



Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine et applications en sélection variétale

Sylvia Salgon

► To cite this version:

Sylvia Salgon. Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine et applications en sélection variétale. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2017. Français. NNT : 2017LARE0010 . tel-01798810

HAL Id: tel-01798810

<https://theses.hal.science/tel-01798810>

Submitted on 24 May 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION

Ecole doctorale Sciences, Technologies et Santé E. D. n°542

UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical

CIRAD – Université de la Réunion – ARMEFLHOR

THÈSE

Présentée par

Sylvia SALGON

Pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génétique et amélioration des plantes

**Déterminisme génétique de la résistance au
flétrissement bactérien chez l’aubergine et
applications en sélection variétale**

Soutenue le 23 Mai 2017 devant le jury composé de

Pascale BESSE, Professeur, Université de la Réunion

Présidente du jury

Charles-Éric DUREL, Directeur de Recherche, INRA

Rapporteur

Véronique LEFEBVRE, Directrice de Recherche, INRA

Rapporteuse

Toulassi ATIAMA-NURBEL, Chargée de mission, ARMEFLHOR

Examinatrice

Bernard REYNAUD, Professeur, Université de la Réunion

Directeur de thèse



LETTRE D'ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

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

Fait à ...Saint-Pierre....., le (date) ...28 Mars 2017...

Signature :

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

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

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

En conséquence, chaque utilisateur doit :

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

La contrefaçon et le faux

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

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

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

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

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

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

Remerciements

Et voici le moment tant attendu, la fin est proche et il est temps d'écrire les fameux remerciements...

Tous d'abord, je voudrais remercier Véronique Lefebvre et Charles-Éric Durel d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie aussi Pascale Besse et Toulassi Atiama-Nurbel d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse. Je remercie les membres de mon comité de thèse, Marie-Christine Daunay, Fabienne Vailleau, Christopher Sauvage, Emmanuel Wicker et Stéphane Poussier pour leurs conseils avisés et leurs encouragements. Un grand merci à Christopher Sauvage pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour m'avoir initiée aux joies de la bio-informatique! Marie-Christine, merci beaucoup pour toutes ces populations d'aubergine que tu as multipliées et produites. Elles auront été le matériel indispensable au déroulement de ce travail. Merci à Fabienne pour m'avoir accueillie quelques jours au sein du LIPM et pour les discussions qui auront enrichi ce travail de thèse.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre de la CIFRE n°2013/1477. Je remercie à ce titre l'ARMEFLHOR pour avoir accepté de me confier ce travail. Je tiens en particulier à remercier Thomas Deslandes, mon encadrant au sein de l'ARMEFLHOR, grâce auquel j'ai pu mener à bien le chapitre 4 de cette thèse. Un grand merci à Steeve, Mathieu, Laure et Arthur pour avoir pris soin des bringelles péi et de leurs précieuses progénitures! Votre aide aura été déterminante dans ce long projet de création variétale. Merci également à Cathy et Dominique pour l'appui administratif !

Ce travail a principalement été effectué au sein de l'UMR PVBMT et j'en remercie le directeur Bernard Reynaud, pour m'avoir donné la chance de travailler au sein de cette UMR. Merci à Bernard pour avoir aussi accepté d'être mon directeur de thèse, tu as su me donner des conditions favorables pour effectuer mes travaux de thèse. Je remercie également Jacques Dintinger, mon encadrant au sein de l'UMR pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir confié un projet aussi intéressant. Merci pour tes conseils et tes corrections sur le manuscrit de thèse. Merci à Emmanuel Wicker pour ses conseils avisés de microbiologiste et pour avoir partagé ses connaissances sur le monde passionnant de *Ralstonia*! Merci aussi à Cyril Jourda pour ses conseils en bio-informatique et ses corrections du manuscrit de thèse. Je remercie également Carine Charron pour ses critiques constructives de la discussion.

Merci à Sylvain et Jean-Mi, vous avez été des collègues en or ! Vous m'aurez beaucoup appris sur la conduite d'essais en serre et sur la reconnaissance des symptômes de flétrissement bactérien. Tout cela avec gentillesse et bonne humeur, que demander de plus ? Merci aussi pour ces milliers de croisements que vous avez faits en collaboration avec l'ARMEFLHOR, un jour on cultivera peut-être

des aubergines lebonette et baptistette à la Réunion... Un très grand merci à Edith, Marie, Véronique et Séverine pour leur aide au laboratoire. Merci aussi à toutes les personnes qui auront donné des coups de main au labo ou dans les serres : Martial, Didier, Jim, Serge, Emmanuelle, Jean-Jacques et j'en oublie certainement bien d'autres... Merci à Edith Garot, pour avoir participé au projet sur la population E3*E8. Bon courage pour la suite de ta thèse !

Merci à tous mes collègues thésards du CIRAD, ceux qui sont déjà partis et ceux qui restent encore pour quelques mois ou quelques années ! Un merci particulier à mes collègues de bureau les Ralsto/bégomo Angels (Noura, Sasa, So) pour leur soutien moral et pour m'avoir nourrie dans les moments d'hypoglycémie (Noura...) ! Merci à mes collègues de la pause déjeuner: Magalie, Cynthia, Clara & Frago, Florent, Patrick, Adrien, Steph, Aurélie, Nicolas et bien d'autres ! Merci à tous les autres membres de l'unité, la team R (Fred, Charlotte, Séverine, Agathe), les Michel & Michel, Philippe, Jean-Mi le Kommandatur, Laurent, Pierre, Lulu, Mumu, Nathalie, Séverine B (J'en ai sûrement oublié, le 3P est une unité tellement grande !) qui par leur conseil ou simplement par leur gentillesse auront participé à ce travail de thèse. Un grand merci à Magalie, Cynthia, Océane et Chantal pour avoir géré l'aspect administratif de cette thèse. Merci aussi à Aurore Lebeau et Frédéric Péréfarres, les jeunes docteurs de l'équipe qui m'ont accueillie avec gentillesse et ont partagé leur expérience respective sur *Ralstonia* et les bégomovirus.

Ces travaux de thèse ont aussi fait partie d'une collaboration avec l'entreprise Technisem. Je remercie Florine Poiroux, Ramatoulaye Sidibe et Morgane Raynal pour leur implication dans ce projet. Je tiens en particulier à remercier Morgane, qui a su transposer au Cameroun de lourds essais de cartographie génétique. Malgré les échecs des débuts et une souche très récalcitrante, ce projet a pu être mené à bien grâce à ton travail et ta persévérance. Un grand merci à toute l'équipe qui a participé à ce projet.

Merci aux amis et collègues pour leur soutien moral. Coco et Emeric, à quand la prochaine soirée pizzas ? Merci à Gizem et Tulin, pour m'avoir fait découvrir la culture turque. La convivialité et la générosité turque ne sont pas des légendes !

Enfin, comment dire merci en quelques lignes aux personnes qui me soutiennent depuis tant d'années... Un grand merci à ma famille, en particulier à mes parents Agnès et Bernard pour m'avoir toujours soutenue et pour m'avoir laissée partir aussi loin afin de réaliser cette thèse ! Les colis à base de Carthagène et crème de marron m'auront aidé à tenir le coup ! Et puis Max évidemment... Tu m'as permis de tenir dans les moments difficiles, tu m'as encouragée quand j'en avais besoin et ton soutien sans faille aura été indispensable pour que je puisse mener à bien ce projet ! Merci de partager ma vie et de l'avoir autant embellie ! Maintenant on va pouvoir souffler et je vais enfin te faire découvrir les magnifiques Corbières en été. J'entends déjà le chant des cigales et le vent du Cers...

Sommaire

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 - Synthèse bibliographique	2
1.1 L'aubergine : une Solanacée particulière.....	9
1.1.1 Origine et domestication.....	9
1.1.2 Importance économique et culturelle	11
1.1.3 Génétique, génomique et relation de synténie aubergine/tomate	13
1.1.4 Principaux pathogènes de l'aubergine.....	16
1.2 Le flétrissement bactérien	18
1.2.1 Biologie et répartition	18
1.2.2 Diversité génétique et pouvoir pathogène	22
1.2.3 Contrôle du pathogène.....	27
1.3 La Résistance au flétrissement bactérien	31
1.3.1 Mécanismes généraux de résistance	31
1.3.2 Cartographie de gènes de résistance	37
1.3.3 Cartographie génétique de la résistance au flétrissement bactérien : bilan des travaux réalisés à ce jour.....	51
1.4 Rappel des principaux objectifs.....	58
Chapitre 2 – Diversité et spécificité des QTLs de résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25.....	59
Préambule à l'article	60
Article: Eggplant resistance to the <i>Ralstonia solanacearum</i> species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci	61
Conclusions du chapitre.....	94
Chapitre 3 – Recherche de QTLs de résistance vis-à-vis des souches de <i>Ralstonia</i> <i>pseudosolanacearum</i> contournant ERs1	95
Préambule à l'article	96
3.1.1 Introduction	103
3.1.2 Materials and Methods	105
3.1.3 Results	111
3.1.4 Discussion.....	121
3.1.5 Acknowledgments	127
3.1.6 Onlines Resources	128
3.2 Cartographie génétique de la résistance à la souche PSS4 dans une population DH issue de MM152 × MM738.....	139
3.2.1 Matériel et Méthodes	139
3.2.2 Résultats préliminaires	140
3.2.3 Discussion	143
Conclusions du chapitre.....	145
Chapitre 4 – Transfert de la résistance au flétrissement bactérien dans deux cultivars d'aubergines réunionnaises	147
Préambule à l'article	148

