modèle météorologique (SAFRAN) estimant les apports d'eau par les précipitations et un modèle simulant les interactions sol, végétation et manteau neigeux dans les flux d'eau (ISBA). Le modèle SIM a une troisième composante hydrologique (le modèle MODCOU) pour les flux très profonds venant des aquifères, mais qui dans le cas du bassin versant de la Haute Durance n'avait pas d'effet sur la prédiction des débits des rivières. Ce modèle associé à l'estimation de N_E au cours du temps, pourrait quantifier les flux de *P. syringae* à l'exutoire du bassin versant de la Haute Durance.

IV. Perspectives de recherche

Le modèle que nous proposons est à ce jour focalisé principalement sur la dynamique des tailles de populations de l'espèce de *P. syringae,* mais il reste à intégrer le reste des données sur la diversité des phénotypes et des génotypes. Ce complément de travail pourrait être réalisé à travers l'analyse des génotypes et phénotypes des 4100 souches mises en collection durant la thèse et la collection déjà existante du laboratoire. De manière surprenante, nous avons observé une diversité au sein des habitats non cultivés bien au delà de ce qui avait pu être décrit auparavant dans l'environnement des plantes cultivées. Ce constat ouvre de nouveaux champs de recherche sur les conditions maintenant cette diversité, et tout spécialement l'existence de souches pathogènes sur de la végétation apparemment saine.

Dans l'ensemble de nos observations, les populations étaient toujours hétérogènes et les souches dominantes n'étaient pas les mêmes suivant le site, la date et le substrat de prélèvement. Or *P. syringae* fait parti d'une communauté composée d'autres microorganismes certes, mais elle fait aussi parti d'un système bien plus complexe où interagissent communautés de plantes, d'animaux et l'Homme, avec l'environnement hydrologique, géologique et le climat. Dans cette étude, nous n'avons pas caractérisé l'impact des ces autres occupants des écosystèmes, cependant notre approche de terrain nous a permis d'observer certaines différences qui suscitent des interrogations. La diversité des plantes change d'une prairie à une autre suivant l'altitude, l'exposition au soleil et le sol. Nous avons également remarqué les différences de couvert végétal dans les zones plus ou moins pâturées par les chevaux, les moutons et les vaches. L'Homme façonne également le paysage avec les stations de ski qui changent l'occupation des sols (forêts ou prairies) et le drainage des sols. Nous pouvons alors nous demander si ces facteurs favorisent d'une manière ou d'une autre la dissémination, la sélection et la diversification de certaines souches, et tout spécialement celles comportant un risque en santé des plantes.

Déterminer de l'effet de tels facteurs permettrait alors au modèle que nous proposons, de tester des scénarios de gestion des espaces naturels pour limiter la diffusion de ces souches à risques. Il serait d'autant plus utile dans le cadre du réchauffement global, que le milieu alpin est le premier milieu soumis à ses effets (i.e., changement de température, des régimes hydrologiques, de la diversité des plantes, des

interactions neige-manteau neigeux). Quels seraient alors l'impact de tels changements sur la structure et les échanges au sein de la metapopulation de *P. syringae* et de celle des pathogènes de plante en général ?

L'observation d'une telle diversité dans les environnements abordés dans cette étude soulève également d'autres questions plus concrètes si on les transpose au paysage agricole. En effet, les espaces dits « naturels » ne sont pas inféodés aux milieux alpins. Les cultures sont cerclées par des prairies, des forêts, des plantes adventices et leur litière associée. Une telle structure des paysages agricoles est-elle un frein ou un avantage à la dissémination et à la diversification de *P. syringae* ? D'autre part, on a souvent caricaturé les cultures comme des environnements favorisant la dissémination et la croissance d'une souche en particulier. Mais est-ce vraiment le cas ? En effet, notre vision est peut être biaisée par le fait que nous avons eu tendance à pratiquer « l'écologie de la maladie » plutôt que « l'écologie de la santé ». Nous avons caractérisé les populations hébergées par les plantes une fois celle-ci malades, mais pas lorsqu'elles étaient saines. Il est donc possible que la clé dans la compréhension de l'émergence ou la réémergence des maladies de plante se trouve dans la caractérisation des populations, des communautés microbiennes et des conditions physico-chimiques sur la plante lorsqu'elle est saine. Il serait donc intéressant de déterminer comment l'ensemble de ces facteurs rompent l'équilibre à un temps donné, et favorisent la diffusion de la maladie.

Enfin, l'ensemble des recherches qui ont été menées dans cette thèse pourraient être étendues à d'autres bactéries phytopathogènes ou d'autres agents phytopathogènes au sens large. Une telle approche a été initiée avec *B. cinerea*.

Ma contribution à cet article

Moud Demba Diallo a effectué un Post Doc de 2008 à 2010 dans le laboratoire de Pathologie d'Avignon. Son objectif était de caractériser le cluster *hrp/hrc* des souches qui n'induisaient pas de réaction HR (HR^-), de plusieurs clades récemment identifiés par Morris *et al*. (2010). Parmi des souches que j'ai mis en collection des dizaines d'échantillons de neige et de litière dans les Alpes du Sud et dans l'Atlas (Maroc), j'ai mis en évidence un phénotype particulier associé au clade TA-002 qui était HR^- sur tabac, qui ne produisait pas de toxine de type syringomycine-*like*, mais qui était virulente sur melon. Caroline Guilbaud a caractérisé le cluster *hrp/hrc* de ces souches particulières dont aucun des gènes de la forme canonique n'a pu être mis en évidence.

La réaction HR a toujours été utilisée comme critère pour le diagnostic des maladies et pour différencier les organismes pathogènes des saprophytes. La mise en évidence de l'absence de la forme canonique du système de sécrétion de type III chez des souches pouvant induire des symptômes sur les plantes remettent en cause l'utilité du test HR pour identifier les responsables étiologiques des maladies provoquées par *P. syringae*, suggérant qu'il pourrait exister une autre forme de système de sécrétion de type III.

Pseudomonas syringae naturally lacking the canonical type III secretion system are ubiquitous in non agricultural habitats, are phylogenetically diverse and can be pathogenic.

Moudjahidou DEMBA DIALLO[1], Caroline L. MONTEIL[1], Boris A. VITNAZER[2], Christopher CLARKE[2], Catherine GLAUX[1], Caroline GUILBAUD[1], Cecile DESBIEZ[1] and Cindy E. MORRIS[1]*.

[1]INRA Centre de Recherche en PACA, Domaine Saint Maurice BP 94 - 84143 Montfavet Cedex – France

[2]Department of Plant Pathology, Physiology, and Weed Science, Virginia Tech, Latham Hall, Ag Quad Lane, Blacksburg, VA-24061, USA

Subject category: Microbe-microbe and microbe-host interactions

Key words: hypersensitive reaction, aquatic microbiology, environmental microbiology, evolutionary ecology, fitness, adaptation

*Corresponding author. Tel.: +33 (0)4 32 72 28 41; fax: +33 (0)4 32 72 28 42; E-mail: Cindy.Morris@avignon.inra.fr

ABSTRACT

The type III secretion system (T3SS) is an important virulence factor of pathogenic bacteria, but the natural occurrence of variants of bacterial plant pathogens with deficiencies in their T3SS raises questions about the significance of the T3SS for fitness. Previous work on T3SS-deficient plant pathogenic bacteria has focused on strains from plants or plant debris. Here we have characterized T3SS deficient strains of *Pseudomonas syringae* from plant and non-plant substrates in pristine non agricultural contexts, many of which represent recently described clades not yet found associated with crop plants. Strains incapable of inducing a hypersensitive reaction in tobacco (HR^-) were detected in 65% of 126 samples from headwaters of

rivers (mountain creeks and lakes), snowpack, epilithic biofilms, wild plants and leaf litter and constituted 2% to 100% of the *P. syringae* population associated with each sample. All HR$^-$ strains lacked at least one gene in the canonical *hrp/hr*c locus or the associated conserved effector locus but most lacked all 6 of the genes tested (*hrcC, hrpL, hrpK1*, *avrE1,* and *hrpW1*) and represented several disparate phylogenetic clades. Although most HR$^-$ strains were incapable of causing symptoms on cantaloupe seedlings as expected, strains in the recently described TA-002 clade caused severe symptoms in spite of the absence of any of the 6 conserved genes of the canonical T3SS according to PCR and Southern blot essays. The phylogenetic context of the T3SS variants we observed provides insight into the evolutionary history of *P. syringae* as a pathogen and as an environmental saprophyte.

INTRODUCTION

The type III secretion system (T3SS) is believed to confer a major fitness advantage to a wide range of Gram-negative bacteria that are pathogens of plants or animals. By delivering effectors that suppress the defense mechanisms of hosts (Block and Alfano, 2011; Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Hueck, 1998) it contributes to creating more favorable conditions for bacterial multiplication in the host. The functions and evolutionary origins of this secretion system have been intensively explored because of its critical role in pathogenicity (Troisfontaines and Cornelis, 2005). Three complementary analytical approaches are needed to attain a full understanding of the significance of the T3SS for bacterial fitness, pathogenicity and evolution. These approaches are: mutational analyses of model strains and population genetics and comparative genomics of strains representative of pathogen diversity. For plant pathogenic bacteria, the latter two have been hindered by the research focus on highly virulent crop pathogens and a concomitant neglect of the pathogen diversity present on wild plants and in the environment in general. This neglect of pathogen diversity is partly due to the narrow species descriptions of plant pathogenic bacteria, which include the ability to induce a hypersensitive response (HR) on tobacco (see for example the LOPAT test used to identify *Pseudomonas syringae*, (Lelliott *et al.*, 1966)). This narrow species description automatically excludes plant pathogen species members that might be missing a T3SS since induction of an HR is an indicator of a

functional T3SS (He, 1996). Strains deficient in their capacity to induce HR (HR^-) have recently been described for *Erwinia pyrifoliae* (Jock *et al.*, 2003), *Pectobacterium* sp. (Kim *et al.*, 2009b), and *P. syringae* (Clarke *et al.*, 2010; Kniskern *et al.*, 2011; Mohr *et al.*, 2008). All strains examined in these studies were isolated from plants (wild or cultivated) or from leaf litter in cultivated fields. The HR^- strains of *Pectobacterium* represent two species, *P. carotovorum* and *P. wasabiae*. But the *P. syringae* strains are remarkably homogenous. All HR^- strains of *P. syringae* characterized to date represent a single phylogenetic group and consistently lack the canonical *hrp/hrc* cluster (Clarke *et al.*, 2010; Kniskern *et al.*, 2011; Mohr *et al.*, 2008). Furthermore, these strains harbor a novel *hrp/hrc* cluster with limited effectiveness in expressing and/or delivering effectors to plant cells. HR^- strains of *E. pyrifoliae* and *P. syringae* were reported to be incapable of causing disease on the hosts tested, whereas the HR^- strains of *Pectobacterium* spp. maintained pathogenicity on the original host from which they were isolated. The considerable role of pectolytic enzymes in the pathogenicity of *Pectobacterium* spp. might explain why there was no loss in pathogenicity for this group of bacteria.

Recent work on the ecology of *P. syringae* in non agricultural habitats revealed the existence of nine new clades of this bacterium that had not been previously observed (Morris *et al.*, 2010). All phylogenetic descriptions of this species prior to the study of non agricultural habitats focused on strains from plants. The extensive phylogenetic diversity observed in non agricultural habitats could also be a source of genetic diversity of the T3SS and of pathotypes. Strains in these clades are clearly apt at surviving in a wide range of habitats, such as snowpack, water and epilithic biofilms. The key traits for adaptation to these specific habitats, and for enabling many strains of *P. syringae* to be fit in multiple habitats including plant tissues, have not been identified. In particular, the role that the T3SS plays in this adaptation has not been explored. Hence, we have explored the frequency of occurrence and the genetic diversity of strains of *P. syringae*, from non agricultural habitats, that are HR^- in tobacco. This work reveals that HR^- strains are frequent in non agricultural habitats and have diverse phylogenetic origins. Furthermore – and surprisingly - their incapacity to induce hypersensitivity is not necessarily indicative of their incapacity to cause disease on plants. This work provides

a unique comparative foundation for identifying and studying the genetic factors that underlie evolutionary adaptation and ecological specialization of *P. syringae*.

MATERIALS &METHODS

Origin of strains

A total of 63 strains of *P. syringae* were deployed in this study, including 40 strains unable to incite a hypersensitive reaction (HR^-) and 23 strains capable of inciting a hypersensitive reaction (HR^+) obtained from 21 samples of water, snowpack, epilithic biofilms and wild plants as described in the Supplementary Table. Six reference strains were also included. Samples were part of a survey for hypersensitive incompetent strains that included a range of environmental substrates collected from 2004 to 2010 mostly in alpine regions and outside of agricultural fields (Table 1) and processed as described previously (Morris *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008) to determine the density of *P. syringae* populations. Phenotypic traits that confirm identity as *P. syringae* were determined as described previously (absence of arginin dihydrolase and cytochrome oxidase). The 40 strains of *P. syringae* unable to incite a hypersensitive reaction used for this study were selected from that survey to represent the range of sample sites, substrates and phylogenetic diversity. Reference strains included the HR^- strains Psy508 and Psy642 (Clarke *et al.*, 2010; Mohr *et al.*, 2008) and the HR^+ strains B728A (from the stock culture of S. Hirano, University of Wisconsin, Madison), DC3000 and 1448A from J. Greenberg (The University of Chicago), and Cit7 from S.E. Lindow (University of California, Berkeley). All strains were stored at -80° C in 20% glycerol and all phenotypic and molecular tests were conducted on cultures prepared from a single transfer of the storage cultures.

Hypersensitivity, pathogenicity and growth dynamics of bacteria in plants

For hypersensitivity tests, aqueous bacterial suspensions at 10^8 colony-forming units (CFU) mL^{-1} from 48 h cultures on King's medium B (King *et al.*, 1954) were infiltrated with a needleless syringe into the leaves of tobacco (*Nicotiana*

tabacum L. cv. Xanthi). Hypersensitivity was scored as negative if necrotic patches did not develop in the infiltrated zone within 48 h after infiltration. Assays were repeated three times and included an HR^+ strain as a control.

The capacity of strains to induce disease symptoms on cantaloupe seedlings was determined for strains regardless of their capacity to induce hypersensitivity on tobacco. Aggressiveness on cantaloupe plants (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud. cv. Védrantais) was quantified by injecting 50 µL of bacterial suspensions (prepared as for hypersensitivity tests) into the junction of the cotyledons of 12 plants at the cotyledon stage (ca. 10 days after sowing) as described previously (Morris *et al.*, 2010). Plants were incubated for seven days at 25°C during the daylight period (16 h) and 18°C at night (8 h) and symptoms were observed daily after inoculation. Final disease severity was noted at 7 days after inoculation on a scale of 0 to 4: 0 (no symptoms), 1 (1 cotyledon wilted or discolored), 2 (both cotyledons wilted or discolored), 3 (both cotyledons completely wilted and the upper stem of the plant collapsed) and 4 (the plant was collapsed at the base and the entire plant had fallen on the soil surface).

To determine population dynamics of strains in cantaloupe plants at the cotyledon stage, plants were inoculated and incubated in the same way as for pathogenicity tests. At each sampling time for up to 7 days after inoculation, 3-6 plants were randomly sampled from the 12 plants inoculated with each strain, weighed, and individually macerated in 10 ml of 0.1 M phosphate buffer. Aliquots of the macerate were diluted and plated on KBC medium (Mohan and Schaad, 1987), the same medium used to isolate these strains from the environment. Colonies were counted after 4 days of incubation at 22-25°C in the dark. All colonies were fluorescent under UV light as expected and there were no indications of contamination of the plants with other bacteria.