4.1	Introduction.....	150
4.2	Materials and methods	152
4.2.1	Inoculation procedure and symptoms evaluation	152
4.2.2	Plant materials and crossing scheme	152
4.2.3	Molecular marker analysis.....	155
4.2.4	Statistical analysis.....	156
4.3	Results.....	156
4.3.1	BW resistance segregation in backcross generations	156
4.3.2	Introgression of <i>EBWR2</i> and <i>EBWR9</i> with molecular markers.....	159
4.4	Discussion	162
4.5	Acknowledgements.....	166
	Conclusions du chapitre.....	167
	Chapitre 5 – Discussion et perspectives	169
5.1	Vers une compréhension des bases génétiques et moléculaires de la résistance chez AG91-25.....	173
5.1.1	La cartographie fine d' <i>EBWR9</i> : état des lieux et perspectives	173
5.1.2	<i>EBWR9</i> contrôle-t-il spécifiquement des souches de phylotype I ?	176
5.2	L'identification de gènes et QTLs complémentaires à <i>EBWR9</i> : une nécessité pour contrôler les souches virulentes du RSSC et pour la création de variétés à large spectre de résistance	178
5.2.1	Les souches des phylotypes II et III : un risque pour la culture de l'aubergine ?.....	178
5.2.2	Efficacité et limites des QTLs <i>EBWR2</i> et <i>EBWR14</i> : Nécessité de poursuivre la recherche de QTLs majeurs dans la diversité génétique de l'aubergine.....	180
5.2.3	La diversité génétique de l'aubergine et de ses apparentés sauvages : un réservoir de gènes et QTLs de résistance à explorer et exploiter	181
5.3	Sélection de « bringelles péi » résistantes au BW	183
	Références bibliographiques	187

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Arbre phylogénétique simplifié de la famille des Solanacées	9
Figure 2: Distribution des groupes <i>S. incanum</i> (A-D) et <i>S. melongena</i> (E-G) et scénario de migration.	11
Figure 3: Diversité phénotypiques des fruits d'aubergines sauvages et cultivés	12
Figure 4: Comparaison des cartes génétiques de la tomate et de l'aubergine construites à partir de marqueurs COS.	14
Figure 5: Alignement des séquences d'aubergines sur le génome de la tomate	15
Figure 6: Cycle infectieux du complexe d'espèces <i>Ralstonia solanacearum</i>	19
Figure 7: Symptômes de flétrissement bactérien sur aubergines	19
Figure 8: Test du "verre d'eau" permettant de vérifier la présence de RSSC dans la tige de la plante.	20
Figure 9: Colonies bactériennes sur milieu de culture Sequeira.	21
Figure 10: Distribution mondiale des souches du RSSC en 2016.....	22
Figure 11: Présentation des deux types de résistance aux maladies présents chez les plantes, d'un point de vue populationnel et moléculaire.....	33
Figure 12: Présentation du modèle en zigzag.....	34
Figure 13: Représentation schématique de la structure des quatre classes majeures de protéines de résistance.....	35
Figure 14 : Description des différents types de populations utilisées pour construire des cartes génétiques et cartographier des caractères d'intérêt.....	38
Figure 15: Conséquences de la méiose et du taux de crossing-over sur la proportion d'individus recombinants dans la population.....	40
Figure 16: Evolution du LOD score le long des chromosomes pour un caractère analysé donné..	42
Figure 17: Description des principales étapes du clonage positionnel.....	43
Figure 18: Illustration de la technique de Genotyping-By-Sequencing.....	46
Figure 19: Stratégie de déploiement de gènes de résistance	49
Figure 20: Présentation d'un diagramme simplifié d'aide à la décision dans le choix des stratégies d'amélioration variétale et de déploiement de résistance.....	50
Figure 21: Cartographie génétique de la population de RILs issues du croisement MM738×AG91-25.	57

Figure 22: Fréquence de distribution des lignées DH de la population E3 × E8	141
Figure 23: Carte génétique construite à partir de 992 SNPs et 135 lignées DH de la population E3 x E8.	142
Figure 24: Représentation graphique de l'obtention des Familles HIF dans la population de RILs issues du croisement MM738 x AG91-25.....	171
Figure 25 : Haplotypes des Familles HIF au locus <i>EBWR9</i>	175
Figure 26: Proposition de protocole permettant de déterminer le spectre de résistance d' <i>EBWR9</i> vis-à-vis des souches possédant l'allèle <i>RipAX2_{GMI1000}</i>	177
 Tableau 1: Principales maladies de l'aubergine.....	16
Tableau 2: Caractéristiques génétiques, géographiques et écologiques des souches du RSSC.	23
Tableau 3: Ratio de ségrégation pour les marqueurs dominants et co-dominants dans les quatre principaux types de populations.....	39
Tableau 4: Présentation des principales méthodes d'analyses de QTLs par cartographie d'intervalles.	42
Tableau 5: Bilan des QTLs de résistance au flétrissement bactérien détectés chez la tomate et estimation de leur position physique.	53
Tableau 6: Résultats des niveaux d'interactions entre les accessions de tomate, aubergine et piment (Core-TEP) et une collection de souche du RSSC couvrant quatre phylotypes (Core-Rs2).	56
Tableau 7: Description du matériel végétal utilisé.....	97
Tableau 8 : Moyennes des variables W_{max} et CI obtenues à partir des analyses sur les répétitions individuelles et combinées (comb), et attribution des groupes phénotypiques correspondant.	98
Tableau 9 : Moyennes de la variable W_{max} obtenues à partir des analyses sur les répétitions individuelles et combinées	99
Tableau 10: Moyennes et erreurs standards obtenues sur les lignées parentales E8 et E3, sur la génération F ₁ , sur le témoin positif E6 et sur la population DH issues du croisement E3 x E8, estimation de la significativité des effets génotype et répétition, et de l'héritabilité des traits analysés	140
Tableau 11: Résultats d'une analyse QTL par la méthode MQM sur une population de 135 lignées DH issues du croisement E3 × E8.....	143

Liste des abréviations

ADN Acide DésoxyriboNucléique

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

ANOVA Analysis Of Variance

ARMEFLHOR Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole

AUDPC Area Under Disease Progress Curve

Avr Avirulence

BC BackCross

BDB Blood Disease Bacterium

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

BW Bacterial wilt

CC Coiled-Coil

CDPK Calcium-Dependant Protein Kinase

CFU Colony Forming Unit

CIFRE Convention Industrielle de Formation par la Recherche

CIM Composite Interval Mapping

CIRAD Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

cM centimorgans

COS Conserved Ortholog Set

DAMP Damage Associated Molecular Pattern

DH Doubled Haploids

EPS ExoPolySaccharide

EST Expressed Sequenced Tags

ET3 Effecteur de type III

ETI Effector-Triggered Immunity

ETS Effector-Triggered Susceptibility

Gb Gigabase

GBS Genotyping By Sequencing

GBS-SNP SNPs generated by GBS technology

HIF Heterogeneous Inbred Family

HR Hypersensitive Response

Hrc Hrp gene conserved

Hrp Hypersensitive response and pathogenicity

jai jour après-inoculation

kb Kilobase
LOD Logarithm (base 10) of Odds
LRR Leucine Rich Repeat
Mb Megabase
MAPK Mitogen-Associated Protein kinase
MQM Multiple QTL Mapping
NBS Nucleotide binding site
NGS New Generation Sequencing
NIL Near Isogenic Line
PAMP Pathogenesis-Associated Molecular Pattern
PCR Polymerase Chain Reaction
PRR Pattern Recognition Receptor
PTI PAMP-Triggered Immunity
QDR Quantitative disease resistance
QTL Quantitative Trait Locus
R Résistance
RAD Restriction site Associated DNA
RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism
RGA Resistance Gene Analog
RIL Recombinant Inbred Lines
RLK Receptor-Like Kinase
RLP Receptor-Like Protein
ROS Reactive Oxygen species
RRL Reduced-representation library
RSSC *Ralstonia Solanacearum* Species Complex
S Sensibilité
SAM Sélection Assistée par Marqueur
SIM Simple Interval Mapping
SNP Single Nucleotide Polymorphism
SSR Simple Sequence Repeat
SST2 Système de Sécrétion de Type 2
SST3 Système de Sécrétion de Type 3
TIR Toll/Interleukin-1 Receptor
TM Trans Membrane

Introduction générale

Dans un environnement donné, les espèces présentes sont en compétition permanente les unes par rapport aux autres. Leigh Van Valen dans les années 1970 décrira cette compétition à travers la théorie de la reine rouge qui se base sur un passage du célèbre « De l'autre côté du miroir » de l'écrivain Lewis Carroll dans lequel Alice et la reine rouge courent effrénément pour finalement rester au même endroit (Van Valen 1973). Cette métaphore a été utilisée durant de nombreuses décennies afin d'illustrer la compétition sans fin entre les plantes et leurs pathogènes. Afin de survivre dans cette relation antagoniste, les plantes-hôtes et leurs pathogènes ont accumulé dans leur génome une panoplie « d'armes et de boucliers », d'où terme de « course à l'armement ». Dans les populations de plantes en milieu naturel, le grand nombre d'espèces, la forte diversité génétique (intra et inter-populations), la petite taille des populations et l'hétérogénéité de l'environnement concourent à un équilibre entre plantes et pathogènes sur le long terme (Zhan et al. 2015). En revanche, les systèmes agricoles actuels, composés de très peu d'espèces et surtout d'espèces homogènes (clones, lignées, hybrides), possèdent un potentiel adaptatif très faible et leur culture à grande échelle dans des environnements homogènes favorise l'émergence de pathogènes très virulents et spécialisés (Stukenbrock and McDonald 2008). Par ailleurs, la mondialisation des échanges agricoles a favorisé l'émergence de nouvelles maladies, en introduisant dans des régions entières de nouveaux pathogènes qui n'ont pas encore eu le temps de coévoluer avec leurs plantes hôtes (Zhan et al. 2015). Ceci a donné lieu à des épidémies dévastatrices, comme par exemple la maladie du phylloxéra qui a décimé au XIX^{ème} siècle les trois quarts du vignoble français (Soleas et al. 1997), ou plus récemment, l'épidémie causée par la bactérie *Xylella fastidiosa* qui a décimé les vergers d'olivier italiens et qui menace aujourd'hui le reste de l'Europe (White et al. 2017). Enfin, la dégradation des écosystèmes et le changement climatique en cours risque d'accentuer le développement d'épidémies en donnant un avantage sélectif aux pathogènes (Anderson et al. 2004).