PCR detection of genes in the *hrp/hrc* cluster

PCR detection was conducted on DNA purified from 48 h cultures on KB medium from strains stored at -80° C as described above. Bacterial suspensions (10^{12} CFU mL^{-1}) prepared in sterile distilled water were used for DNA extraction with

a Puregene DNA purification system cell and tissue kit (Gentra Systems, Minnesota) following the manufacturer's instructions.

For detection of *hrp-hrc* cluster genes (*hrpK1, hrpL, hrcC*), CEL effectors (*avrE1, hrpW1*) and *hopI1*, primers described by Mohr *et al.* (2008)vwere used for amplification, while for phage detection we designed forward primer PhF (5'-TCAGGCCGCTTTCAACTTGGC-3') and reverse primer PhR (5'-CCATAYGGCGCAGTGGTGG- 3') based on the sequence of a putative transcriptional regulator gene (locus tag ABX64468) located within the prophage at the *hrp/hrc* locus of Psy508 (Mohr *et al.*, 2008). To detect the presence of the *hrcC* orthologue of Psy642, colony PCR was performed as previously described (Clarke *et al.*, 2010). Amplification conditions for detection of these eight genes are described in detail in the supplemental information section.

Southern blotting

To validate the results of PCR reactions, Southern blot analyses were performed for a set of strains representing the different profiles of absence and presence of the 6 conserved genes as described previously (Mohr *et al.*, 2008; Vinatzer *et al.*, 2006). Genomic DNA of *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* 508, and hypersensitive incompetent *P. syringae* UB15, UB185, UB186, UB190, UB192, UB193, UB195, UB246, UB313, SZ30, SZ37, SZ45, SZ124, SZ131, TA043 was digested with *Hin*dIII and *Eco*RI (New England Biolabs, Germany). Digested DNA was electrophoresed on a 1% Tris-borate-EDTA agarose gel. Southern blotting, hybridization, and detection was performed following the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics) using a mixture of digoxigenin (DIG)-labelled PCR products of the 6 genes amplified from strain B728a and the DIG-labeled PCR product of the amplification of a housekeeping gene (*gapA*) from strain B728a as probes.

Gene sequencing and phylogenetic analysis

From previous studies (Clarke *et al.*, 2010; Mohr *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2010), the clade identity was known for 19 strains used here relative to the phylogenetic tree reported by Morris *et al.* (2010), and based on 4 housekeeping genes (*rpoD*, *gyrB*, *cts* and *gapA*). For the remaining strains, assignment to clades was

based on our previous results that strains could be accurately assigned to clades based on DNA similarity in the *cts* sequence using a threshold dissimilarity of 1.8% (Morris *et al.*, 2010). The sequence of the *cts* gene was determined as previously described (Morris *et al.*, 2010). Based on the aligned and truncated (ca. 400 bp) *cts* sequences (DAMBE version 5.1.1 (Xia and Xie, 2001), the genetic distance (dissimilarity) of each strain from each of the other 121 strains of *P. syringae* that constitute our previously reported phylogenetic tree (Morris *et al.*, 2010) was determined using MEGA, version 3.1 (Kumar *et al.*, 1994). There were no cases in which strains had ambiguous similarities (i.e., there were no cases in which the similarity criterion was met for more than one clade).

If the similarity criterion was not met, the other three housekeeping genes (*rpoD*, *gyrB* and *gapA*) were sequenced. Details of PCR amplifications are described in the supplemental information section. A phylogenetic tree was constructed with the concatenated 4 housekeeping gene sequences from these strains and those from the ensemble of *P. syringae*, *P. viridiflava* and *P. fluorescens* used in a previous work (Morris *et al.*, 2010). All strains fell into previously described clades.

Sequences of the PCR-amplified bacteriophage gene fragment were aligned with DAMBE version 5.1.1 and truncated to 302 bp.

RESULTS

HR$^-$ strains are abundant in non-agricultural habitats and can dominate the *P. syringae* population in some cases

HR$^-$ strains were detected in 65% of the 126 environmental samples analyzed (Table 1) and were found in headwaters of rivers, snowpack, epilithic biofilms, wild plants and leaf litter. HR$^-$ strains were also found in some samples of freshly fallen rain but not in any of the samples of fresh snow fall. When detected, the HR$^-$ fraction of the total *P. syringae* population varied greatly, from 2% to 100%, and HR$^-$ strains attained population densities of up to 10^5 CFU L^{-1} of river water or 10^9 CFU g^{-1} of plant tissue, for example. In 20% of the samples, HR$^-$ strains constituted 50% or more of the total *P. syringae* population (Figure 1). The frequency of

Table 1. Characteristics of environmental samples, from alpine regions and outside of cropped fields, used in survey for populations of *Pseudomonas syringae* incapable of inducing a hypersensitive reaction in tobacco (HR-)

Substrate	Region	n° of samples[2]	n° HR$^-$ samples[3]	Size range of the total *P. syringae* population (log cfu g^{-1} and log cfu L^{-1})[4]	Previous description of sample or sampling site
Epilithic biofilm					
	France, Alps	1	1	4.9	(Morris *et al.*, 2007)
	France, southeast	3	0	1.70 - 2.43	(Morris *et al.*, 2007)
	USA, western Rockies	6	1	1.56 - 3.76	(Morris *et al.*, 2007)
Headwater					
	France, Alps	37	34	1.47 - 5.8	(Morris *et al.*, 2010; (Morris *et al.*, 2008)
	France, southwest	2	1	2.65 - 3.03	(Morris *et al.*, 2010)
	New Zealand	1	1	3.45	(Morris *et al.*, 2010)
	USA, western Rocky mountains	3	1	2.69	(Morris *et al.*, 2010)
Wild plants					
	France-Italy border, Alps	10	6	2.68 - 9.00	(Morris *et al.*, 2008)
	France, southwest	2	1	3.85 - 5.73	(Morris *et al.*, 2008)
Alpine leaf litter					
	France, Alps	11	8	2.89 - 6.45	
Rain[1]					
	France, Alps	1	1	4.23	
	France, southeast	5	1	1.00 - 3.05	(Morris *et al.*, 2008)
Snowpack					
	Austrian Alps	1	0	2	
	France, Alps	35	25	1.20 - 6.95	(Morris *et al.*, 2008)
	Morocco, Atlas mountains	1	1	4.72	
Snow fall					
	France, Alps	6	0	2.18 - 5.11	(Morris *et al.*, 2008)
	USA, western Rockies	1	0	1.83	

[1] Some rain samples were collected in peri-urban zones, but outside of cropped fields.
[2] Number of total samples of each substrate that were analyzed and in which *P. syringae* was detected.
[3] Number of samples of each substrate in which HR$^-$ strains of *P. syringae* were detected. When fewer than 20 strains of *P. syringae* were isolated from the sample, all were tested for capacity to induce hypersensitivity. Otherwise, a random set of about 30 strains was tested per sample.
[4] The range of sizes of populations of *P. syringae*, expressed as CFU g^{-1} (plants, leaf litter and epilithic biofilms) or CFU L^{-1} (rain, headwaters, and meltwater from snow) observed in the different substrates.

HR$^-$ strains in the total *P. syringae* population was not related to the *P. syringae* population density (Figure 1). For the samples analyzed here, *P. syringae* population density did not exceed 10^7 CFU g^{-1} or CFU L^{-1} except in one case. Strains from some of these samples were further characterized for the presence of components of the T3SS and for their pathogenicity to cantaloupe seedlings (Table 2).

HR$^-$ strains lack at least one conserved effector gene

The conserved type III effector gene *hopI1* (Jelenska *et al.*, 2007) was absent from all HR$^-$ strains. In most of these HR$^-$ strains, a varying number (or even all) of the canonical *hrp/hrc* locus genes *hrpK1*, *hrpL*, and *hrcC* and the conserved effector locus effector genes *avrE1* and *hrpW1* were also absent based on PCR detection

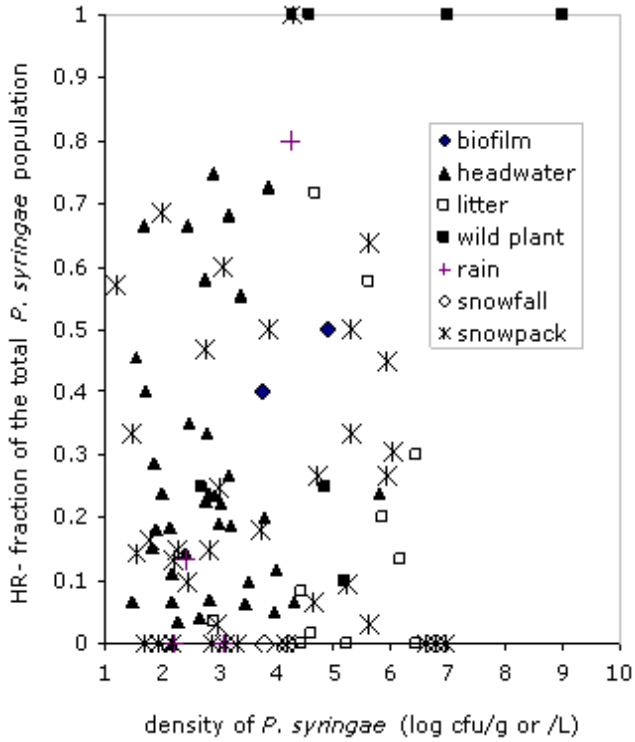


Figure 1. Fraction of HR⁻ strains in the total *P. syringae* populations in environmental samples in terms of the density of the *P. syringae* population in the sample

Population densities are expressed as log CFU g^{-1} for biofilms, plant and leaf litter or log CFU L^{-1} for water, rain and snow (as snowmelt). The data constitute values from 100 of the 126 samples described in Table 1. For these 100 samples, they were processed to permit quantification of the density of the HR⁻ component population as well as that of the total *P. syringae* population.

and subsequent Southern blotting (Table 2, an example of PCR and Southern blotting are given in the Figure 4). Interestingly, for about a dozen HR+ strains we were also unable to detect one or more of the 6 tested genes (Table 2). For the other 16 HR⁺ strains, all 6 genes were detected with PCR. Among the HR⁻ strains, the most frequent molecular profile was similar to that previously reported for strain Psy508 (Mohr *et al.*, 2008) and Psy642 (Clarke *et al.*, 2010) and for HR⁻ strains from *Arabidopsis thaliana* (Kniskern *et al.*, 2011), *viz.* strains lacked all 6 conserved genes tested (Table 2). An example of the results observed with PCR detection and subsequent Southern blotting are presented in the supplementary figure.

HR⁻ strains lacking all 6 tested *hrp/hrc* genes and conserved effector genes are found in multiple distinct clades

In all previous descriptions of HR⁻ *P. syringae* lacking the 6 tested genes, all strains fell into a single phylogenetic group, clade 2C *syringae* (Clarke *et al.*, 2010; Kniskern *et al.*, 2011; Mohr *et al.*, 2008). Clade 2C corresponds to clade SZ-030 in our

previous work (Morris *et al.*, 2010) and we will thus continue calling this clade SZ-030 here. In this present work, HR$^-$ strains lacking all 6 conserved genes of the canonical *hrp/hrc* locus were found in clade SZ-030 and in three additional phylogenetic groups, clades TA-002, UB-246 and Group 2b (Table 2). In addition to the previously-reported strains from plants (cultivated and wild plants, weeds, debris), strains lacking the canonical *hrp/hrc* locus were isolated from snow pack and headwaters of rivers.

Previous descriptions of strains in the SZ-030 clade indicated that they possess a distantly related variant of the *hrcC* gene (Clarke *et al.*, 2010), called $hrcC_{Psy642}$ from here on. The presence of $hrcC_{Psy642}$ was observed only in HR$^-$ strains lacking all the 6 conserved genes in the canonical T3SS. This included all strains in the SZ-030 clade tested here and one strain outside of this clade, strain USA-050. The sequence of a 560 bp long fragment of the USA-050 *hrcC* allele was found to be 97% similar to that of strain Psy642.

Some but not all *P. syringae* strains from French sources that lack the canonical *hrp/hrc* locus island carry identical sequences originating from a bacteriophage

Previous work reported that strain Psy508 lacking the *hrp/hrc* locus harbors a prophage downstream of the associated $tRNA^{leu}$ (Mohr *et al.*, 2008). We sought to determine if all strains lacking the canonical *hrp/hrc* locus island had this same sequence because its placement in the genome is suggestive of its potential role in the absence of this island. PCR with primers for one of the prophage genes of Psy508, a putative transcriptional regulator, revealed the presence of the prophage sequence in 21 strains lacking the *hrp/hrc* locus, including the reference strain Psy508. Strains containing the phage sequence were found in all but one of the clades that contained strains without the *hrp/hrc* locus, *viz*. clades SZ-030, TA-002 and UB-254 (Table 2). However, the phage sequence was not present in all strains lacking the *hrp/hrc* locus; it was found in 18 of 23 strains in clade SZ-030, in 1 of 12 strains in clade TA-002, in 2 of 2 strains in clade UB-246, and not in the strain from the Group 2b clade. It was not detected in any strain for which at least one gene in the canonical *hrp/hrc* cluster was detected. The nucleotide sequence of the prophage was determined. The 380 bp sequence was identical among all strains collected in France and showed 91% similarity

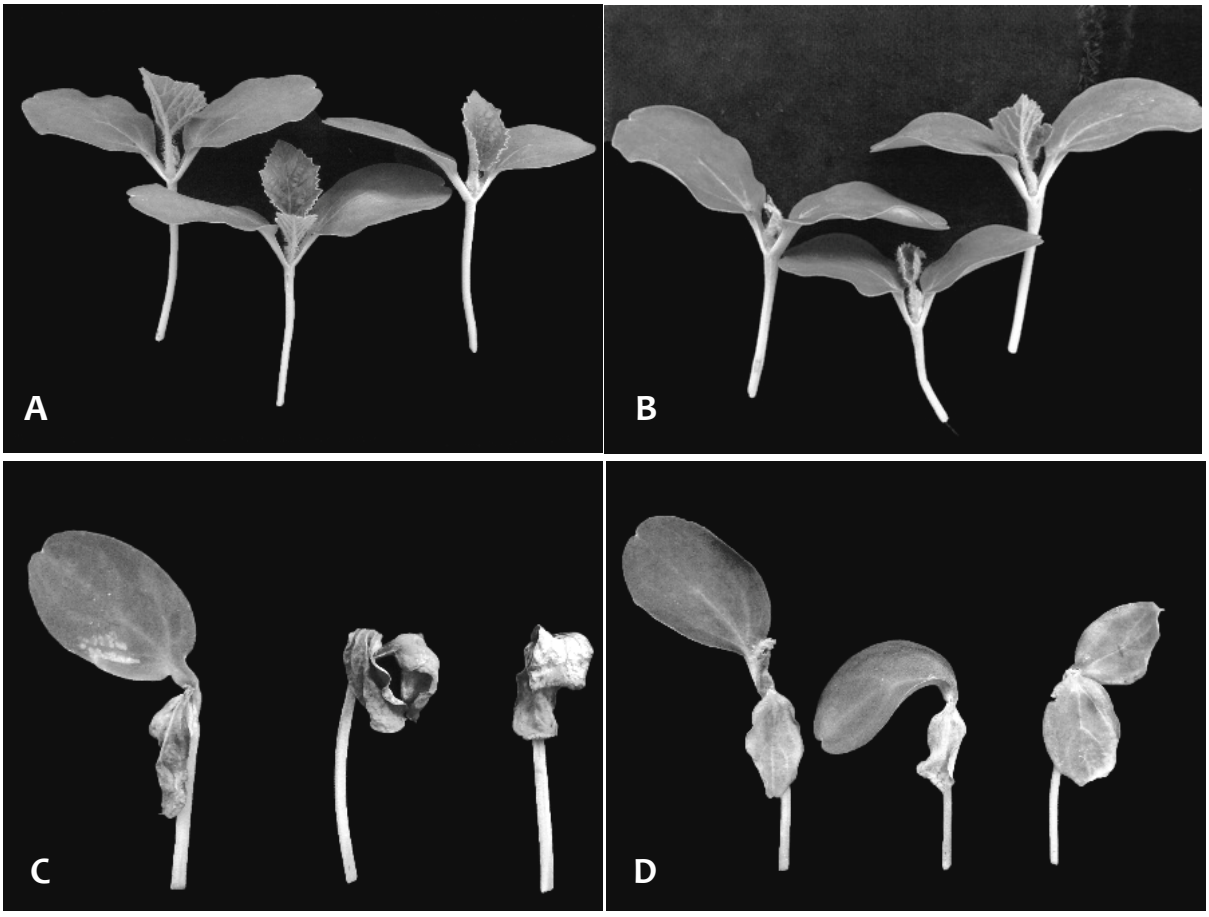


Figure 2. Reaction of cantaloupe plants at the cotyledon stage to inoculation with HR$^+$ and HR$^-$ strains of *P. syringae* after 7 days of incubation: plants were inoculated with A) sterile distilled water, B) HR$^-$ strain CC1524 in the clade of the same name C) HR$^+$ strain CC0094 in the Group 2b clade, or D) HR$^-$ strain TA043 in the TA002 clade

Plants shown here were chosen at random among the 12 plants inoculated for each strain.

with the prophage sequence reported for strain Psy508 isolated from the state of New York (USA) (Mohr *et al.*, 2008).

Incapacity to induce HR is not necessarily indicative of the incapacity to cause disease or to persist in plant tissue

For many species of plant pathogenic bacteria, and in particular for *P. syringae*, the ability to induce hypersensitivity has been considered to be an indicator of the capacity to cause disease in susceptible host plants (He, 1996). Likewise, the inability to induce hypersensitivity is considered indicative of the absence or incapacitation of a functional T3SS and hence of the incapacity to induce disease. Therefore, it is not surprising that most HR$^-$ strains were not pathogenic in an assay on cantaloupe seedlings. In all clades, with the exception of clade TA-002, HR$^-$ strains induced at most a weak compatible reaction (score = 1) in 1 of 12 of the inoculated

seedlings after 7 days of incubation. However, HR$^-$ strains in clade TA-002 were among the most aggressive on cantaloupe of the strains tested in this study. In particular, of 15 strains characterized in the TA-002 clade, 13 were HR$^-$ and 12 lacked all 6 genes in the canonical *hrp/hrc* locus; 8 of these strains caused compatible disease reactions on 75% or more of the cantaloupe seedlings that were inoculated (Table 2) (Figure 2). The range of pathogenic capacity of these strains, indicated by their aggressiveness on cantaloupe, was similar to that observed among HR$^+$ strains in the broad host range clades Groups 2a and 2b (Morris *et al.*, 2010).

When inoculated into cantaloupe seedlings, HR$^+$ strains with complete canonical T3SS (CC0654, DC3000) or with a partial set of the canonical alleles (USA-032) increased their mean population size by a factor of 10 to 30 within 4 days after inoculation (Figure 3A). For CC0654 and USA-032, this corresponded to marked disease symptoms, but for strain DC3000 only one plant manifested slight symptoms (disease score = 1) during the incubation period (Figure 3B). HR$^-$ strain TA-043 showed a slight population increase at 2 days after inoculation and afterwards stabilized around the initial population size although disease symptoms were expressed. For the HR$^-$ strains SZ-030 and CC1504, population sized decreased slightly and stabilized at around 10^7 CFU plant^{-1}. As expected, no disease symptoms were observed for these strains. For all strains considered together, plants with no symptoms harbored population sizes up to 3×10^8 CFU plant^{-1}. Populations in plants with a disease score of 1 ranged in size from 2×10^7 to 1.5×10^8 CFU plant^{-1}; those with a disease score of 2 or more had populations of 5×10^7 to 6×10^8 CFU plant^{-1}.

Table 2. Genetic and pathogenic diversity of strains of *P. syringae* according to the phylogenetic context of the strains

The presence or absence of genes was based on PCR detection.

			Disease on cantaloupe seedlings		Conserved genes in the canonical T3SS								
						CEL effectors		*hrp-hrc* cluster					
Clade[a]	Strain[b]	HR[c]	severity[d]	incidence[e]	*hopl1*	*avrE*	*hrpW*	*hrpK*	*hrpL*	*hrcC*	Psy642 *hrcC*[f]	*Phage*	*gapA*
SZ-030	Psy508[g]	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-030	-	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-037	-	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-045	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-051	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-124	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-142	-	0.17	0.17	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	SZ-144	-	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-015	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-185	-	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-186	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-190	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-192	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-193	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-194	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-195	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-313	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	UB-330	-	nd[h]	nd	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	Psy-642[g]	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	SZ-093	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	UB-184	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	UB-218	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	CC1504	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	USA-052	-	0	0	-	+	+	+	-	-	+	-	+
TA-002	TA-043	-	1.67	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	CCE-284	-	2.17	0.83	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCE-286	-	1.75	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCE-291	-	1.33	0.75	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCE-321	-	0.17	0.42	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCE-324	-	0.5	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCV-0050	-	1.17	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCV-0172	-	0.17	0.17	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCV-0178	-	2.91	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CCV-0180	-	2.5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CSZ-0284	-	1.25	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CSZ-0297	-	2.08	0.67	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CC-1582	-	2.58	1	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	CC-0655	+	0.5	0.42	-	+	-	-	-	+	-	-	+
	CC-0657	+	0	0	-	+	-	+	+	+	-	-	+
UB-246	SZ-131	-	0.08	0.08	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	UB-246	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CC-1524	CC-1419	-	0	0	-	+	-	-	+	+	-	-	+
	CC1418	+	0	0	-	+	+	-	+	+	-	-	+
	CC1422	+	0	0	-	+	+	-	+	+	-	-	+
	UB-169	+	0	0	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	UB-172	+	0	0	-	-	-	+	-	+	-	-	+

Cit7	Cit7[g]	+	no known hosts[i]		+	+	+	+	+	+	-	-	+
Group 1	SZ-122	-	0	0	-	-	+	+	+	-	-	-	+
	SZ-026	+	0.25	0.3	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-046	+	0.25	0.3	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-049	+	0.33	0.3	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-145	+	0	0	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	CC-1569	+	nd	nd	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	DC3000[g]	+	0	0	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Group 2a	UB-419	+	2.83	1	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-035	+	0.46	0.3	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-048	+	0.5	0.4	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	SZ-089	+	2.17	1	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	UB-197	+	0	0	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	UB-210	+	0.33	0.1	+	+	+	-	+	+	-	-	+
	UB-421	+	2.83	1	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Group 2b	USA-050	-	0	0	-	-	-	-	-	-	+	-	+
	CC0654	+	1.4	0.5	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	B728A[g]	+	0	0	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Group 3	1448A[g]	+	0	0	+	+	+	+	+	+	-	-	+
UB-370	UB-370	+	0	0	-	+	+	-	+	+	-	-	+
USA-102	USA-046	+	0	0	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	USA-106	+	0	0	-	+	+	+	+	+	-	-	+
USA-032	USA-032	+	3.25	1	-	+	+	-	+	+	-	-	+

[a] Clades are those described by Morris and colleagues (Morris *et al.*, 2010).
[b] The origins of strains from non agricultural habitats used in this study are described in the supplementary table.
[c] Hypersensitive reaction on tobacco (cv. Xanthi).
[d] Mean intensity, on a scale of 0 to 4, of disease symptoms on 12 cantaloupe seedlings at 7 days after inoculation.
[e] The proportion of 12 cantaloupe seedlings showing disease symptoms at 7 days after inoculation.
[f] Detection of the Psy642 variant of the *hrcC* gene was based on primers different from those for detecting the canonical *hrcC*.
[g] Reference strains described previously as follows: Psy508 (Mohr *et al.*, 2008), Psy-642 (Clarke *et al.*, 2010), Cit7 (Hirano and Upper, 1990), DC3000, B728A, and 1448A (*Pseudomonas syringae* Genome Resources: http://pseudomonas-syringae.org/home.html).
[h] Not determined.
[i] The pathogenicity of Cit7 has been previously well characterized. There are no known hosts and it is considered to be non pathogenic (Hirano and Upper, 1990).

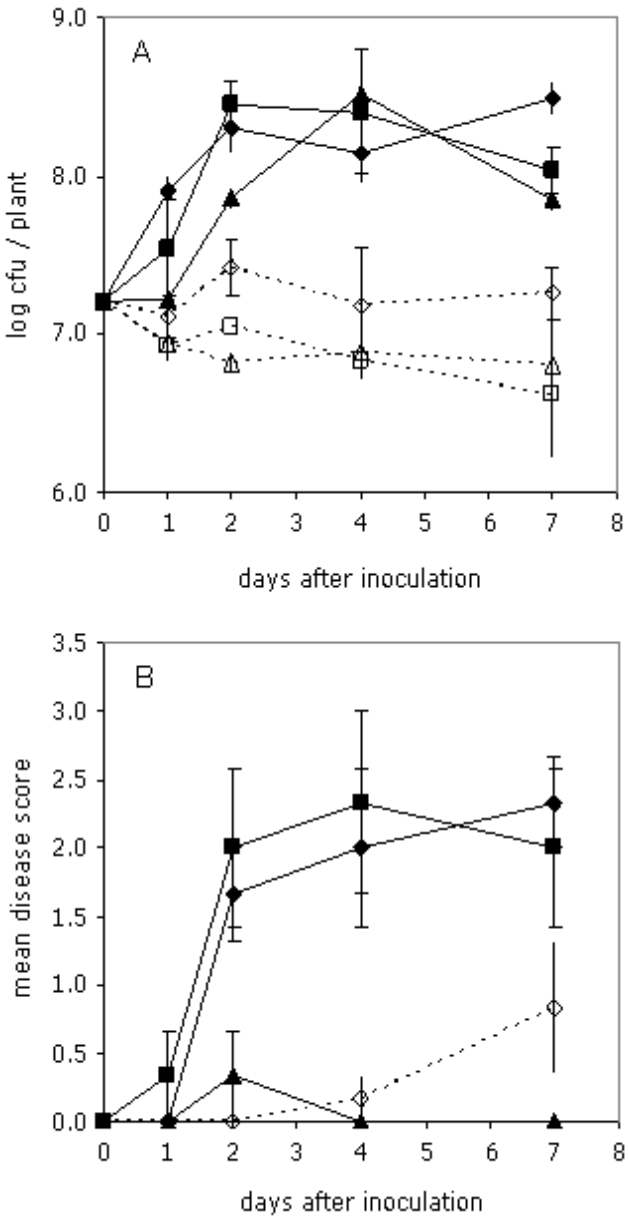


Figure 3. Population dynamics of *P. syringae* (A) and disease (B) in cantaloupe seedlings after inoculation with either HR⁺ or HR⁻ strains. HR⁺ strains are represented by solid lines and symbols (◆ CC0654; ▲ DC3000; ■ USA-032) and HR⁻ strains by dashed lines and open symbols (◊ TA-043; △ SZ-030; ▫ CC1504)

At each sampling time, 3-6 seedlings were cut off at the soil level and individually macerated to determine population densities. Disease was rated on each of the 3-6 plants sampled. Plants inoculated with strains SZ-030 and CC1504 did not show any disease symptoms. Only one plant inoculated with strain DC3000 showed disease symptoms at 2 days after inoculation. For strain TA-043 half of the inoculated plants showed symptoms at 7 days after inoculation. Error bars indicate the standard error of the mean.

DISCUSSION

The natural occurrence of variants of bacterial plant pathogens with apparent deficiencies in their T3SS has raised questions about the significance of the T3SS for the fitness of these bacterial species. For *P. syringae*, it has been proposed strains deficient in their overall pathogenicity have adapted to reduce the fitness costs of host specific virulence in an environment where there is a series of ephemeral host plants (Kniskern *et al.*, 2011). Absence of an effective T3SS could widen the range of plant species on which strains can grow without triggering an HR. In fact, many of the HR^- strains have the same level of reproductive fitness in plants as pathogenic strains - in absence of symptoms (Clarke *et al.*, 2010; Kniskern *et al.*, 2011). For the strains tested here, induction of disease symptoms in cantaloupe was associated with increases of population densities of about 1 order of magnitude. However, HR^- strains were able to persist in plants at densities above 10^6 CFU $plant^{-1}$ (or 10^6 CFU g^{-1}, data converted to a per gram basis not shown here), which is on the high range of *P. syringae* population densities naturally observed in wild plants and symptomless crops (Morris *et al.*, 2008). Ephemeral weeds and wild plants might be part of the selective pressures leading to the successful survival of strains of *P. syringae* deficient in their T3SS. However, *P. syringae* is clearly apt at inhabiting a range of non-plant and non-living substrates, thereby suggesting that this species has considerable fitness in these substrates. The proliferation of strains deficient in the T3SS might result from selection pressures specifically related to these substrates. Here we have shown that T3SS-deficient *P. syringae* can be found not only in wild plants, but also in epilithic biofilms, snow pack and river and lake waters in relatively pristine environments and can compose the dominant fraction of the *P. syringae* population in these substrates. These observations strongly suggest that deficiency in the canonical T3SS does not confer a marked loss of fitness of *P. syringae* in the context of the ensemble of habitats it exploits under natural conditions. T3SSs are considered to be all-purpose tools for undermining eukaryote biology thereby assuring an advantage for the bacterium (Pallen *et al.*, 2005) not only during pathogenesis but during symbiosis (Downie, 2010; Marchetti *et al.*, 2010) and to foster mutualism or commensalism in the rhizosphere (Lugtenberg and Kamilova, 2009) or the mycosphere (Nazir *et al.*, 2010). Co-existence of HR^+ and HR^- strains would suggest that in certain environmental habitats the subversion of eukaryotic cell biology - that of the wild plant host or of the algal or fungal co-

inhabitants of the same biofilm, for example - has no decisive role in the fitness of *P. syringae*. This might be because the population densities that they attain under natural conditions are not large enough to trigger detrimental host responses. However, we cannot rule out that T3SSs in some HR$^-$ strains, for example the T3SS in clade SZ-030 (Clarke *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2010), play a role in the interaction with eukaryotes and are equally effective as the canonical T3SS in suppressing host responses.