Afin de contrer ce problème, les sélectionneurs se sont intéressés à ces armes génétiques présentes dans la diversité naturelle des espèces végétales. Les résistances de type qualitatives, conférées par quelques gènes majeurs (gènes de type R) ont jusqu'à l'heure été étudiées et utilisées en priorité pour contrôler les maladies des cultures. Cependant, l'utilisation de ces gènes a montré ses limites, les pathogènes à plus ou moins long terme finissant souvent par gagner la bataille et générant ainsi des cycles brutaux de « boom and bust » (Robinson 1976). Un autre type de résistance, dite quantitative (QTL), est plus généralement associée à un niveau de résistance plus faible mais à spectre plus large

(résistance non-spécifique). Ces résistances sont souvent considérées comme plus durables que les résistances qualitatives, même si des études montrent que ces dernières peuvent malgré être érodées (Montarry et al. 2012). Aujourd'hui, dans un contexte de développement durable et de diminution de l'usage de pesticides néfastes pour l'environnement et la santé humaine, l'introgession de ces différents facteurs de résistance dans les nouvelles variétés est un enjeu majeur. Par ailleurs, la prise en compte de la durabilité et du spectre d'action de ces facteurs génétiques occupe une place importante dans les projets de recherche académique et appliquée. Les futures variétés devront donc à la fois posséder des caractéristiques agronomiques intéressantes et des résistances efficaces et durables aux pathogènes. La recherche de nouveaux facteurs de résistance et la connaissance de leur base génétique et moléculaire peuvent faciliter la création de ces variétés. Par ailleurs, cette recherche doit prendre en compte la diversité interspécifique et intraspécifique des pathogènes très souvent mal connue et qui rend l'amélioration variétale encore plus difficile.

Parmi, les pathogènes les plus nuisibles sur les espèces cultivées, on compte le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (ou *Ralstonia solanacearum* species complex en anglais, noté RSSC). Le RSSC est responsable du flétrissement bactérien (ou bacterial wilt en anglais, noté BW), maladie qui affecte plus de 250 espèces de plantes. Cette bactérie tellurique est très répandue à travers le monde, mais reste néanmoins plus abondante dans les zones tropicales et subtropicales, favorisée par un climat chaud et humide. Le RSSC est caractérisé par une diversité génétique très importante, représentée à travers ses 4 phylotypes (Fegan and Prior 2005). La diversité génétique du pathogène, sa large gamme d'hôtes et sa persistance dans les sols rendent son contrôle extrêmement difficile. La création de variétés résistantes est communément considérée comme la stratégie de lutte la plus efficace. En raison de son importance agronomique et de sa forte sensibilité au BW, l'amélioration variétale au sein de la famille des Solanacées apparaît comme une priorité. Parmi les Solanacées, l'aubergine présente dans sa diversité génétique naturelle de très forts niveaux de résistance et constitue donc un modèle intéressant pour l'étude de la résistance au BW. Par ailleurs, l'aubergine est non seulement une culture d'importance économique mondiale mais elle représente aussi une culture vivrière pour de nombreux paysans (Şekara et al. 2007). Sa richesse en vitamines et minéraux en font également une source nutritionnelle intéressante dans des pays où la malnutrition est répandue. En France, l'importance économique de l'aubergine est moindre mais elle est néanmoins couramment utilisée pour préparer des plats traditionnels méditerranéens ou d'outre-Mer. Si le BW est peu présent en métropole (quelques rare cas sur

pomme de terre), la maladie est par contre répandue aux Antilles et sur l'île de la Réunion (Elphinstone 2005). Sur le territoire de la Réunion, 3 des 4 phylotypes ont été répertoriés (Girard et al. 1993; Clain et al. 2004). Les souches du phylotype I prédominent dans les zones de production des tomates et des aubergines, où elles ont été majoritairement collectées. Les souches du phylotype II sont aussi présentes mais elles ont seulement été collectées à haute altitude, là où les températures sont plus fraîches (zones de production de la pomme de terre). Des souches du phylotype III ont également été collectées mais elles restent très minoritaires et sont réparties dans des zones limitées de moyenne altitude entre 600 et 1000 m. Enfin, jusqu'à ce jour la présence du phylotype IV à la Réunion n'a pas été rapportée. Les aubergines cultivées sont principalement des variétés « pays » appréciées des consommateurs réunionnais mais sensibles au BW. L'amélioration de la résistance de ces variétés vis-à-vis du RSSC permettrait aux agriculteurs de s'affranchir de l'utilisation de porte-greffes résistants. Les travaux de thèse d'Aurore Lebeau réalisés au sein du laboratoire PVBMT ont mis en évidence dans la population de lignées recombinantes issues du croisement MM738 (S) × AG91-25 (R) un facteur de résistance majeur (*ERs1*), qui confère un très haut niveau de résistance vis-à-vis de trois souches du phylotype I (Lebeau et al. 2013). Ces travaux ont également démontré l'existence au sein du phylotype I d'une souche non contrôlée par *Ers1*. *Ers1* représente donc un facteur de résistance intéressant à introgresser dans les variétés « pays », mais une étude plus approfondie de son spectre d'action est nécessaire pour envisager à long terme la création de variétés pouvant faire face à la diversité du RSSC. Par ailleurs, la recherche de facteurs de résistance complémentaires s'avère indispensable pour contrôler les souches pour lesquelles *ERs1* est inefficace. Enfin, dans l'optique de mieux comprendre les interactions moléculaires entre *ERs1* et les « armes » du pathogène, il apparaît nécessaire de cartographier finement la zone et d'apporter les bases nécessaires à son futur clonage. Cela contribuera dans un deuxième temps à estimer la durabilité de cette résistance et mieux guider les choix de déploiement des variétés possédant *ERs1*. Dans ce contexte mes travaux de thèse ont été orientés selon trois axes :

- (i) Caractériser le spectre d'action d'*ERs1* en se focalisant sur les phylotypes I, IIA, IIB et III, présents sur l'île de la Réunion. Cartographier finement *ERs1* et d'éventuels autres facteurs de résistance dans la population MM738 × AG91-25 grâce à la construction d'une carte génétique dense en marqueurs moléculaires.

- (ii) Cartographier des facteurs de résistance vis-à-vis de souches virulentes du RSSC dans deux populations d'haploïdes doublés d'aubergines. Ces nouveaux facteurs de résistance pouvant être complémentaires d'*ERs1* qui ne contrôle pas ce type de souches.
 - (iii) Introgresser dans les variétés « pays » des facteurs de résistance aux souches de phylotype I cartographiés (*ERs1* et un QTL mineur présents dans l'aubergine AG91-25) ou qui ne sont pas encore cartographiés (supposés présents dans les accessions MM853, MM643, MM152).
- Le chapitre 1 du manuscrit est constitué d'une synthèse bibliographique divisée en trois parties visant à donner les informations nécessaires à la compréhension des travaux réalisés. La première partie décrit brièvement les caractéristiques biologiques et génétiques de l'aubergine, la deuxième partie fait un état des lieux des connaissances sur le RSSC et la troisième partie fait un bilan des facteurs de résistance au BW connus à ce jour et des méthodes qui ont mené à leur détection. Ensuite, les chapitres 2, 3 et 4 traitent des trois axes de recherche décrits ci-dessus.
 - Le chapitre 2 fait l'objet d'un article scientifique publié dans la revue *Frontiers in Plant Science* :

“Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci”. SALGON et al. *Frontiers in Plant Sciences*. (Submitted)

- Le chapitre 3 est divisé en deux parties. La partie 1 du chapitre 3 fait l'objet d'un article scientifique qui sera soumis dans la revue *Euphytica* :

“Partial resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* strains is conferred by multiple minor QTLs in eggplant”. SALGON et al. *Euphytica*. (Not Submitted)

La 2^{ème} partie du chapitre 3 n'a pas pu être intégrée à l'article car les essais de phénotypage nécessitent d'être répétés en serre. Cette partie est donc rédigée séparément et devrait dans le futur faire l'objet d'un article scientifique lorsque les

essais de phénotypage en serre seront terminés (essais en cours au CIRAD de la Réunion).

- Le chapitre 4 fait l'objet d'un projet d'article scientifique qui sera soumis dans *Plant Breeding* :

"Introgression of bacterial wilt resistance in eggplant cultivars using phenotypic evaluation and molecular selection". SALGON et al. <i>Plant Breeding</i> . (Not submitted)

- Le chapitre 5 présente une discussion générale des résultats obtenus et propose des perspectives à ce travail de thèse.

Chapitre 1 - Synthèse bibliographique

1.1 L'aubergine : une Solanacée particulière

1.1.1 Origine et domestication

L'aubergine (*Solanum melongena*) appartient à la grande famille des Solanacées. Cette famille comprend un très grand nombre d'espèces largement réparties à travers le monde. On compte parmi cette famille des cultures alimentaires d'importance économique majeure comme la pomme de terre (*S. tuberosum*), la tomate (*S. lycopersicum*) ou le piment/poivron (*Capsicum* spp.) et des cultures non alimentaires comme le tabac (*Nicotiana tabacum*), ou encore le pétunia (*Petunia axillaris*) (Figure 1). L'aubergine, tout comme la tomate et la pomme de terre, fait partie du genre *Solanum* qui comprend autour de 2000 espèces vivant dans des habitats divers allant des forêts humides aux déserts les plus secs de la planète (Knapp 2002).

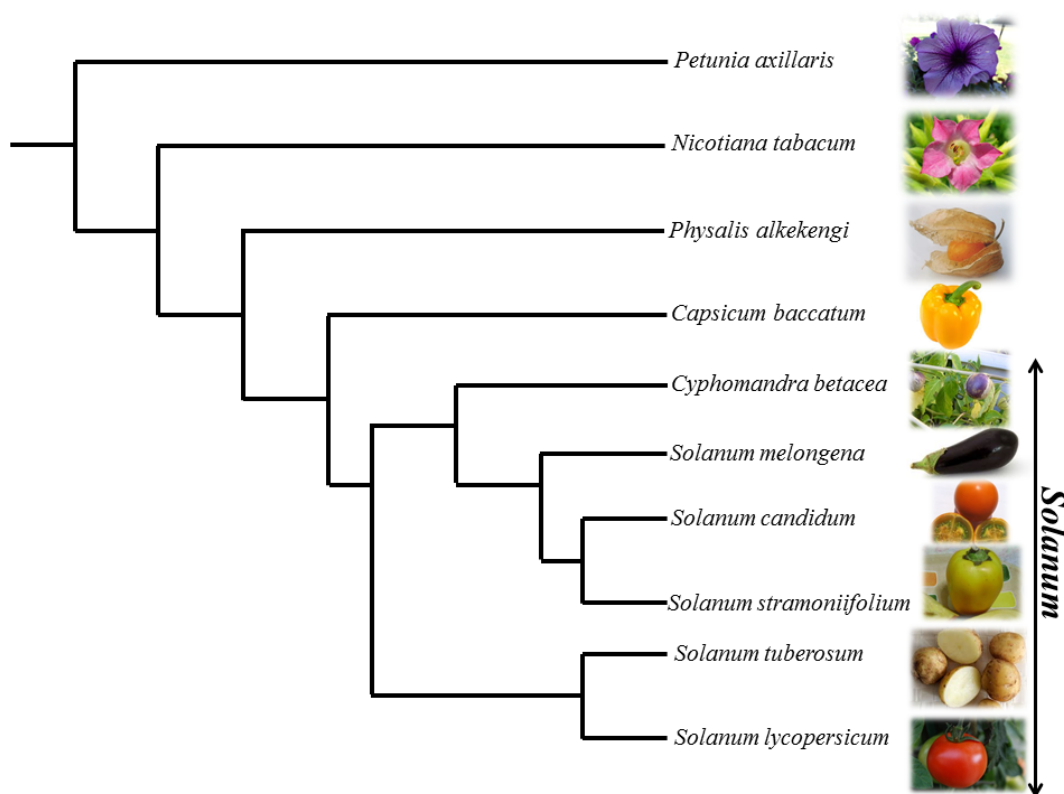


Figure 1: Arbre phylogénétique simplifié de la famille des Solanacées. D'après https://solgenomics.net/about/about_solanaceae.pl.

A l'intérieur du genre *Solanum*, l'aubergine est classée dans le sous-genre *Leptostemonum*. Ce sous-genre aussi appelé informellement *Solanum* épineux représente la lignée évolutive la plus riche en espèces. Les *Solanum* épineux sont caractérisés par la

présence de trichomes étoilés, de longues anthères effilées et généralement d'épines (Vorontsova et al. 2013). Les espèces de ce sous-genre sont en grande partie originaires d'Amérique du Sud et Centrale. L'autre groupe auquel appartient l'aubergine la plus connue *S. melongena* et aussi les aubergines africaines *S. aethiopicum* (aussi appelé *S. integrifolium*) et *S. macrocarpon* (Sękara et al. 2007; Aubriot et al. 2016) est originaire de l'ancien monde (Afrique, Madagascar, Asie et Australie). Même si des croisements sont possibles entre ces trois espèces, *S. aethiopicum* et *S. macrocarpon* sont phylogénétiquement assez éloignées de *S. melongena* et ne seraient pas impliquées dans la même histoire évolutive (Weese and Bohs 2010). Afin d'éviter les confusions, dans la suite de ce paragraphe le terme aubergine se réfèrera uniquement à *S. melongena* et à ses formes sauvages et semi-sauvages. L'histoire évolutive de *S. melongena* est complexe et reste encore fortement débattue aujourd'hui. Dans ce paragraphe, je présenterai l'histoire évolutive proposée par Weese and Bohs (2010) qui est basée sur la séparation des aubergines en deux espèces biologiques (*S. incanum* et *S. melongena*), chacune comprenant quatre groupes (Lester and Hasan 1991). L'espèce *S. incanum* est native d'Afrique et comprend les groupes A à D. Les accessions du groupe A sont originaires de la savane équatoriale boisée, alors que les accessions du groupe B sont originaires des prairies de la savane tempérée. Le groupe B se serait ensuite étendu vers le sud et adapté à des conditions environnementales extrêmes (milieu très sec). C'est ainsi que le groupe D aurait émergé (Figure 2). Le groupe *S. incanum* A se serait lui étendu vers le nord jusqu'au Moyen-Orient et aurait ainsi évolué vers le groupe *S. incanum* C. Le groupe C aurait ensuite été introduit en Asie, soit spontanément, soit durant des migrations humaines, et serait à l'origine de la forme sauvage de *S. melongena* groupe F. Les premières formes cultivées d'aubergine (groupe G) auraient été domestiquées graduellement à partir de plantes du groupe F. Les premiers cultivars du groupe G auraient alors été introduits en Inde où le processus de domestication aurait continué jusqu'à la formation du groupe d'aubergine H, que l'on retrouve actuellement à travers le monde. Enfin, les accessions du groupe E (aussi appelé *S. insanum*), qui poussent à proximité des champs de culture et qui sont considérés comme des mauvaises herbes, pourraient être une réversion de la forme cultivée H vers le phénotype primitif du groupe G (Weese and Bohs 2010). D'autres auteurs postulent également que le groupe E pourrait être l'ancêtre sauvage des trois autres groupes de *S. melongena* (Lester and Hasan 1991). D'après des documents en sanskrit traitant de la question, ces événements de domestication dateraient de 300 avant Jésus Christ. Ce n'est que bien plus tard, entre le VII^{ème} et le XIII^{ème} siècle, que l'aubergine sera diffusée autour du bassin méditerranéen, cela suite à l'expansion de l'empire arabe (Daunay and Janick 2007). Même si la présence de l'aubergine

est mentionnée en Europe à l'époque médiévale, sa consommation était alors limitée et il faudra attendre le XVIII^{ème} pour qu'elle gagne en popularité et obtienne le succès qu'on lui connaît aujourd'hui.

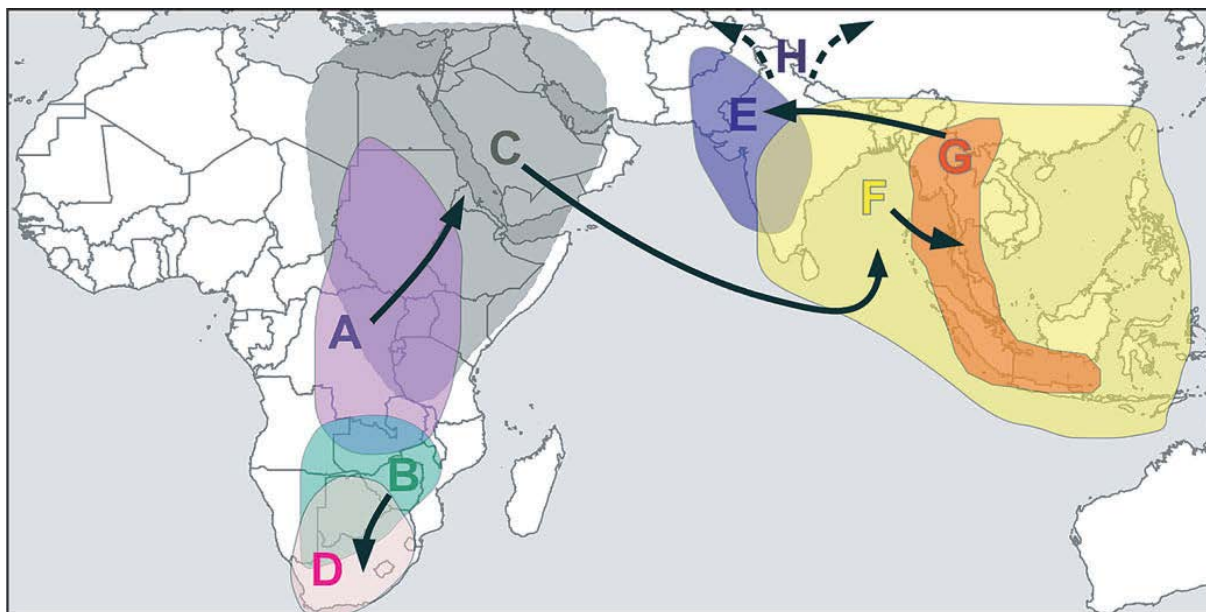


Figure 2: Distribution des groupes *S. incanum* (A-D) et *S. melongena* (E-G), et scénario de migration proposé par Weese and Bohs (2010).