We have also observed that pathogenicity does not necessarily depend on the canonical T3SS. The surprising capacity of HR$^-$ strains to cause disease symptoms in cantaloupe was confined to one clade (TA-002), but the symptoms induced were of the same range of severity as those caused by HR$^+$ strains across diverse clades. The type III injectisome is usually one of many different munitions in the whole arsenal used to attack plant cells, and is often complimented by toxins and cell wall-degrading enzymes. Pathogenicity of strains in the TA-002 clade might involve a range of arms independent of a type III injectisome. However, no syringomycin-like broad host range toxins have been detected in these strains according to bioassays (data not shown). Alternatively (or in addition), pathogenicity of strains in the TA-002 clade might be the result of an unknown T3SS that does not elicit hypersensitivity in tobacco but that is capable of delivering effectors. Genome sequencing has led to an important broadening of the known diversity of T3SSs (Pallen *et al.*, 2005). Current efforts to analyze fully-sequenced genomes of *P. syringae* strains from non agricultural habitats, including HR$^-$ strains, will eventually reveal the full range of potential pathogenicity factors of *P. syringae*. Nevertheless, this result is troubling because it weakens the utility of the hypersensitivity test in disease diagnostics. This test has been a key criterion to separate pathogens from saprophytes. Furthermore, all papers reporting HR$^-$ strains of *P. syringae* have referred to them as 'non pathogenic'. If strains in the TA-002 clade have not been reported as the causal agent of epidemics of crop disease it might be due to their incapacity to do so under field conditions, but more likely it is due to the fact that a positive hypersensitive reaction is generally used early in the diagnostic process as a criterion for targeting candidate causal agents.

The absence of the canonical T3SS in multiple disparate clades raises interesting questions about the processes leading to the acquisition or the loss of the canonical T3SS

in *P. syringae*. There is strong evidence that the canonical T3SS was acquired by the most recent common ancestor of the *P. syringae* species complex (Sawada *et al.*, 1999) and has evolved via diversifying selection involving mostly mutations (Guttman *et al.*, 2006). However, those phylogenetic studies ignored the existence of nine clades of *P. syringae*, five of which are more deeply rooted in the phylogenetic tree than the other previously described clades (Morris *et al.*, 2010), the most deeply rooted being clade UB-246. We speculate that the canonical T3SS was acquired at the time of diversification of UB-246 from all of the other clades. The most parsimonious explication for T3SS deficiency in the other clades is subsequent loss by the ancestor of the clades in which it is currently absent. However, clade TA-002 contains several strains that effectively induce hypersensitivity and for which some, but not all, of the six conserved genes were detected. This suggests a diversification of the genes beyond what could be detected with the primers used here, designed based on only three completely sequenced *P. syringae* genomes (Mohr *et al.*, 2008). For all the strains in the CC1524 clade, closely related to TA-002, we could only detect some of the six conserved genes in the canonical T3SS. Likewise, for all strains in clades UB-370, USA-102 and USA-032, which are together in another branch of the phylogenetic tree, some but not all of the six conserved genes were detected in these otherwise HR^+ strains. This suggests that divergence of the alleles in the canonical T3SS is more rapid in some branches than elsewhere in the phylogenetic tree of *P. syringae.* Our observations highlight that natural habitats likely harbor a greater diversity of alleles of the genes in the T3SS of *P. syringae* than currently observed in strains from crops thereby raising exciting questions about the nature of the drivers of this diversification.

The presence of a bacteriophage sequence in strain Psy508 near the site of the (missing) canonical *hrp/hrc* cluster (Mohr *et al.*, 2008) raised questions about the link between the presence of this phage and the absence of the canonical T3SS. Here we show that, although this prophage sequence is present only in strains lacking the canonical T3SS, it is not universally present in all strains with this deficiency. Furthermore, acquisition of the phage seems to have occurred multiple times and perhaps at distinctly different dates as indicated by sequence divergence between French and US strains. This suggests that there were multiple and very recent acquisitions of the same phage in clades TA-002, UB-246 and SZ-030 in France, and that

strain Psy508 acquired a variant of the same phage or had acquired it at a much earlier date. We must also consider that some strains in which we did not detect the phage may have at one time acquired it and then lost it again.

For the two functional T3SSs described to date in *P. syringae* (Clarke *et al.*, 2010; Tampakaki *et al.*, 2011), our observations suggest an exclusivity of the type of T3SS harbored in the genomes of *P. syringae*. Likewise in *P. viridiflava,* strains harbor only one of the two types of T3SS identified by Bergelson and colleagues (Araki *et al.*, 2006). However, Pallen reported that certain bacteria (*Burkholderia* spp., for example) can accumulate different T3SSs (Pallen *et al.*, 2005). The secrets of T3SS polymorphism in *P. syringae* will be disclosed by genomic analyses that incorporate the novel strains described here.

Our results also have implications for understanding which habitats have been important in the evolutionary history of *P. syringae.* Compared to other members of the genus such as *P. fluorescens, P. syringae* has a much reduced capacity to use carbon sources (Sands *et al.*, 1970). It has been suggested that the ancestor of *P. syringae* lost a range of metabolic functions, as an adaptation to the nutritionally constrained environment characteristic of the plants compared to the more nutritionally diverse and copious environments encountered by *P. fluorescens* as a saprophyte (Mithani *et al.*, 2011). This analysis was based on genomes of *P. syringae* in the Group 1, 2 and 3 clades. In light of the new clades of *P. syringae* that our work has revealed, it would be important to consider the metabolic adaptations of the strains in the UB-246 clade, the most deeply rooted of the known *P. syringae* clades and represented solely by HR$^-$ strains. If they resemble those of *P. syringae* in general, then this would suggest that adaptation to a nutritionally constrained environment would be most probably for success as a resident of pristine fresh water habitats. We propose that loss of metabolic capacities in *P. syringae* might have originally been an adaptation for the oligotrophic conditions of certain freshwater habitats. Dissolved organic carbon sources in freshwater generally originate from plants (leaching and degradation). The ability to use sparse quantities of plant-derived carbon sources could have prepared *P. syringae* for a more intimate association with plants, but the intimate association with plants

itself might not have been the initial selection pressure for adaptation to oligotrophic conditions.

The persistence of non pathogenic variants of plant and animal pathogens in the environment has been a springboard for the development of biological control for plant pathogens (Kerr, 1987; Larkin *et al.*, 1996; van Alfen, 1982) and of diseases of human and animal intestinal and urinary tracts (Kruis *et al.*, 2004; Schneitz, 2005). The diversity, abundance and ubiquity of non pathogenic strains of *P. syringae* suggest that competitive exclusion of pathogen strains by non pathogenic con-specifics as a means to control disease might be worth exploring. Competitive exclusion between ice nucleation active and inactive variants of *P. syringae* has successfully limited frost damage induced by this bacterium under experimental conditions (Lindow, 1987). Inundative biological control is the most obvious of the potential practical applications of this work but strategies for plant breeding or crop management that foster proliferation of non pathogenic strains of *P. syringae* might also have potential to mitigate disease development.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to B. Moury, O. Berge, A. Roig, V. Decognet, A. Bouffin, C. Leyronas, V. Rittner (INRA-PACA), to P. Amato (CNRS-University Blaise Pascal), and to David Sands (MSU, Bozeman, MT, USA) for fruitful discussion relative to this work. We thank the American Philosophical Society for a grant to CEM for field work in the US and the numerous colleagues who helped with field sampling. Samples were collected in Grand Teton National Park in accordance with permit number GRTE-2007-SCI-0023. This work was supported by INRA's Department of Plant Health and Environment.

SUPPLEMENTARY INFORMATION & FIGURES

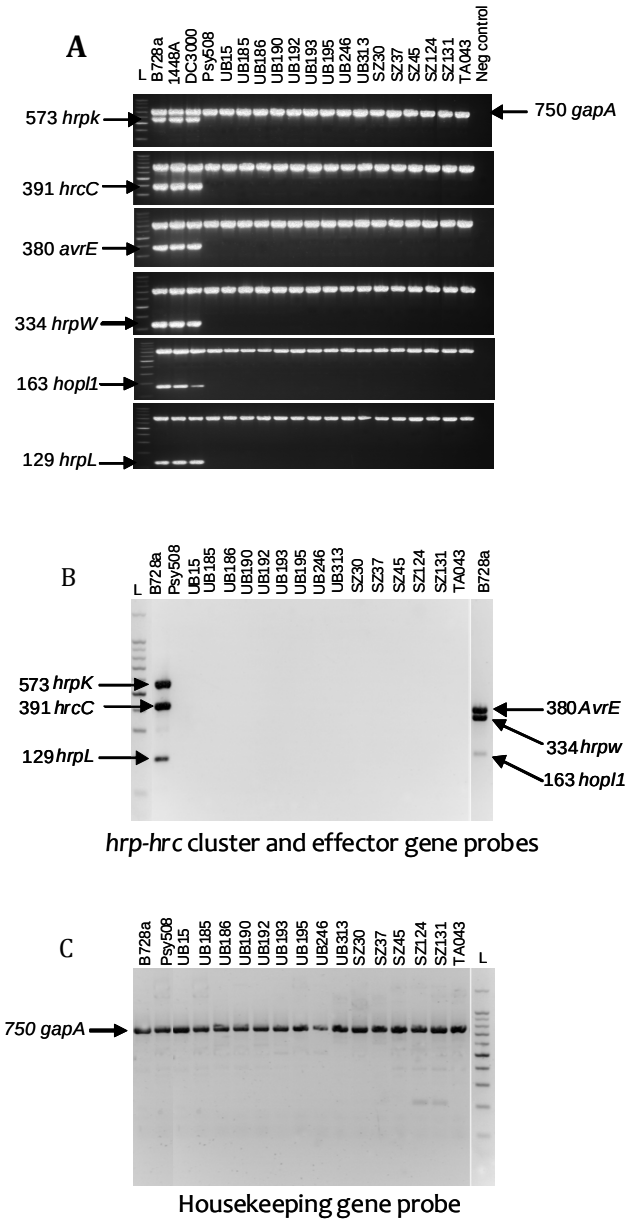


Figure 4. Example of PCR results for canonical *hrp-hrc* cluster and Southern blot experiments

(**A**) Example of PCR results for canonical *hrp-hrc* cluster (*hrpK1, hrpL hrcC,*), the conserved effector locus (*avrE1, hrpW1*), the *hopl1* effector gene, and the housekeeping gene *gapA.* Neither the genes of the *hrp-hrc* T3SS cluster nor the effector genes were amplified from HR$^-$ *P. syringae* Psy508 and other closely related isolates of HR$^-$ *P. syringae*. Degenerate PCR primers were designed based on the three sequenced *P. syringae* isolates, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. tomato DC3000, and *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A as described previously (Mohr *et al.*, 2008). Lane L is the kb ladder. (**B, C**) Example of Southern blot experiments indicating that *P. syringae* Psy508 and other HR$^-$ isolates of *P. syringae* do not contain either an *hrp-hrc* gene cluster nor any orthologues of effectors from the closely related pathogenic isolate *P. syringae* pv. syringae B728a. Genomic DNA of *P. syringae* B728a, *P. syringae* Psy508, and T3SS-deficient *P. syringae* digested with HindIII and EcoRI and analyzed by Southern blotting using either genes of the canonical *hrp-hrc* cluster (*hrpK1, hrpL hrcC,*), the conserved effector locus (*avrE1, hrpW1*), the *hopl1* effector gene (**B**), and the housekeeping gene *gapA* (**C**) as the probe. While *P. syringae* B728a DNA hybridized with all six probes of the PAI as well as the *gapA* probe, T3SS-deficient *P. syringae* hybridized only with the housekeeping gene probe.

Supplemental Information. Amplification conditions for PCR

To detection genes in the *hrp-hrc* cluster (*hrpK1, hrpL, hrcC*), the CEL effectors (*avrE1, hrpW1*) and the hopI1 genes, primers described by Mohr *et al.* (2008) were used for amplification. GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) was used for PCR performed on a Mastercycler epigradient thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), starting with 2 min at 95°C, followed by 33 cycles at 95°C for 30s, at 72°C for 1 min (this temperature was decreased by 0.5°C every cycle until the touchdown temperature of 58°C was reached), and primer extension at 72°C for 1 min. One additional cycle was carried out at an annealing temperature of 58°C, followed by final incubation for 10 min at 72°C, at the fastest ramp rate (4°C s-1) from the denaturation to the annealing step.

Phage PCR, using the forward primer PhF (5'- TCAGGCCGCTTTCAACTTGGC-3') and the reverse primer PhR (5'- CCATAYGGCGCAGTGGTGG- 3'), was performed with conditions starting with 5 min at 95°C, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, at 72°C for 1 min (the temperature was decreased by 0.5°C every cycle until the touchdown temperature of 57°C was reached), and primer extension at 72°C for 1 min. Five additional cycles were carried out at an annealing temperature of 57°C, followed by final incubation for 10 min at 72°C. Negative controls were PCR mixtures with the addition of water in place of template DNA.

To detect the presence of the *hrcC* orthologue of Psy642, colony PCR was performed by placing a small amount of cultured bacteria from a KB plate into 15 µL of PCR reaction mixture including 7.5 µL of 2x Immomix (Bioloine, Taunton, MA, USA) and 0.75 µL each of $hrcC_{\mathrm{Psy642}}$ forward and reverse primer (Clarke *et al.*, 2010). PCR included an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes followed by 35 cycles of 40 seconds denaturation at 94°C, 30 seconds annealing at 58°C, and 1 minute extension at 72 °C. Amplification was concluded with a 10 minute extension at 72 °C. Strains DC3000 and Psy642 were used as the negative and positive controls respectively.

For housekeeping genes, PCR conditions were as described in our previous work (Morris *et al.*, 2008) using primers described by Yamamoto *et al.*(2000) for *rpoD* and *gyrB* and by Sarkar and Guttman (2004) for *cts*. The alternative primers for *gapA*

described by Morris *et al.* (2010) were used when those described by Sarkar and Guttman (2004) did not amplify the *gapA* gene. Amplified products were purified and sequenced as described previously (Morris *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2008).

Table 3. Sources of strains of *P. syringae* from non agricultural habitats
These sources are a subset of the samples described in Table 1.