1.1.2 Importance économique et culturelle

L'aubergine est aujourd'hui cultivée à travers le monde et représente une culture économiquement importante. Ainsi, le niveau de production n'a cessé d'augmenter durant la dernière décennie : 37,6 millions de tonnes produits en 2007 et 50,2 millions de tonnes en 2014 dont 94% de la production mondiale se situe en Asie, 4% en Afrique et 2% en Europe (d'après <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). L'aubergine est très peu produite en Amérique. Elle possède pourtant de nombreuses qualités nutritionnelles. Peu calorique, elle est riche en fibres, vitamines et minéraux bénéfiques à la santé humaine (Cao et al. 1996; Stommel and Whitaker 2003). Les fruits contiennent des quantités importantes d'anthocyanines et d'acides phénoliques qui sont de puissants antioxydants (Niño-Medina et al. 2014).

En Afrique, ce sont les proches parents de l'aubergine *S. aethiopicum* et *S. macrocarpon* qui sont majoritairement cultivés, à la fois pour la consommation de fruits et aussi des feuilles. L'aubergine écarlate (*S. aethiopicum*) fait partie avec la tomate, l'oignon, le poivron et le gombo, des cinq légumes les plus populaires en Afrique Centrale et de l'Ouest (Plazas et

al. 2014). L'aubergine gboma (*S. macrocarpon*) est en général moins cultivée que l'aubergine écarlate, mais elle représente un légume d'importance majeure dans certaines régions africaines. Malgré leur popularité, les aires de production des aubergines africaines restent limitées et souvent restreintes aux jardins des habitants des villages (Sékara et al. 2007), et leur culture hors Afrique reste également très limitée. Seule l'aubergine écarlate a aussi été introduite dans les Antilles et en Amérique du Sud, tout comme dans certaines régions du sud de l'Italie (Weese and Bohs 2010). Les fruits de l'aubergine *S. melongena* et des aubergines africaines *S. aethiopicum* et *S. macrocarpon* présentent une grande diversité morphologique (Figure 3). En plus de leur intérêt pour l'alimentation des populations autochtones, les aubergines africaines sont des ressources génétiques d'un intérêt majeur pour l'amélioration variétale de *S. melongena*. Les trois espèces peuvent en effet être croisées et la descendance obtenue est partiellement fertile (Daunay et al. 1991; Premabati et al. 2015).

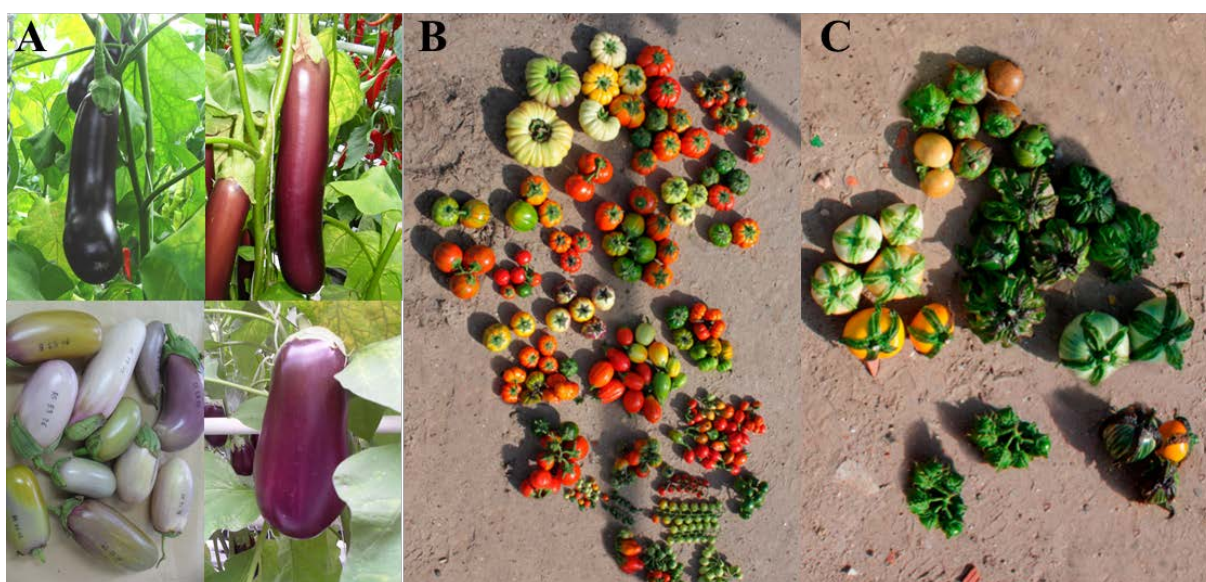


Figure 3: Diversité phénotypique des fruits d'aubergines sauvages et cultivées des groupes d'espèces (A) *S. melongena* (S. Salgon) et (B) *S. aethiopicum* (C) *S. macrocarpon* (Plazas et al. 2014)

Malgré ses nombreux caractères favorables et son importance mondiale, l'aubergine reste moins étudiée que les autres espèces de Solanacées (tomate, piment), en particulier en ce qui concerne la génétique (Nunome et al. 2001). Dans le paragraphe suivant, je ferai un point sur les avancées des travaux de génétique et génomique conduits sur l'aubergine, puis je décrirai brièvement les relations synténiques étroites qui existent entre l'aubergine et la tomate. Les principes de construction de cartes génétiques ne seront pas abordés dans ce paragraphe mais seront brièvement décrits dans la partie 3 de cette introduction.

1.1.3 Génétique, génomique et relation de synténie aubergine/tomate

De nombreuses études ont été menées sur le génome de la tomate et des cartes génétiques denses ont été publiées (Bernatzky and Tanksley 1986; Tanksley et al. 1992; Haanstra et al. 1999). Par ailleurs, le séquençage complet du génome a été publié en 2012 (Sato et al. 2012). La séquence du génome ainsi que d'autres ressources génétiques (gènes annotés, marqueurs moléculaires) sont accessibles sur le site de Solgenomics (<http://solgenomics.net>). Contrairement à la tomate, les travaux sur la génétique de l'aubergine sont moins avancés. La première carte de référence de l'aubergine a été construite à partir d'une population interspécifique issue du croisement MM195 (*S. linneanum*) × MM738 (*S. melongena*). Cette carte composée de 233 marqueurs couvrant les 12 chromosomes de l'aubergine a été exploitée pour réaliser une première analyse comparative des génomes de l'aubergine et de la tomate ; 23 inversions paracentriques et 5 translocations chromosomiques entre les deux espèces ont ainsi été mis en évidence (Doganlar et al. 2002). Plus tard, cette même carte a été densifiée en ajoutant des marqueurs COS (Conserved Ortholog Set). La carte comprend actuellement 347 marqueurs COS et RFLP couvrant 1535 cM. Grâce à ces marqueurs COS, une étude comparative plus fine des génomes tomate/aubergine a pu être menée et a révélé la présence au final de 24 inversions et 5 translocations chromosomiques entre les deux génomes (Figure 4), ainsi qu'un certain nombre de transpositions de gènes probablement dues à la présence d'éléments transposables (Wu et al. 2009). Les deux génomes présentent 37 segments chromosomiques dont l'ordre des gènes semble bien conservé (blocs synténiques). LWAE2012 est la carte génétique la plus complète obtenue à ce jour et comporte 1745 marqueurs couvrant les 12 chromosomes de l'aubergine (Hirakawa et al. 2014). La distance génétique totale de cette carte est de 1281 cM. En parallèle, le génome de l'aubergine a été séquencé par cette même équipe. A partir du séquençage de différentes lignées et cultivars d'aubergine, une première version du génome (draft) de l'aubergine a été publiée et annotée. Ce génome (noté SME_r2.5.1) est assemblé en 33 873 scaffolds et couvre 833 Mb, soit environ 74% de la taille estimée du génome complet (1.1 Gb ; Arumuganathan and Earle 1991). 28% des 33 873 scaffolds ont été alignés sur la version SL2.40 du génome de la tomate (Figure 5). Grâce à la carte génétique LWAE2012, 1117 scaffolds ont ensuite été réordonnés et 56 blocs synténiques (sb1 à sb56) entre l'aubergine et la tomate ont été définis. Des réarrangements chromosomiques non identifiés dans les travaux de Doganlar et al. (2002) et Wu et al. (2009) ont ainsi pu être établis.

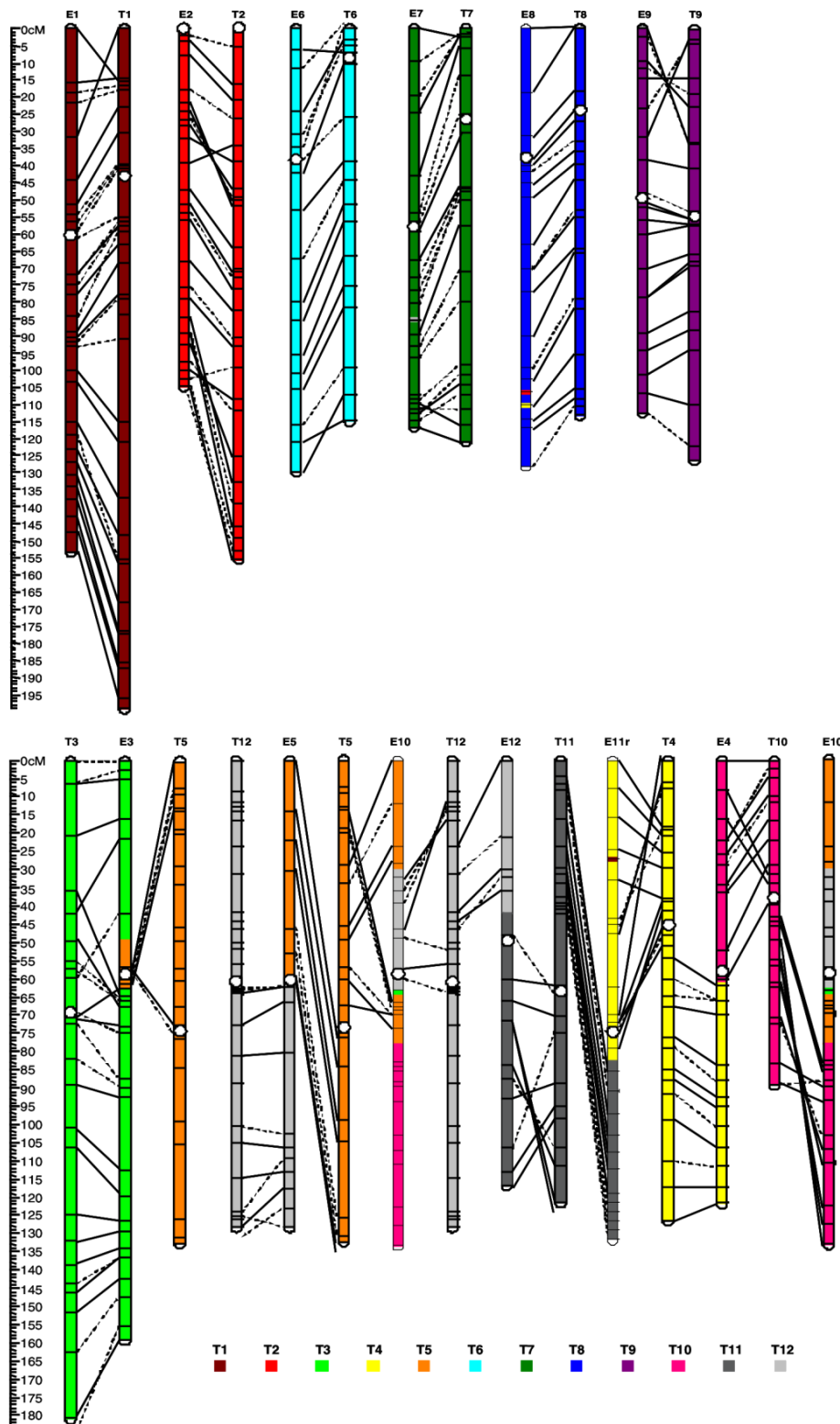


Figure 4: Comparaison des cartes génétiques de la tomate et de l'aubergine construites à partir de marqueurs COS (Wu et al. 2009). Les positions des centromères sont représentées par des ronds blancs. Les marqueurs positionnés à un $\text{LOD} \geq 2$ sont reliés par des lignes pleines et les marqueurs positionnés à un $\text{LOD} < 2$ sont reliés par des lignes en pointillées. Les chromosomes de la tomate T1 à T12 sont colorés selon le code couleur spécifié en bas de la figure. Les chromosomes de l'aubergine E1 à E12 sont colorés en fonction de leur correspondance avec les chromosomes de la tomate.

Au total, 42 035 gènes ont été prédits à partir de la version SME_r2.5.1 du génome de l'aubergine, dont 16 573 sont orthologues de gènes de la tomate (gènes présents chez l'ancêtre commun des deux espèces et ayant ensuite divergés lors de la spéciation). La comparaison de ces gènes avec ceux des autres cultures de Solanacées (*S. lycopersicum*, *S. tuberosum*, *N. benthamiana*) montrent la présence d'au moins 4 018 familles de gènes spécifiques de l'aubergine. Parmi ces familles, 19 d'entre-elles sont associées à des fonctions de résistance aux maladies. Ceci pourrait expliquer l'unique et large spectre de résistance observé chez l'aubergine et qui n'est pas présent chez les autres cultures de Solanacées (Hirakawa et al. 2014). Malgré les hauts niveaux de résistance rencontrés chez l'aubergine, celle-ci reste cependant sensible à un certain nombre de pathogènes. Les principaux d'entre eux sont décrits dans la partie suivante.

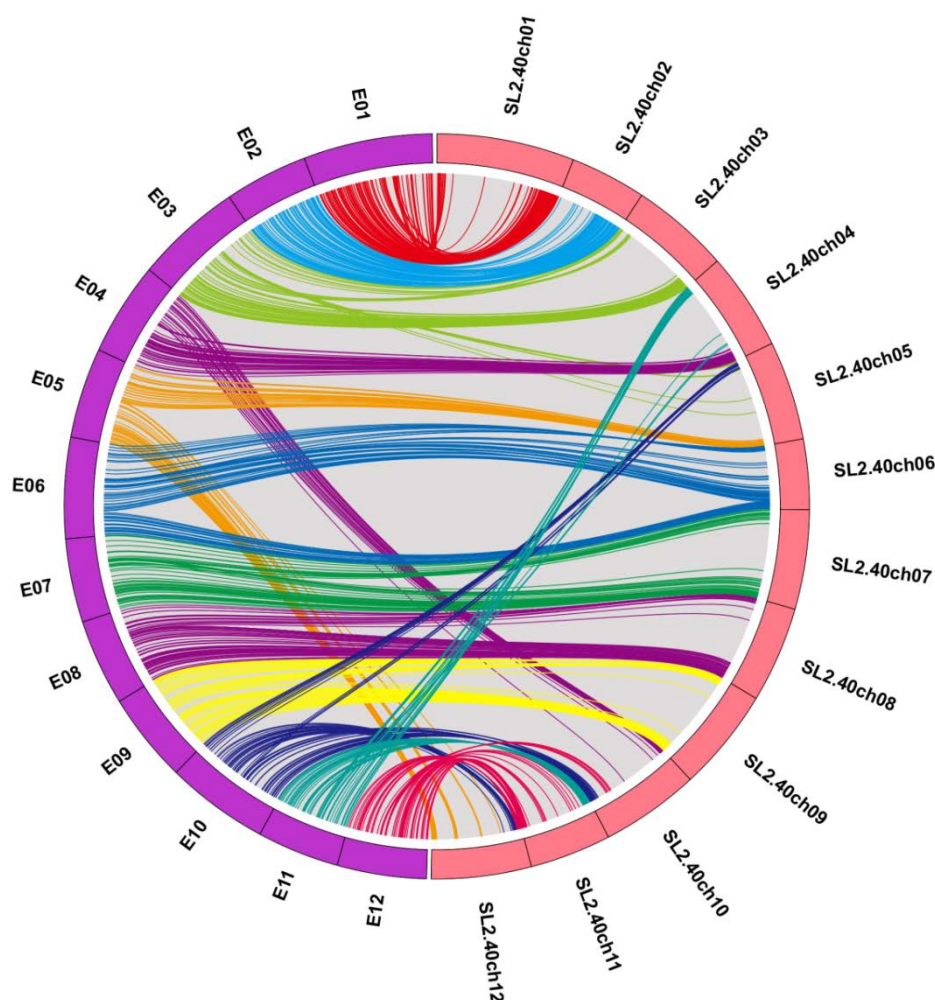


Figure 5: Alignement des séquences d'aubergines sur le génome de la tomate (Hirakawa et al. 2014). Les hémicycles gauche et droit représentent respectivement le génome de l'aubergine en distance génétique et le génome de la tomate en distance physique.

1.1.4 Principaux pathogènes de l'aubergine

Tout comme la tomate et le piment, la culture de l'aubergine est limitée par de nombreux pathogènes. Les virus transmis par des insectes comme les bégomovirus peuvent infecter l'aubergine. Néanmoins, l'occurrence des maladies virales sur l'aubergine est faible. L'aubergine est par contre assez sensible aux maladies fongiques (Tableau 1).

Tableau 1: Principales maladies de l'aubergine. D'après Daunay and Janick (2007).