Substrate	Site	latitude / longitude / altitude	Date	strains	
				HR⁻	HR⁺
River water	Rioul Mounal creek, Haute-Alpes Co., France	44° 31' 58" N 06° 42' 13" E 2100 m	July 2006	UB-015	
			Oct. 2006	UB-218	UB-210
			May 2007	UB-313, 330	
		44° 32' 09" N 06° 42' 12" E 2100 m	July 2006		UB-169, 172
			Oct. 2006	UB-184, 185, 186, 190, 192, 193, 194, 195	UB-197
			May 2007		UB-419, 421
			April 2009	CCV-0050	
		06° 42' 38" E 1880 m 1880 m	June 2009	CCV-0172, 0178, 0180	
	Ubaye River, Hautes-Alpes Co., France	44° 23' 50" N 06° 28' 54" E 1000 m	oct-06	UB-246	
		44° 27' 14" N 06° 23' 13" E 785 m	May 2007		UB-370
	Sauze River, Hautes-Alpes Co., France	44° 20' 40" N 06° 40' 54" E 2100 m	April 2007	SZ-030	SZ-026
			May 2007	SZ-093	SZ-089
		44° 20' 40" N 06° 40' 48" E 2100 m	April 2007	SZ-037, 045, 051	SZ-035, 046, 048, 049
			May 2007	SZ-122, 124	
		44° 20' 11" N 06° 40' 15" E 2500 m	May 2007	SZ-131, 142, 144	SZ-145
	Pisse Creek, Hautes-Alpes Co., France	44° 38' 10" N 06° 47' 19" E 2200 m	June 2009	CCE-284, 286, 291	
		44° 38' 54" N	June 2009	CCE-321, 324	

		06° 47’ 33” E 1690 m			
	Cascade Creek, Grand Teton Park, Wyoming, USA	43° 45’ 54” N 110° 45’ 00” W 2200 m	Aug. 2007	USA-050, 052	USA-032, 046
	Pilgrim Creek, Grand Teton Park, Wyoming, USA	43° 55’ 42” N 110° 33’ 42” W 2140 m	Aug 2007		USA-106
Snowpack	Hautes-Alpes Co., France	44° 41’ 45” N 6° 59’ 12” E 2600 m	June 2006		CC-1569
		44° 20’ 40” N 06° 41’ 57” E 2000 m	May 2009	CSZ-0284, 0297	
Epilithic biofilm	Hautes-Alpes Co., France	44° 41’ 45” N 6° 59’ 12” E 2600 m	June 2006	CC-1582	
	Palisade Falls, Gallatin Co, MT, USA	45° 28’ 18” N 110° 56’ 11” W 2150 m	sept-04	CC-1419	CC-1418, 1422
Primula officinalis	Lozère Co., France	44° 22’ 44” N 03° 47’ 41” E 1300 m	April 2007	TA-043	
	Mézel, Alpes-de-Hautes-Provence Co., France	43° 59’ 22” N 06° 11’ 43” E 580 m	March 2004		CC-0654, 0655, 0657
Primula farinosa	Hautes-Alpes Co., France	44° 38’ 36” N 6° 57’ 20” E 2700 m	June 2006	CC-1504	

Annexe 1. Exemple d'un prélèvement de neige fraîche au Col du Lautaret en novembre 2009

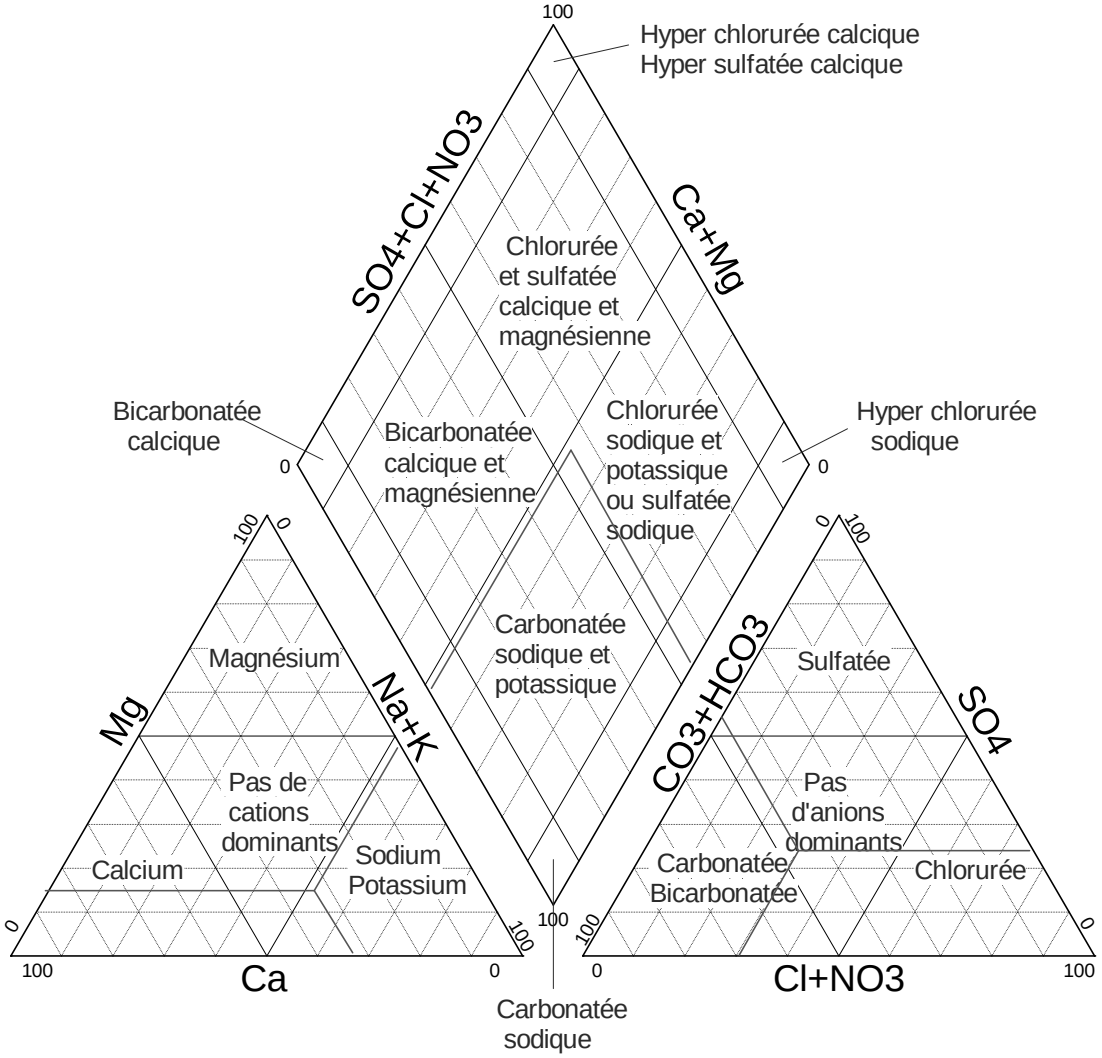
Un sac plastique stérilisé a été déposé sur le sol avant l'évènement de précipitation. L'emplacement a été marqué par un piquet. Dès la fin de l'évènement, un certain volume a été prélevé de manière stérile et traité dès sa fonte.

Annexe 2. Échantillonnage du manteau neigeux

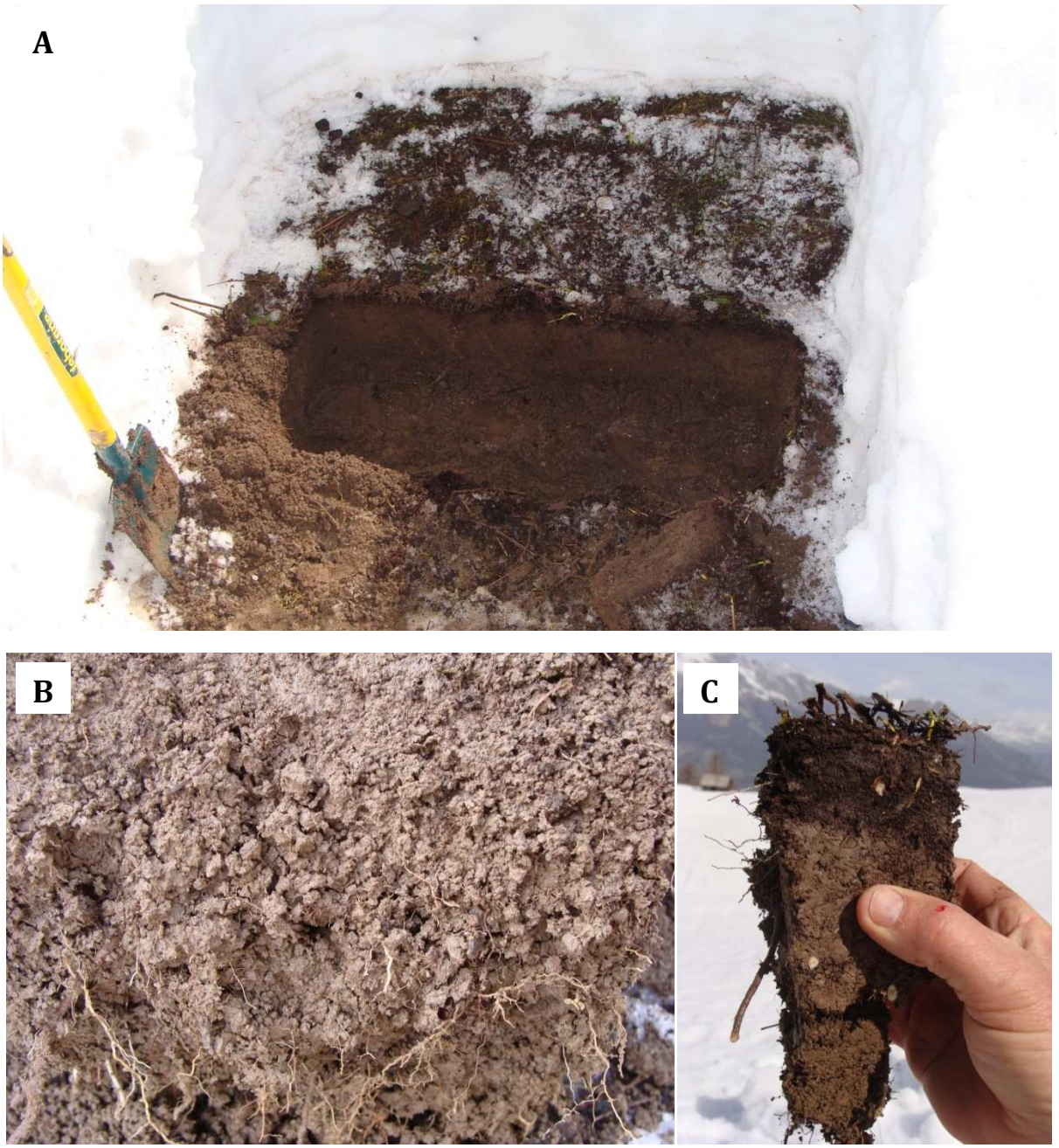
Annexe 3. Construction des microcosmes

Annexe 4. Source du Riou Mounal (versant sud du Col de Vars) le 26 mai 2010
Ces photos illustrent bien l'eau jaillissante du sol dont la concentration en *P. syringae* était de 500 bactéries / L.

Annexe 5. Classification des différents types de faciès chimiques en fonction de la proportion relative de chaque ion et représentée par le diagramme de Piper (Piper, 1944)



Annexe 6. Structure des sols prélevés en montagne.



(**A**) Fosse pour excavation des colonnes de sol. (**B**) On distingue nettement une structure agrégée et grumeleuse du sol avec la présence d'un dense réseau de racines. () La photo montre un gradient de couleur très marqué proche de la surface du sol. Les premiers centimètres sous la surface (couleur marron foncé) correspondent à une forte accumulation de matière organique. La couche de dessous, plus claire, correspond au sol développé à partir de la roche mère. On peut voir les plantules à la surface, les petites racines ainsi que des racines plus grosses coupées (taches blanches).

Annexe 7. Prélèvement des colonnes de sol.

Un trou de 2 m^2 dans la neige a d'abord été creusé, puis sur 30cm de profondeur dans le sol sous-jacent. Le tube en PVC était ensuite posé sur un affleurement, le bord biseauté contre le sol. Progressivement le sol a été retiré autour de la colonne, en même temps que le tube a été enfoncé. Une fois, la colonne prête, elle était refermée des deux extrémités de manière à éviter les échanges avec l'extérieur.

Annexe 8. Dispositif expérimental pour l'estimation du transport de *P. syringae* à travers les colonnes de sable de Fontainebleau.

La suspension bactérienne sous agitation et la solution de $CaCl_2$ étaient injectées dans les colonnes de sable de Fontainebleau stérile grâce à une pompe péristaltique. Le percolât était récupéré dans un flacon stérile enveloppé de papier Kraft pour le protéger des rayons UV. L'ensemble des flacons était recouvert de parafilm et de papier aluminium de manière à éviter les échanges avec l'extérieur.

Annexe 9. Dispositif expérimental pour l'estimation de la survie et du transport de *P. syringae* à travers les colonnes de sol prélevées dans les Alpes du Sud.

De l'eau distillée ou une suspension bactérienne étaient pompées et pulvérisées goutte à goutte sur la surface des colonnes de sol. Les colonnes étaient posées sur une plaque perforée stérile permettant de maintenir le sol dans la colonne tout en laissant passer les liquides. Le percolât était dirigé dans un flacon par un entonnoir stérile. L'espace entre le goulot et les bords de l'entonnoir était recouvert de papier aluminium.

BIBLIOGRAPHIE

Abramson A, Brown B (2007). Influence of solution ionic strength on the collision efficiency distribution and predicted transport distance of a *Sphingomonas* sp. flowing through porous media. *Water Resour Res* **41:** 4435-4445.

Abu-Ashour J, Joy DM, Lee H, Whiteley HR, Zelin S (1994). Transport of microorganisms through soil. *Water Air & Soil Poll* **75:** 141-158.

Alfano JR, Charkowski AO, Deng WL, Badel JL, Petnicki-Ocwieja T, Van Dijk K *et al* (2000). The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 4856.

Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, Sattler B, Glockner FO, Wille A *et al* (1996). Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl Env Microbiol* **62:** 2138-2144.

Almeida NF, Yan S, Cai R, Clarke CR, Morris CE, Schaad NW *et al* (2010). PAMDB, A Multilocus Sequence Typing and Analysis Database and Website for Plant-Associated Microbes. *Phytopathology* **100:** 208-215.

Almeida NF, Yan S, Lindeberg M, Studholme DJ, Schneider DJ, Condon B *et al* (2009). A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* **22:** 52-62.

Amato P, Parazols M, Sancelme M, Laj P, Mailhot G, Delort AM (2007a). Microorganisms isolated from the water phase of tropospheric clouds at the Puy de Dome: major groups and growth abilities at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol* **59:** 242-254.

Amato P, Parazols M, Sancelme M, Mailhot G, Laj P, Delort AM (2007b). An important oceanic source of micro-organisms for cloud water at the Puy de Dome (France). *Atmos Environ* **41:** 8253-8263.

Araki H, Tian D, Goss EM, Jakob K, Halldorsdottir SS, Kreitman M *et al* (2006). Presence/absence polymorphism for alternative pathogenicity islands in *Pseudomonas viridiflava*, a pathogen of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103:** 5887-5892.

Aylor DE (1990). The role on intermittent wind in the dispersal on fungal pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **28:** 73-92.

Aylor DE (1998). The aerobiology of apple scab. *Plant Dis* **82:** 838-849.

Aylor DE (2003). Spread of plant disease on a continental scale: Role of aerial dispersal of pathogens. *Ecology* **84:** 1989-1997.

Aylor DE, Flesch TK (2001). Estimating spore release rates using a Lagrangian stochastic simulation model. *J Appl Meteorol* **40:** 1196-1208.

Aylor DE, Schmale DG, Shields EJ, Newcomb M, Nappo CJ (2011). Tracking the potato late blight pathogen in the atmosphere using unmanned aerial vehicles and Lagrangian modeling. *Agr Forest Meteorol* **151:** 251-260.

Aylor DE, Taylor GS, Raynor GS (1982). Long-range transport of tobacco blue mold spores. *Agr Meteorol* **27:** 217-232.

Balestra GM, Mazzaglia A, Quattrucci A, Renzi M, Rossetti A (2009). Occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Jin Tao kiwi plants in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* **48:** 299-301.

Balestra GM, Renzi M, Mazzaglia A (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports* **22:** 10.

Baltrus DA, Nishimura MT, Romanchuk A, Chang JH, Shahid Mukhtar M, Cherkis K *et al* (2011). Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative

genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* **7:** e1002132.

Battin TJ, Wille A, Psenner R, Richter A (2004). Regional hydrology controls stream microbial biofilms: evidence from a glacial catchment. *Biogeosci Discuss* **1:** 497-531.