Maladie	Organismes responsables de la maladie	Type d'organisme
Fonte des semis	<i>Pythium</i> spp.	Oomycète
Fonte des semis, pourriture des racines	<i>Rhizoctonia solani</i>	Champignon
Pourriture pycnidienne de la tige et du fruit	<i>Phomopsis vexans</i>	Champignon
Pourriture noire des fruits	<i>Alternaria</i> spp.	Champignon
Anthraxnose	<i>Colletotrichum coccodes</i>	Champignon
Verticilliose	<i>Verticillium dahliae</i>	Champignon
Fusariose racinaire	<i>Fusarium oxysporum</i>	Champignon
Sclérotiniose	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Champignon
Flétrissement bactérien	RSSC	Bactérie
Galles racinaires	<i>Meloidogyne</i> spp.	Nématode

Par exemple, la fusariose racinaire causée par *Fusarium oxysporum* provoque des dégâts importants sur les cultures au Japon et plus récemment en Europe (Daunay and Janick 2007). Ce champignon vasculaire bloque l'alimentation en eau de la plante, causant ainsi son flétrissement. Un autre champignon vasculaire, *Verticillium dahliae*, provoque le même type de symptômes que la fusariose. On observe un brunissement des vaisseaux et un flétrissement de la plante. Ce flétrissement est rarement mortel et la maladie est principalement rencontrée en milieu tempéré (Grubben 2004b). Les *pythium* s'attaquent surtout aux jeunes plantules en pépinière ou en plein champ. La plantule affectée flétrit, se dessèche et s'effondre très rapidement. Les *pythium* peuvent affecter aussi des plants plus âgés. On observe alors des jaunissements, des brunissements racinaires et des lésions humides au niveau du collet

(<http://ephytia.inra.fr>). Les nématodes de type *Meloidogynes* spp. peuvent également provoquer des dégâts importants sur les cultures d'aubergine. Au stade précoce de la maladie, une réduction importante de croissance des parties aériennes ainsi qu'une diminution du rendement peuvent être observées. Lorsque le nématode a fortement envahi les racines, les apports en eau de la plante vont alors être compromis et un flétrissement peut apparaître. Les nématodes, en créant des blessures dans les racines, facilitent également l'entrée d'autres pathogènes. Par exemple, il est proposé que la présence de nématodes à galles dans le sol aggrave les symptômes provoqués par le RSSC (Deberdt et al. 1999). Le BW causé par le RSSC est une des principales maladies des cultures d'aubergines. En Asie, le BW fait partie des cinq maladies les plus préjudiciables pour la culture d'aubergine (Ivey et al. 2007). Les caractéristiques du BW et de son agent sont détaillées dans la partie suivante.

1.2 Le flétrissement bactérien

1.2.1 Biologie et répartition

Le BW est une maladie qui affecte plus de 50 familles de plantes dont des cultures d'importance économique majeure (Hayward 1991). Parmi ces cultures, on compte de nombreuses espèces de la famille des Solanacées (tomate, pomme de terre, piment, aubergine), des espèces de légumineuses (cacahuète), des arbres (olivier, eucalyptus) et quelques Monocotylédones (bananier, gingembre) (Genin and Boucher 2002). Cette maladie est causée par une bactérie tellurique présente dans la rhizosphère et appartenant au RSSC. En l'absence d'hôte, la bactérie peut survivre de nombreuses années dans les sols humides ou dans l'eau où elle se nourrit de déchets organiques (stade saprophyte). En présence d'une plante hôte, la bactérie va pénétrer dans les racines, soit par les ouvertures naturelles (point d'émergence des racines latérales), soit par des blessures créées par des chocs mécaniques ou par d'autres pathogènes (nématodes à galles, piquûres et morsures d'insectes). Une fois entrée, la bactérie colonise le cortex racinaire, prolifère dans les vaisseaux du xylème, puis finalement se répand dans les parties aériennes de la plante. En se multipliant, la bactérie produit de grandes quantités d'exopolysaccharides (EPS) qui vont entraîner un dysfonctionnement des apports en eau. Le plant infecté commence alors à flétrir et meurt rapidement, libérant dans le sol de grandes quantités d'inoculum. Dans certains cas, le plant infecté reste asymptomatique malgré une très forte charge bactérienne dans son système vasculaire (mécanismes de tolérance) (Genin and Denny 2012). En libérant dans le sol d'importantes quantités d'inoculum, les espèces tolérantes participent à la multiplication du pathogène et favorisent son maintien dans le sol en période non favorable à sa survie (Hayward 1991). Le cycle infectieux du pathogène est résumé dans la Figure 6.

Les symptômes provoqués par la bactérie varient en fonction de l'agressivité de la souche et de la sensibilité de la plante hôte. Le symptôme le plus caractéristique est un flétrissement irréversible des feuilles (Figure 7). Ce flétrissement est souvent unilatéral dans un premier temps, puis se propage à l'ensemble de la plante, et enfin les feuilles flétries finissent par se nécroser. Dans les cas les plus graves, un brunissement de la tige et la présence d'exsudat bactérien au niveau de la gaine des feuilles sont observés.

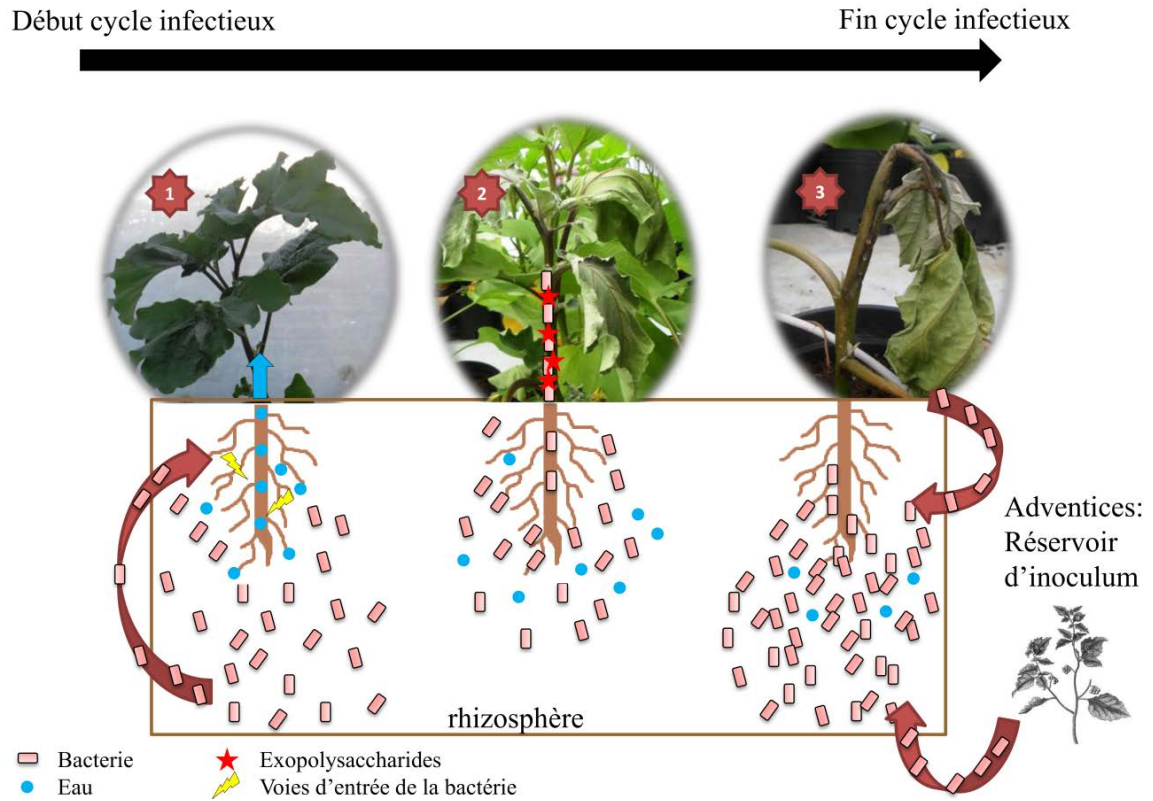


Figure 6: Cycle infectieux du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum*.



Figure 7: Symptômes de flétrissement bactérien sur aubergines (photos : S. Salgon).

Lorsque l'infection est moins avancée, la présence de jaunissement et d'épinastie foliaire ainsi que l'apparition d'ébauches de racines adventices sur la tige sont observées (Ciampi and Sequeira 1980; Grimault and Prior 1993). Chez la pomme de terre, la maladie peut s'étendre aux tubercules, qui, une fois infectés, peuvent contenir d'importantes quantités d'exsudat bactérien les rendant impropres à la consommation, la maladie étant ainsi appelée pourriture brune. Les symptômes sont parfois difficiles à différencier d'autres maladies vasculaires (*fusarium*, *verticillium*). Une coupe transversale de la tige peut alors permettre de différencier les pathogènes. En effet, la présence de RSSC engendre un brunissement des tissus vasculaires. Une méthode simple appelée « test du verre d'eau » peut aussi être utilisée pour détecter la présence de la bactérie. Il suffit de plonger une section de la tige proche du collet et de l'immerger dans l'eau. Si le flétrissement est effectivement causé par une des souches du RSSC, un exsudat blanchâtre apparaît alors (Figure 8).



Figure 8: Test du "verre d'eau" permettant de vérifier la présence de RSSC dans la tige de la plante (photo : S. Salgon).