Bauer H, Giebl H, Hitzenberger R, Kasper-Giebl A, Reischl G, Zibuschka F *et al* (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *J Geophys Res-Atmos* **108:** 5.

Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol R* **63:** 266-+.

Berggren M, Laudon H, Haei M, Ström L, Jansson M (2010). Efficient aquatic bacterial metabolism of dissolved low-molecular-weight compounds from terrestrial sources. *ISME J* **4:** 408–416.

Bernal S, Butturini A, Sabater F (2002). Variability of DOC and nitrate responses to storms in a small Mediterranean forested catchment. *Hydrol Earth Syst Sci* **6:** 1031–1041.

Berti AD, Greve NJ, Christensen QH, Thomas MG (2007). Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J Bacteriol* **189:** 6312-6323.

Block A, Alfano JR (2011). Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr Opin Microbiol* **14:** 39-46.

Bogaard T, Guglielmi Y, Marc V, Emblanch C, Bertrand C, Mudry J (2007). Hydrogeochemistry in landslide research: a review. *B Soc Geol Fr* **178:** 113-126.

Bogaard TA, Antoine P, Desvarreux P, Giraud A, Van Asch TWJ (2000). The slope movements within the Mondorès graben (Drôme, France); the interaction between geology, hydrology and typology. *Eng Geol* **55**.

Bowers RM, Lauber CL, Wiedinmyer C, Hamady M, Hallar AG, Fall R *et al* (2009). Characterization of Airborne Microbial Communities at a High-Elevation Site and Their Potential To Act as Atmospheric Ice Nuclei. *Appl Env Microbiol* **75:** 5121-5130.

Bowers RM, McLetchie S, Knight R, Fierer N (2011). Spatial variability in airborne bacterial communities across land-use types and their relationship to the bacterial communities of potential source environments. *ISME J* **5:** 601-612.

Bradbury JF (1986). *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International.

Brittain JE, Milner AM (2001). Ecology of glacier-fed rivers: current status and concepts. *Freshwater Biol* **46:** 1571-1578.

Brooks PD, Williams MW (1999). Snowpack controls on nitrogen cycling and export in seasonally snow-covered catchments. *Hydrol Process* **13:** 2177-2190.

Brooks PD, Williams MW, Schmidt SK (1996). Microbial activity under alpine snowpacks, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry* **32:** 93-113.

Brown DG, Abramson A (2006). Collision efficiency distribution of a bacterial suspension flowing through porous media and implications for field-scale transport. *Water Res* **40:** 1591-1598.

Brown LE, Hannah DM, Milner AM (2003). Alpine stream habitat classification: An alternative approach incorporating the role of dynamic water source contributions. *Arct Antarc Alp Res* **35:** 313-322.

Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML *et al* (2003). The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 10181-10186.

Burnham KP, Anderson DR (2002). *Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach*. 2nd Edition. Springer-Verlag: New York, USA, 488 pp.pp.

Burrows SM, Butler T, Jöckel P, Tost H, Kerkweg A, Pöschl U *et al* (2009a). Bacteria in the global atmosphere – Part 2: Modeling of emissions and transport between different ecosystems. *Atmos Chem Phys* **9:** 9281-9297.

Burrows SM, Elbert W, Lawrence MG, Poschl U (2009b). Bacteria in the global atmosphere - Part 1: Review and synthesis of literature

data for different ecosystems. *Atmos Chem Phys* **9:** 9263-9280.

Buttner MP, Amy PS (1989). Survival of ice nucleation-active and genetically engineered non-ice-nucleating *Pseudomonas syringae* strains after freezing. *Appl Env Microbiol* **55:** 1690-1694.

Campbell DH, Clow DW, Ingersoll GP, Mast MA, Spahr NE, Turk JT (1995). Processes controlling the chemistry of two snowmlet-dominted streams in the Rocky Monutains. *Water Resour Res* **31:** 2811-2821.

Camper AK, Hayes JT, Sturman PJ, Jones WL, Cunningham AB (1993). Effects of motility and adsorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media *Appl Env Microbiol* **59:** 3455-3462.

Cao Z, Buttani V, Losi A, Gaertner W (2008). A blue light inducible two-component signal transduction system in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Biophys J* **94:** 897-905.

Casareto BE, Suzuki Y, Okada K, Morita M (1996). Biological micro-particles in rain water. *Geophys Res Lett* **23:** 173-176.

Cases I, de Lorenzo V, Ouzounis CA (2003). Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. *Trends Microbiol* **11:** 248-253.

Celle-Jeanton H, Travi Y, Loye-Pilot MD, Huneau F, Bertrand G (2009). Rainwater chemistry at a Mediterranean inland station (Avignon, France): Local contribution versus long-range supply. *Atmos Res* **91:** 118-126.

Chen M (1988). Pollution of ground water by nutrients and fecal coliforms from lakeshore septic tank systems. *Water Air & Soil Poll* **37:** 407-417.

Christner BC, Cai R, Morris CE, McCarter KS, Foreman CM, Skidmore ML *et al* (2008). Geographic, seasonal, and precipitation chemistry influence on the abundance and activity of biological ice nucleators in rain and snow. *Proc Natl Acad Sci USA*.

Clarke CR, Cai R, Studholme DJ, Guttman DS, Vinatzer BA (2010). *Pseudomonas syringae* strains naturally lacking the classical *P. syringae hrp/hrc* locus are common leaf colonizers equipped with an atypical type III secretion system. *Mol Plant Microbe In* **23:** 198-210.

Cline D (1995). Snow surface energy exchanges and snowmelt at a continental alpine site. In: Tonnessen KA, Williams, M.W., Tranter, M. (ed). *Biogeochemistry of Seasonally Snow-covered Basins*. International Association for Hydrological Sciences. pp 157-166.

Coléou C, Xu K, Lesaffre B, Broska J (1999). Capillary rise in snow. *Hydrol Process* **13:** 1721-1732.

Collmer A, Badel JL, Charkowski AO, Deng WL, Fouts DE, Ramos AR *et al* (2000). *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 8770.

Constantinidou HA, Hirano SS, Baker LS, Upper CD (1990). Atmospheric dispersal of ice nucletation active bacteria - The role of rain. *Phytopathology* **80:** 934-937.

Cornelis GR, Van Gijsegem F (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Phytopathol* **54:** 735-774.

Crosse JE (1959). Bacterial canker of stone fruits : IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. . *Ann Appl Biol* **47:** 306-317.

Cruz L, Cruz J, Eloy M, Oliveira H, Vaz H, Tenreiro R (2010). First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Race 1 in Portugal. *Plant Dis* **94:** 1504-1505.

Cunnac S, Lindeberg M, Collmer A (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr Opin Microbiol* **12:** 53-60.

Dangl JL, Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411:** 826-833.

Davis JM (1987). Modeling the long-range transport of plant pathogens in the atmosphere. *Annu Rev Phytopathol* **25:** 169-188.

Delmas V, Jones HG, Tranter M, Delmas R (1996). The weathering of aeolian dusts in alpine snows. *Atmos Environ* **30:** 1317-1325.

Delort AM, Vaitilingom M, Amato P, Sancelme M, Parazols M, Mailhot G *et al* (2010). A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmos Res* **98:** 249-260.

Destefano SAL, Rodrigues LMR, Beriam LOS, Patricio FRA, Thomaziello RA, Rodrigues-Neto J (2010). Bacterial leaf spot of coffee caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in Brazil. *Plant Pathol* **59:** 1162-1163.

Downie JA (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34:** 150-170.

Draxier RR, Hess GD (1998). An overview of the HYSPLIT_4 modelling system for trajectories, dispersion and deposition. *Australian Meteorological Magazine* **47:** 295-308.

Draxler RR, Hess GD (1998). An overview of the HYSPLIT_4 modelling system for trajectories, dispersion and deposition. *Aus Meteorol Mag* **47:** 295-308.

Dumenyo CK, Mukherjee A, Chun W, Chatterjee AK (1998). Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *Eur J Plant Pathol* **104:** 569 -582.

Dye DW, Bradbury JF, Goto M, Hayward AC, Lelliott RA, Schroth MN (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev Plant Pathol* **59:** 153-168.

Edwards AC, Scalenghe R, Freppaz M (2007). Changes in the seasonal snow cover of alpine regions and its effect on soil processes: A review. *Quatern Int* **162:** 172-181.

Edwards SG, Seddon B (2001). Selective media for the specific isolation and enumeration of *Botrytis cinerea* conidia. *Lett Appl Microbiol* **32:** 63-66.

Elimelech M, Nagai M, Ko CH, Ryan JN (2000). Relative insignificance of mineral grain zeta potential to colloid transport in geochemically heterogeneous porous media. *Environ Sci Tech* **34:** 2143-2148.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* **14:** 2611-2620.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164:** 1567-1587.

Fatmi M, Bougsiba M, Hosni T (2008). Angular leaf spot of Cucurbits: a bacterial disease in expansion in Marocco. In: Fatmi M, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield J, Murillo J, Schaad NW *et al* (eds). *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens - Identification, epidemiology and genomics.* Springer.

Feil H, Feil W, Chain P, Larimer F, DiBartolo G, Copeland A *et al* (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000 . *Proc Natl Acad Sci USA* **102:** 11064-11069.

Felip M, Camarero L, Catalan J (1999). Temporal changes of microbial assemblages in the ice and snow cover of a high mountain lake. *Limnol Oceanogr* **44:** 973-987.

Felip M, Sattler B, Psenner R, Catalan J (1995). Highly active microbial communities in the ice and snow cover of high moutain lakes. *Appl Env Microbiol* **61:** 2394-2401.

Fenn CR (1987). Electrical conductivity. In: Gurnell AM and Clark MJ (eds). *Glacio-fluvial sediment transfert.* Wiley: Chichester, UK.

Ferrante P, Scortichini M (2010). Molecular and phenotypic features of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated during recent epidemics of bacterial canker on yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in central Italy. *Plant Pathol* **59:** 954-962.

Fierer N, Liu Z, Rodriguez-Hernandez M, Knight R, Henn M, Hernandez MT (2008). Short-term temporal variability in airborne bacterial and fungal populations. *Appl Env Microbiol* **74:** 200-207.

Fierer N, Morse JL, Berthrong ST, Bernhardt ES, Jackson RB (2007). Environmental controls

on the landscape-scale biogeography of stream bacterial communities. *Ecology* **88:** 2162-2173.

Fontes DE, Mills AL, Hornberger GM, Herman JS (1991). Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl Env Microbiol* **57:** 2473-2481.

Franc GD. (1988). Colorado State University: Fort Collins, pp 131.

France JL, King MD, Lee-Taylor J (2007). Hydroxyl (OH) radical production rates in snowpacks from photolysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) and nitrate (NO_3^-). *Atmos Environ* **41:** 5502-5509.

Gaignard JL, Luisetti J (1993). *Pseudomonas syringae*, an epiphytic ice nucleation active and phytopathogenic bacterium. *Agronomie* **13:** 333-370.

Gannon JT, Manilal VB, Alexander M (1991). Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl Env Microbiol* **57:** 190-193.

Gardan L, Shafik H, Belouin S, Broch R, Grimont F, Grimont PAD (1999). DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Syst Bacteriol* **49:** 469-478.

Gargiulo G, Bradford SA, Simunek J, Ustohal P, Vereecken H, Klumpp E (2008). Bacteria transport and deposition under unsaturated flow conditions: The role of water content and bacteria surface hydrophobicity. *Vadose Zone J* **7:** 406-419.

Gavazov KS (2010). Dynamics of alpine plant litter decomposition in a changing climate. *Plant Soil* **337:** 19-32.

Getz S, Fulbright DW, Stephens CT (1983). Scanning electron microscopy of infection sites and lesion development on tomato fruit infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology* **73:** 39-43.

Ginn TR, Wood BD, Nelson KE, Scheibe TD, Murphy EM, Clement TP (2002). Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Adv Water Resour* **25:** 1017-1042.

Gladieux P, Zhang X-G, Afoufa-Bastien D, Sanhueza R-MV, Sbaghi M, Le Cam B (2008). On the Origin and Spread of the Scab Disease of Apple: Out of Central Asia. *PLoS ONE* **3**.

Golzar H, Cother EJ (2008). First report of bacterial necrosis of mango caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Australia. *Australas Plant Dis N* **3:** 107-109.

Gomelsky M, Hoff WD (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol* **19:** 441-8.

Gran G (1952). Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* **77:** 661-671.

Green S, Studholme DJ, Laue BE, Dorati F, Lovell H, Arnold D *et al* (2010). Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS ONE* **5:** e10224.

Gregory PH (1961). *The microbiology of the atmosphere*. L. Hill ; New York, Interscience Publishers: London.

Griffin DW (2007). Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health. *Clin Microbiol Re* **20:** 459-477.

Gross DC (1985). Regulation of syringomycin synthesis in *Pseudomonas syringae* pv *syringae* and defined conditions for its production. . *J Appl Bacteriol* **58:** 167-174.

Gross DC, Devay JE (1977). Role of syringomycin in holcus spot of maize and systemic necrosis of cowpea caused by *Pseudomonas syringae*. *Physiol Plant Pathol* **11:** 1-&.

Guenzi E, Galli G, Grgurina I, Gross DC, Grandi G (1998). Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster: a link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* **273:** 32857–32863.

Guttman DS, Gropp SJ, Morgan RL, Wang PW (2006). Diversifying selection drives the evolution of the type III secretion system pilus of *Pseudomonas syringae*. *Mol Biol Evol* **23:** 2342-2354.

Habets F, *et al.* (2008). The SAFRAN-ISBA-MODCOU hydrometeorological model applied over France. *J Geophys Res* **113**.

Haefele DM, Lindow SE (1987). Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Appl Env Microbiol* **53:** 2528-2533.

Hannah DM, Brown LE, Milner AM, Gurnell AM, McGregord GR, Petts GE *et al* (2007). Integrating climate-hydrology-ecology for alpine river systems. *Aquat Conserv* **17:** 636-656.

Hannah DM, Wood PJ, Sadler JP (2004). Ecohydrology and hydroecology: A new paradigm'? *Hydrol Process* **18:** 3439-3445.

Hattingh MJ, Roos IMM, Mansvelt EL (1989). Infection and systemic invasion of deciduous fruit trees by *Pseudomonas syringae* in South Africa. *Plant Dis* **73:** 784-789.

He SY (1996). Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol.* **112:** 865-869.

He SY, Nomura K, Whittman TS (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochemica et Biophysica Acta*: 181-206.

Helmut B (1997). Bacterial canker on apple, pear, and cherry during recent years in Germany. In: Rudolph K, Burr TJ, Mansfield J, Stead DE, Vivian A and Von Kietzell J (eds). *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Neverlands.

Herlihy LJ, Galloway JN, Mills AL (1987). Bacterial utilization of formic and acetic-acid in rainwater. . *Atmos Environ* **21:** 2397-2402.

Hieber M, Robinson CT, Rushforth SR, Uehlinger U (2001). Algal communities associated with different alpine stream types. *Arct Antarc Alp Res* **33:** 447-456.

Hirano SS, Baker LS, Upper CD (1996). Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Appl Env Microbiol* **62:** 2560-2566.

Hirano SS, Rouse DI, Clayton MK, Upper CD (1995). *Pseudomonas syringae* pv *syringae* and bacterial brown spot of snap bean : a study of epiphetic phytopathogenic bacteria and associated disease. *Plant Dis* **79:** 1085-1093.

Hirano SS, Upper CD (1990). Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae*. *Annu Rev Phytopathol* **28:** 155-177.

Hirano SS, Upper CD (1993). Dynamics, spread, and persistence of a single genotype of *Pseudomonas syringae* relative to those of its conspecifics on populations of snap bean leaflets. *Appl Env Microbiol* **59:** 1082-1091.

Hirano SS, Upper CD (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* **64:** 624-653.

Hodson A, Anesio AM, Tranter M, Fountain A, Osborn M, Priscu J *et al* (2008). Glacial ecosystems. *Ecol Monogr* **78:** 41-67.

Hollaway GJ, Bretag TW, Price TV (2007). The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) of field pea (*Pisum sativum*) in Australia: a review. *Austr. J. Exp. Agric.* **58:** 1086-1099.

Hortnagl P, Perez MT, Zeder M, Sommaruga R (2010). The bacterial community composition of the surface microlayer in a high mountain lake. *FEMS Microbiol Ecol* **73:** 458-467.

Hueck CJ (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol R* **62:** 379-+.

Hutchison ML, Gross DC (1997). Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe In* **10:** 347-354.

Ignjatov M, Balaz J, Milosevic M, Vidic M, Popovic T (2008). Studies on plant pathogenic bacterium causal agent of soybean bacterial spots (*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young et al.). In: Fatmi M, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield J, Murillo J, Schaad NW *et al* (eds). *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens - Identification, epidemiology and genomics.* Springer.

Igraham JL (1958). Growth of psychrophilic bacteria. *J Bacteriol* **76:** 75-80.

Isard SA, Gage SH, Comtois P, Russo JM (2005). Principles of the atmospheric pathway for invasive species applied to soybean rust. *Bioscience* **55:** 851-861.

Jacobs A, Lafolie F, Herry JM, Debroux M (2007). Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate. *Colloid Surface B* **59:** 35-45.

Jelenska J, Yao N, Vinatzer BA, Wright CM, Brodsky JL, Greenberg JT (2007). A J-domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Current Biol* **17:** 499-508.

Joardar V, Lindeberg M, Jackson RW, Selengut J, Dodson R, Brinkac LM *et al* (2005). Whole-genome sequence analysis of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* **187:** 6488-6498.

Jock S, Kim WS, Barny MA, Geider K (2003). Molecular characterization of natural *Erwinia pyrifoliae* strains deficient in hypersensitive response. . *Appl Environ Microbiol* **69:** 679-682.

Jombart T (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* **24:** 1403-1405.

Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature* **444:** 323-329.

Kellogg CA, Griffin DW (2006). Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends Ecol Evol* **21:** 638-644.

Kerkoud M, Manceau C, Gardan L, Samson R, Paulin JP (2000). Epiphytic occurrence of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* (Rose) in France, where blister spot has never been seen. *Eur J Plant Pathol* **106:** 481-485.

Kerr A (1987). Daniel Mcalpine Memorial Lecture. Agrobacterium: Pathogen, Genetic Engineer and Biological Control Agent. *Australas Plant Path* **16:** 45-47.

Kim HN, Bradford SA, Walker SL (2009a). *Escherichia coli* O157: H7 transport in saturated porous media: role of solution chemistry and surface macromolecules. *Environ Sci Tech* **43:** 4340-4347.

Kim HS, Ma B, Perna NT, Charkowski AO (2009b). Phylogeny and virulence of naturally occurring type III secretion system-deficient *Pectobacterium* strains. *Appl Env Microbiol* **75:** 4539-4549.

King EO, Ward MK, Raney DE (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* **44:** 301-7.

Kinkel LL (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annu Rev Phytopathol* **35:** 327-347.

Kitten T, Kinscherf TG, McEvoy JL, Willis DK (1998). A newly-identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol. Microbiol.* **28:** 917-929.

Kniskern JM, Barrett LG, Bergelson J (2011). Maladaptation in wild populations of the generalist plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Evolution* **65:** 818-830.

Koh YJ, Kim GH, Jung JS, Lee YS, Hur JS (2010). Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea. *New Zeal J Crop Hort* **38:** 275-282.

Kourtev PS, Hill KA, Shepson PB, Konopka A (2011). Atmospheric cloud water contains a diverse bacterial community. *Atmos Environ* **45:** 5399-5405.

Kritzman G, Zutra D (1983). Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in soil, plant debris, and the rhizosphere of non-host plants. *Phytoparasitica* **11:** 99-108.

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, *et al* (2004). Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **53:** 1617-1623.

Kumar S, Tamura K, Nei M (1994). MEGA - molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **10:** 189-191.

Lafaysse M, Hingray B, Etchevers P, Martin E, Obled C (2011). Influence of spatial discretization, underground water storage

and glacier melt on a physically-based hydrological model of the Upper Durance River basin. *J Hydrol* **403:** 116-129.

Lamichhane JR, Kshetri MB, Mazzaglia A, Varvaro L, Balestra GM (2010). Bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 0: first report in Nepal. *Plant Pathol* **59:** 401-401.

Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN (1996). Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by non pathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-supressive soil. *Phytopathology* **86:** 812-819.

Lawrence JR, Hendry MJ (1996). Transport of bacteria through geologic media. *Can J Microbiol* **42:** 410-422.

Leben C (1965). Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu Rev Phytopathol* **3:** 209-230.

Lehning M, Volksch I, Gustafsson D, Nguyen TA, Stahli M, Zappa M (2006). ALPINE3D: a detailed model of mountain surface processes and its application to snow hydrology. *Hydrol Process* **20:** 2111-2128.

Lelliott RA, Billing E, Hayward AC (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J Appl Bacteriology* **29:** 470-89.

Ley RE, Williams MW, Schmidt SK (2004). Microbial population dynamics in an extreme environment: controlling factors in talus soils at 3750 m in the Colorado Rocky Mountains. *Biogeochemistry* **68:** 313-335.

Lighthart B (1997). The ecology of bacteria in the alfresco atmosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **23:** 263-274.

Lighthart B (1999). An hypothesis describing the general temporal and spatial distribution of alfresco bacteria in the earth's atmospheric surface layer. *Atmos Environ* **33:** 611-615.

Lighthart B, Shaffer BT (1997). Increased airborne bacterial survival as a function of particle content and size. *Aerosol Sci Tech* **27:** 439-446.

Lighthart B, Shaffer BT, Marthi B, Ganio LM (1993). Artificial wind-gust liberation of microbial bioaerosols previously deposited on plants. *Aerobiologia* **9:** 189-196.

Lindemann J, Arny DC, Upper CD (1984). Epiphytic population of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on snap bean and nonhost plants and the incidence of bacterial brown spot disease in relation to cropping patterns. *Phytopathology* **74:** 1329-1333.

Lindemann J, Constantinidou HA, Barchet WR, Upper CD (1982). Plants as sources of airborne bacteria, including ice nucleation active bacteria. *Appl Environ Microb* **44:** 1059-1063.

Lindemann J, Suslow TV (1987). Competition between ice nucleation-active wild type and ice nucleation-deficient deletion mutant strains of *Pseudomonas syringae* and *P. fluorescens* biovar I and biological control of frost injury on strawberry blossoms. *Phytopathology* **77:** 882-886.

Lindemann J, Upper CD (1985). Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Appl Env Microbiol* **50:** 1229.

Lindow SE (1983). The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu Rev Phytopathol* **21:** 363-384.

Lindow SE (1987). Competitive exclusion of epiphytic bacteria by Ice-*Pseudomonas syringae* mutants. *Appl Env Microbiol* **53:** 2520.

Lindow SE, Brandl MT (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Appl Env Microbiol* **69:** 1875-1883.

Lipson DA, Schadt CW, Schmidt SK (2002). Changes in soil microbial community structure and function in an alpine dry meadow following spring snow melt. *Microbial Ecol* **43:** 307-314.

Lipson DA, Schmidt SK, Monson RK (1999). Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology* **80:** 1623-1631.

Liu Y, Yang CH, Li J (2007). Influence of extracellular polymeric substances on *Pseudomonas aeruginosa* transport and deposition profiles in porous media. *Environ Sci Tech* **41:** 198-205.

Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, Debruijn FJ (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generetad with repetitive sequences and PCR. . *Appl Env Microbiol* **60:** 2286-2295.

Loye-Pilot MD, Morelli J (1988). Fluctuations of ionic composition of precipitations collected in Corsica related to changes in the origins of incoming aerosols. . *Journal of Aerosol Science* **19:** 577-585.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* **63:** 541-556.

Maki LR, Galyan EL, Chang-Chien MM, Caldwell DR (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae. Appl Microbiol* **28:** 456-9.

Manly B (1997). *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*: London.

Marchetti M, Capela D, Glew M, Cruveiller S, Chane-Woon-Ming B, Gris C *et al* (2010). Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol* **8:** e1000280.

Marinoni A, Laj P, Sellegri K, Mailhot G (2004). Cloud chemistry at the Puy de Dome: variability and relationships with environmental factors. *Atmos Chem Phys* **4:** 715-728.

Marshall KC (1976). Interfaces in microbial biology. *M8 xii* **156**.

Marshall KC, Stout R, Mitchell R (1971). Selective sorption of bacteria from seawater. *Can J Microbiol* **17:** 1413-1416.

Mattick JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56:** 289-314.

Matz C, Nouri B, McCarter L, Martinez-Urtaza J (2011). Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists. *PLoS ONE* **6:** e20275.

McCarter SM, Jones JB, Gitaitis RD, Smitley DR (1983). Survival of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. *Phytopathology* **73:** 1393-1398.

McCullagh P, Nelder JA (1989). *Generalized Linear Models*. 2nd Ed. Chapman & Hall/CRC
Boca Raton.

McEldowney S, Fletcher M (1986). Effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *Microbiology* **132:** 513.

McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* **40:** 443-+.

Menard M, Sutra L, Luisetti J, Prunier JP, Gardan L (2003). *Pseudomonas syringae* pv. *avii* (pv. nov.), the causal agent of bacterial canker of wild cherries (*Prunus avium*) in France. *Eur J Plant Pathol* **109:** 565-576.

Mention P, Lavigne D, Leix- Henry F, Bochu S, Morris CE, Prior P *et al* (2004). Bactériose du melon : acquis et perspectives. *PHM Revue Horticole*: 22-26.

Miller Jr. RG (1981). *Simultaneous Statistical Inference*. Springer-Verlag.

Milner AM, Brown LE, Hannah DM (2009). Hydroecological response of river systems to shrinking glaciers. *Hydrol Process* **23:** 62-77.

Mithani A, Hein J, Preston GM (2011). Comparative Analysis of Metabolic networks provides insight into the evolution of plant pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Pseudomonas*. *Mol Biol Evol* **28:** 483-499.

Mitrev S, Gardan L, Samson R (2000). Characterization of bacterial strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from pepper leaf spot in Macedonia. *J Plant Pathol* **82:** 227-231.

Mo Y-Y, Gross DC (1991). Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* **173:** 5784–5792.

Mohan SK, Schaad NW (1987). An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. syringae* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology* **77:** 1390-1395.

Möhler O, Georgakopoulos DG, Morris CE, Benz S, Ebert V, Hunsmann S *et al* (2008).

Heterogeneous ice nucleation activity of bacteria: new laboratory experiments at simulated cloud conditions. *Biogeosciences* **5:** 1425-1435.

Mohr TJ, Liu H, Yan S, Morris CE, Castillo JA, Jelenska J *et al* (2008). Naturally occurring nonpathogenic isolates of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* lack a type III secretion system and effector gene orthologues. *J Bacteriol* **190:** 2858-2870.

Monier JM, Lindow SE (2003a). Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation of leaf surfaces. *Proc Natl Acad Sci USA* **100:** 15977-15982.

Monier JM, Lindow SE (2003b). *Pseudomonas syringae* responds to the environment on leaves by cell size reduction. *Phytopathology* **93:** 1209-1216.

Monson RK, Burns SP, Williams MW, Delany AC, Weintraub M, Lipson DA (2006). The contribution of beneath-snow soil respiration to total ecosystem respiration in a high-elevation, subalpine forest. *Global Biogeochemical Cycles* **20:** 13.

Monteil CL, Bardin M, Morris CE (submitted-a). Occurrence of *Pseudomonas syringae* in rain and snowfall is markedly influenced by the origin, temperature and the incident solar radiation of the associated air masses. *Biogeosciences*.

Monteil CL, Guilbaud C, Glaux C, Lafolie F, Soubeyrand S, Morris CE (submitted-b). Leaf litter in alpine prairies is a reservoir of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* contributing to its dynamics in snowpack. *Env Microbiol*.

Monteil CL, Laurent J, Lafolie F, C.E. M (in preparation). Estimation of the rate of transfer of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* in porous media relative to bacterial surface charge and water conductivity.

Montety Vd, Marc V, Emblanch C, Malet JP, Bertrand C, Maquaire O *et al* (2007). Identifying the origin of groundwater and flow processes in complex landslides affecting black marls: insights from a hydrochemical survey. *Earth Surf Proc Land* **32:** 32-48.

Morris CE (2001). Phyllosphere. *Encyclopedia of life sciences*: 1-8.

Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H *et al* (2002). Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol Molecular Biol Rev* **66:** 592 - 616.

Morris CE, Bardin M, Kinkel LL, Moury B, Nicot PC, Sands DC (2009). Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens* **5:** e1000693.

Morris CE, Georgakopoulos DG, Sands DC (2004). Ice nucleation active bacteria and their potential role in precipitation. *J Phys IV* **121:** 87-103.

Morris CE, Glaux C, Latour X, Gardan L, Samson R, Pitrat M (2000). The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology* **90:** 636-646.

Morris CE, Kinkel LL, Xiao K, Prior P, Sands DC (2007). Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect Gen Evol* **7:** 84-92.

Morris CE, Sands DC, Bardin M, Jaenicke R, Vogel B, Leyronas C *et al* (2011). Microbiology and atmospheric processes: research challenges concerning the impact of airborne micro-organisms on the atmosphere and climate. *Biogeosciences* **8:** 17-25.

Morris CE, Sands DC, Vanneste JL, Montarry J, Oakley B, Guilbaud C *et al* (2010). Inferring the evolutionary history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* from its biogeography in headwaters of rivers in North America, Europe, and New Zealand. *mBio* **1:** 1 - 10.

Morris CE, Sands DC, Vinatzer BA, Glaux C, Guilbaud C, Buffiere A *et al* (2008). The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *ISME J* **2:** 321-334.

Nazir R, Warmink JA, Boersma H, van Elsas JD (2010). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiol Ecol* **71:** 169-185.

Nemecek-Marshall M, Laduca R, Fall R (1993). High level expression of ice nuclei in a *Pseudomonas syringae* strain is induced by nutrient limitation and low temperature. *J Bacteriol* **175:** 4062-4070.

Newton RJ, Jones AE, Eiler A, McMahon KD, Bertilsson S (2011). A guide to the natural history of freshwater lake bacteria. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* **75:** 14-49.

O'Brien HE, Desveaux D, Guttman DS (2010). Next-generation genomics of *Pseudomonas syringae*. *Curr Opin Microbiol* **14:** 24-30.

O'brien RD, Lindow SE (1989). Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology* **79:** 619-627.

Obradovic A, Gavrilovic V, Ivanovic M, Gasic K (2008). *Pseudomonas* blight of Raspberry in Serbia. In: Fatmi M, Collmer A, Iacobellis NS, Mansfield J, Murillo J, Schaad NW *et al* (eds). *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens - Identification, epidemiology and genomics.* Springer.

Oki T, Kanae S (2006). Global hydrological cycles and world water resources. *Science* **313:** 1068-1072.

Ostman O, Drakare S, Kritzberg ES, Langenheder S, Logue JB, Lindstrom ES (2010). Regional invariance among microbial communities. *Ecol Lett* **13:** 118-127.

Pallen MJ, Beatson SA, Bailey CM (2005). Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perpective. *FEMS Microbiol Rev* **29:** 201-229.

Palmer DA, Bender CL (1993). Effects of environmental and nu-tritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Appl Env Microbiol* **59:** 1619-626.

Pan Z, Yang XB, Pivonia S, Xue L, Pasken R, Roads J (2006). Long-term prediction of soybean rust entry into the Continental United States. *Plant Dis* **90:** 840-846.

Panconesi A (1999). Canker stain of plane trees: a serious danger to urban plantings in Europe. *J Plant Pathol* **81:** 3-15.

Pasichnik L, Gvozdyak R, Chodos S (1997). Heterogeneity of the natural population of *Pseudomonas syringae* pathovars. In: Rudolph K, Burr TJ, Mansfield J, Stead DE, Vivian A and Von Kietzell J (eds). *Pseudomonas syringae pathovars and related pathogens*. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Neverlands.

Pearce DA, Bridge PD, Hughes KA, Sattler B, Psenner R, Russell NJ (2009). Microorganisms in the atmosphere over Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol* **69:** 143-157.

Pezet R, Pont V (1990). Ultrastructural observations of pterostilbene fungotoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *J Phytopathol* **129:** 19-30.

Pfender W, Graw R, Bradley W, Carney M, Maxwell L (2006). Use of a complex air pollution model to estimate dispersal and deposition of grass stem rust urediniospores at landscape scale. *Agr Forest Meteorol* **139:** 138-153.

Piper AM (1944). A graphic procedure in geochemical interpreta-tion of water analyses. *Trans Am Geophys Union* **25:** 914-923.

Polymenakou PN, Mandalakis M, Stephanou EG, Tselepides A (2008). Particle size distribution of airborne microorganisms and pathogens during an intense African dust event in the eastern Mediterranean. *Environ Health Perspectives* **116:** 292-296.

Pradhanang PM (1999). Transmission of *Ralstonia solanacearum* through drainage water. *Bacterial Wilt Newsletter*: 5-7.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155:** 945-959.

Quantum GIS Development Team. (2011). Project. OSGF (ed.).

Quiñones B, Dulla G, Lindow SE (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe In* **18:** 682-693.

Quiñones B, Pujol CJ, Lindow SE (2004). Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* **17:** 521-531.

Redman JA, Walker SL, Elimelech M (2004). Bacterial adhesion and transport in porous media: Role of the secondary energy minimum. *Environ Sci Tech* **38:** 1777-1785.

Reinhardt JA, Baltrus DA, Nishimura MT, Jeck WR, Jones CD, J.L. D (2009). De novo assembly using low-coverage short read sequence data from the rice pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*. *Genome Res* **19:** 294-305.

Reynolds CM, Ringelberg DB (2008). Non-indigenous endospore persistence following release in a snow - soil system. *Cold Reg Sci Tech* **52:** 146-154.

Rico A, Lopez R, Asensio C, Aizpun MT, Asensio-S-Manzanera MC, Murillo J (2003). Nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology* **93:** 1553-1559.

Riffaud CMH, Morris CE (2002). Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* in irrigation water retention basins by immunofluorescence colony-staining. *Eur J Plant Pathol* **108:** 539-545.

Rijnaarts HHM, Norde W, Bouwer EJ, Lyklema J, Zehnder AJB (1993). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl Env Microbiol* **59:** 3255.

Rijnaarts HHM, Norde W, Bouwer EJ, Lyklema J, Zehnder AJB (1996). Bacterial deposition in porous media related to the clean bed collision efficiency and to substratum blocking by attached cells. *Environ Sci Tech* **30:** 2869-2876.

Rijnaarts HHM, Norde W, Lyklema J, Zehnder AJB (1999). DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloid Surface B* **14:** 179-195.

Rodhe H, Grandell J (1972). On the removal time of aerosol particles from the atmosphere by precipitation scavenging. *Tellus* **24:** 442–454.

Rodriguez-Palenzuela P, Matas IM, Murillo J, Lopez-Solanilla E, Bardaji L, Perez-Martinez I *et al* (2010). Annotation and overview of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* NCPPB 3335 draft genome reveals the virulence gene complement of a tumour-inducing pathogen of woody hosts . *Environ Microbiol* **12:** 1604-1620.

Roine E, Raineri DM, Romanchuk M, Wilson M, Nunn DN (1998). Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant-Microbe Interact* **11:** 1048-1056.

Romani AM, Vazquez E, Butturini A (2006). Microbial availability and size fractionation of dissolved organic carbon after drought in an intermittent stream: Biogeochemical link across the stream-riparian interface. *Microbial Ecol* **52:** 501-512.

Rouse DI, Nordheim EV, Hirano SS, Upper CD (1985). A model relating the probability of foliar disease incidence to the population frequencies of bacterial plant pathogens. *Phytopathology* **75:** 505.

Samson R, Shafik H, Benjama A, Gardan L (1998). Description of the bacterium causing blight of leek as *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (pv. nov.). *Phytopathology* **88:** 844-850.

Sands DC, Langhans VE, Scharen AL, de Smet G (1982). The association between bacteria and rain and possible resultant meteorogical implications. *J Hungarian Meteorol Ser*.

Sands DC, Schroth MN, Hildebrand DC (1970). Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonads. *J Bacteriol* **101:** 9-23.

Sarkar SF, Guttman DS (2004). Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Env Microbiol* **70:** 1999-2012.

Sattler B, Puxbaum H, Psenner R (2001). Bacterial growth in supercooled cloud droplets. *Geophys Res Lett* **28:** 239-242.

Sawada H, Suzuki F, Matsuda I, Saitou N (1999). Phylogenetic analysis of *Pseudomonas syringae* pathovars suggests the horizontal gene transfer of *argK* and the evolutionary stability of *hrp*, gene cluster. *J Mol Evol* **49:** 627-644.

Schiaffino MR, Unrein F, Gasol JM, Massana R, Balague V, Izaguirre I Bacterial community structure in a latitudinal gradient of lakes: the roles of spatial versus environmental factors. *Freshwater Biol* **56:** 1973-1991.

Schmidt SK, Lipson DA (2004). Microbial growth under the snow: Implications for nutrient and allelochemical availability in temperate soils. *Plant Soil* **259:** 1-7.

Schmidt SK, Wilson KL, Monson RK, Lipson DA (2009). Exponential growth of "snow molds" at sub-zero temperatures: an explanation for high beneath-snow respiration rates and Q_{10} values. *Biogeochemistry* **95:** 13-21.

Schneider T, Gerrits B, Gassmann R, Schmid E, Gessner MO, Richter A *et al* (2010). Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteomics* **10:** 1819-1830.

Schneitz C (2005). Competitive exclusion in poultry––30 years of research. *Food Control* **16:** 657-667.

Scortichini M (2010). Epidemiology and predisposing factors of some major bacterial diseases of stone and fruit trees species. *J Plant Pathol* **92:** S73-S78.

Scortichini M, Tropiano FG (1994). Severe outbreak of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* on hazelnut in Italy. *J Phytopathol* **140:** 65-70.

Shaffer BT, Lighthart B (1997). Survey of culturable airborne bacteria at four diverse locations in Oregon: Urban, rural, forest, and coastal. *Microbial Ecol* **34:** 167-177.

Snider CS, Hsiang T, Zhao GY, Griffith M (2000). Role of ice nucleation and antifreeze activities in pathogenesis and growth of snow molds. *Phytopathology* **90:** 354-361.

Sophocleous M (2002). Interactions between groundwater and surface water: the state of the science. *Hydrogeology Journal* **10:** 52-67.

Stavrinides J, McCloskey JK, Ochman H (2009). Pea Aphid as both Host and Vector for the Phytopathogenic Bacterium *Pseudomonas syringae*. *Appl Env Microbiol* **75:** 2230-2235.

Stevik TK, Aa K, Ausland G, Hanssen JF (2004). Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Res* **38:** 1355-1367.

Stumpp C, Lawrence JR, Hendry MJ, Maloszewski P (2011). Transport and bacterial interactions of three bacterial strains in saturated column experiments. *Environ Sci Tech* **46:** 2116-2123.

Sundin GW, Murillo J (1999). Functional analysis of the *Pseudomonas syringae rulAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290-320 nm) radiation and distribution of *rulAB* among *P-syringae* pathovars. *Env Microbiol* **1:** 75-87.

Swartz TE, Tseng T-S, Frederickson MA, Paris G, Comerci DJ, Rajashekara G *et al* (2007). Blue-light-activated histidine kinases: Two-component sensors in bacteria. *Science* **317:** 1090-1093.

Taguchi F, Ichinose Y (2011). Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: Correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol Plant Microbe In* **24:** 1001-1011.

Takashima S, Morisaki H (1997). Surface characteristics of the microbial cell of *Pseudomonas syringae* and its relevance to cell attachment. *Colloid Surface B* **9:** 205-212.

Tampakaki AP, Skandalis N, Gazi AD, Bastaki MN, Sarris PF, Charova SN *et al* (2011). Playing the "Harp": Evolution of Our Understanding of *hrp/hrc* Genes. *Annu Rev Phytopathol* **48:** 347-370.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24:** 1596-1599.

The R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.

Tong YY, Lighthart B (2000). The annual bacterial particle concentration and size distribution in the ambient atmosphere in a rural area of the Willamette valley, Oregon. *Aerosol Sci Tech* **32:** 393-403.

Toth J (1999). Groundwater as a geologic agent: An overview of the causes, processes, and manifestations. *Hydrogeol J* **7:** 1-14.

Trenberth KE (1998). Atmospheric moisture residence times and cycling: Implications for rainfall rates and climate change. *Climatic Change* **39:** 667-694.

Troisfontaines P, Cornelis GR (2005). Type III secretion: More systems than you think. *Physiology* **20:** 326-339.

Upper CD, Hirano SS, Dodd KK, Clayton MK (2003). Factors that affect spread of *Pseudomonas syringae* in the phyllosphere. *Phytopathology* **93:** 1082-1092.

Vali G (1995). Principles of ice nucleation. In: Lee RE, Warren GJ and Gusta LV (eds). *Biological ice nucleation and its applications*. American Phytopathological Society: St. Paul, Minn. pp 1-28.

Vali G, Christensen M, Fresh RW, Galyan EL, Maki LR, Schnell RC (1976). Biogenic ice nuclei. Part II: Bacterial sources. *J Atmos Sci* **33:** 1565-1570.

van Alfen NK (1982). Biology and potential for disease control of hypovirulence of *Endothia parasitica*. *Annu Rev Phytopathol* **20:** 349-362.

van der Mei HC, Busscher HJ (2001). Electrophoretic mobility distributions of single-strain microbial populations. *Appl Env Microbiol* **67:** 491-494.

van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJB (1989). Bacterial adhesion: a physicochemical approach. *Microbial Ecol* **17:** 1-15.

Van Oss CJ (1989). Energetics of cell-cell and cell-biopolymer interactions. *Cell Biochem Biophys* **14:** 1-16.

van Overbeek LS, Nijhuis EHM, Koenraadt H, Visser J, van Kruistum G (2010). The role of crop waste and soil in *Pseudomonas syringae* pathovar *porri* infection of leek (*Allium porrum*). *Appl Soil Ecol* **46:** 457-463.

Vanneste JL, Poliakoff F, Audusseau C, Cornish DA, Paillard S, Rivoal C *et al* (2011). First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit in France. *Plant Dis* **95:** 1311.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR (1991). Distribution of repetitive DNA-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19:** 6823-6831.

Vigouroux A (1970). Études sur les bactérioses des arbres fruitiers. 1. Une nouvelle bactériose du Pêcher : description, étiologie, développement du parasite. *Annales de Phytopathologie* **2:** 155-179.

Vinatzer BA, Teitzel GM, Lee MW, Jelenska J, Hotton S, Fairfax K *et al* (2006). The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Mol Microbiol* **62:** 26-44.

Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **41:** 455-482.

Wang H, Yang XB, Ma Z (2010). Long-distance spore transport of wheat stripe rust pathogen from Sichuan, Yunnan, and Guizhou in Southwestern China. *Plant Dis* **94:** 873-880.

Ward JV (1994). Ecology of Alpine Streams. *Freshwater Biol* **32:** 277-294.

Ward JV, Malard F, Tockner K, Uehlinger U (1999). Influence of ground water on surface water conditions in a glacial flood plain of the Swiss Alps. *Hydrol Process* **13:** 277-293.

Webber JF, Parkinson NM, Rose J, Stanford H, Cook RTA, al. e (2008). Isolation and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* causing bleeding canker of horse chestnut in the UK. . *Plant Pathol New Dis Rep* **15**.

Wensing A, Braun SD, Buttner P, Expert D, Volksch B, Ullrich MS *et al* (2010). Impact of Siderophore Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on Epiphytic Fitness and Biocontrol Activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Appl Env Microbiol* **76:** 2704-2711.

Whitelaw-Weckert MA, Whitelaw ES, Rogiers SY, Quirk L, Clark AC, Huang CX (2010). Bacterial inflorescence rot of grapevine caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Pathol* **60:** 325-337.

Williams MW, Helmig D, Blanken P (2009a). White on green: under-snow microbial processes and trace gas fluxes through snow, Niwot Ridge, Colorado Front Range. *Biogeochemistry* **95:** 1-12.

Williams MW, Seibold C, Chowanski K (2009b). Storage and release of solutes from a subalpine seasonal snowpack: soil and stream water response, Niwot Ridge, Colorado. *Biogeochemistry* **95:** 77-94.

Williams V, Fletcher M (1996). *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl Env Microbiol* **62:** 100.

Willis DK, Hrabak EM, Lindow SE, Panopoulos NJ (1988). Construction and characterization of *Pseudomonas syringae recA* mutant strains. **1:** 80-86.

Wolber PK, Deininger CA, Southworth MW, Vandekerckhove J, Vanmontagu M, Warren GJ (1986). Identification and purification of a bacterial ice nucleation protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **83:** 7256-7260.

Won J, Kim JW, Kang S, Choi H (2007). Transport and adhesion of *Escherichia coli* JM109 in soil aquifer treatment (SAT): one-dimensional column study. *Environ Monit Asses* **129:** 9-18.

Xia X, Xie Z (2001). DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* **92:** 371-373.

Yamamoto S, Kasai H, Arnold DL, Jackson RW, Vivian A, Harayama S (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146:** 2385-2394.

Young JM (2010). Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *J Plant Pathol* **92:** S5-S14.

Young JM, Dye DW, Bradbury JF, Panagopoulos CG, Robbs CF (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *New Zeal J Agric Res* **21:** 153-177.

Young JM, Luketina RC, Marshall AM (1977). Effects on temperature on growth *in vitro* of *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas pruni*. *J Appl Bacteriol* **42:** 345-354.

Zhu M, Radcliffe EB, Ragsdale DW, MacRae IV, Seeley MW (2006). Low-level jet streams associated with spring aphid migration and current season spread of potato viruses in the US northern Great Plains. *Agr Forest Meteorol* **138:** 192-202.

Zinger L, Shahnavaz B, Baptist F, Geremia RA, Choler P (2009). Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *ISME J* **3:** 850-859.