Les colonies bactériennes sont également observables sur milieu de culture. Elles sont caractérisées par leur forme irrégulière et lisse, ainsi que leur couleur blanchâtre et rosée au centre (Figure 9A). Par ailleurs, ces colonies sont fluides et muqueuses. Ce phénotype a été associé à la production d'exopolysaccharides (EPS), molécules indispensables à la virulence des bactéries. Parfois, on peut apercevoir des colonies plus atypiques, de forme plus arrondie et de couleur rouge vif (Figure 9B). Ces variants produisent peu d'EPS et sont appelés variants avirulents.

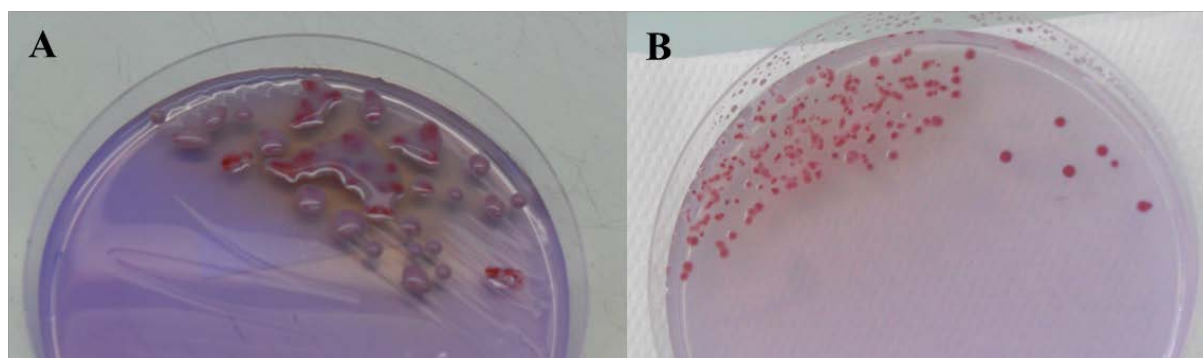


Figure 9: Colonies bactériennes sur milieu de culture Sequeira (photo : S. Salgon). **(A)** colonies d'aspect muqueux. **(B)** Colonies d'aspect rugueux.

Le BW est une maladie très répandue à travers le monde, mais qui reste néanmoins plus présente dans les zones tropicales et subtropicales (Figure 10). La bactérie se transmet de différentes façons. Une des plus communes est la transmission par des tubercules infectés mais asymptomatiques, notamment lors d'importation de pomme de terre. C'est ainsi que des souches adaptées à des températures fraîches se sont propagées à travers l'Europe dans les années 1990, causant de graves épidémies de pourriture brune (Janse 1996). La bactérie a pu subsister durant les conditions hivernales grâce à la présence d'adventices comme *Solanum dulcamara* ou *Solanum nigrum* (Elphinstone 1996). L'utilisation de matériel agricole infecté participe également à la dissémination de la maladie. L'eau d'irrigation est aussi une source importante de contamination et elle est considérée comme responsable de nouvelles apparitions de BW dans de nombreuses cultures (Coutinho T.A 2005). Plus rarement, Les bactéries ont été reportées dans les fruits et sur les graines des plants infectés qui peuvent donc aussi représenter des sources de dissémination sur de longues distances (Sanchez Perez et al. 2008). La dissémination de certaines souches du RSSC peut aussi s'effectuer par des insectes, causant notamment la maladie du sang du bananier ou la maladie de Sumatra sur giroflier (Remenant et al. 2011).

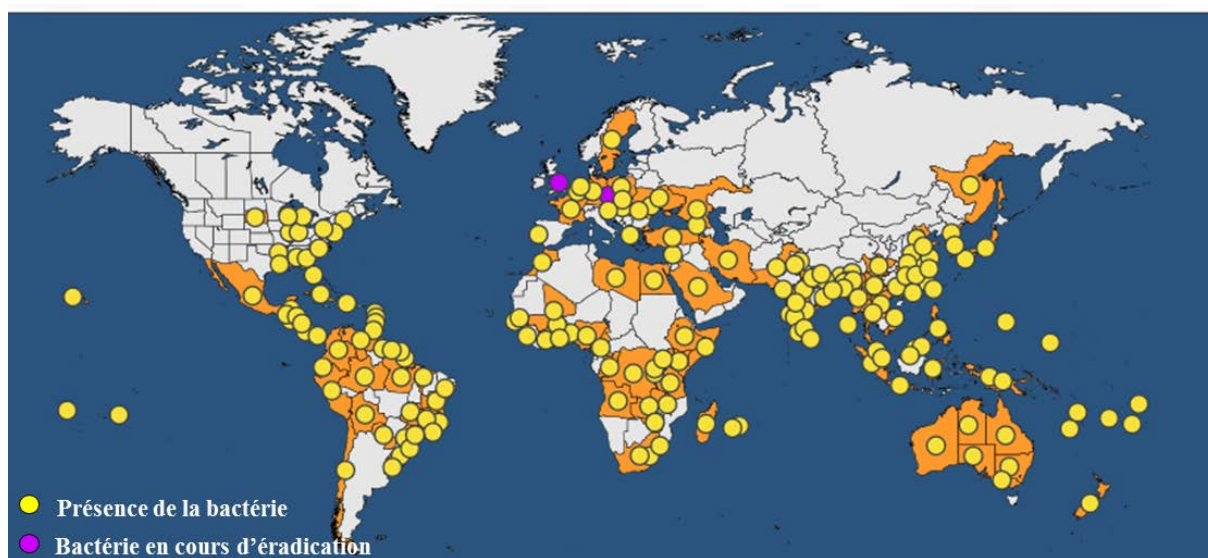


Figure 10: Distribution mondiale des souches du RSSC en 2016. D'après <https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution>.

1.2.2 Diversité génétique et pouvoir pathogène

1.2.2.1 Le RSSC : définition, classification et histoire évolutive

Le pathogène *Ralstonia solanacearum*, précédemment nommé *Pseudomonas solanacearum*, est considéré comme un complexe d'espèces en raison de sa grande diversité génétique (Gillings and Fahy 1994). Pendant des décennies, les souches de ce complexe ont été classifiées en races selon leur spectre d'hôtes ou en biovars selon leurs caractéristiques métaboliques et physiologiques. Plus tard, une analyse génétique basée sur des marqueurs RFLP a permis la définition d'une nouvelle classification des souches en phylotypes avec deux divisions majeures (Cook et al. 1989). Cette classification a été complétée par l'analyse du polymorphisme des séquences de trois gènes bactériens et a donné lieu à la division très populaire en quatre phylotypes (Poussier et al. 2000; Fegan and Prior 2005). Des origines géographiques ont été attribuées à chacun de ces phylotypes (Tableau 2). L'origine géographique des souches a été ultérieurement confirmée et affinée par une autre étude (Wicker et al. 2012). Cette même étude confirme la division en 5 lignées évolutives (phylotype I, IIA, IIB, III et IV). Chaque lignée évolutive possède une histoire démographique et des niveaux de recombinaison particuliers. Selon leur structure généalogique, leurs écotypes (groupe bactérien partageant les mêmes caractères écologiques) et leurs histoires démographiques, les phylotypes ont ensuite été subdivisés en 8 clades (Tableau 2).

Le phylotype IV est subdivisé en deux clades qui correspondent à des souches très diverses. Les souches du clade 7 sont responsables à la fois du BW sur Solanacées et de la

maladie du sang des bananiers causée par l'écotype BDB. Les souches du clade 8 sont responsables de la maladie de Sumatra sur giroflier. Ce phylotype est très recombino-gène mais ne semble pas être en expansion démographique. Par ailleurs, sa répartition est limitée à la zone Indonésie et il n'est retrouvé que très ponctuellement aux Philippines, au Japon et en Inde (Wicker 2015).

Tableau 2: Caractéristiques génétiques, géographiques et écologiques des souches du RSSC.

Phylotype ^a	Clade ^b	Informations sur l'écotype ^c	Origine géographique ^d	Nom d'espèce proposé ^e
I	1	BW sur Solanacées, gingembre, mûrier	Asie	<i>R. pseudosolanacearum</i>
III	6	BW sur Solanacées	Afrique	
IIA	2	BW sur Solanacées et Musacées	Amériques	<i>R. solanacearum</i>
	3	BW sur Solanacées		
IIB	4	Maladie de moko sur Musacées		
	5	Pourriture brune sur pomme de terre, BW sur tomate et géranium, maladie de moko sur Musacées		
IV	7	BDB sur bananier	Indonésie	<i>R. syzygii</i> subsp. <i>celebesensis</i>
		BW sur Solanacées		<i>R. syzygii</i> subsp. <i>indonesiensis</i>
	8	Maladie de Sumatra sur giroflier		<i>R. syzygii</i> subsp. <i>syzygii</i>

^a Groupes monophylétiques (Fegan and Prior 2006)

^b Subdivision en clades à l'intérieur des phylotypes (Wicker et al. 2012)

^c Principales plantes-hôtes et maladie causée (Genin and Denny 2012)

^d Probable origine géographique attribuée par Fegan and Prior, (2005)

^e Subdivisions du RSSC proposées par Safni et al., (2014).

Les phylotypes I et III, qui correspondent respectivement au clade 1 et 6, ont une histoire démographique similaire. Ils sont tous les deux très recombino-gènes et leur population est en expansion récente et rapide. Le phylotype I est réparti sur de nombreux continents et îles,

même en dehors de sa zone géographique initiale (Asie). En raison de ces caractéristiques, le phylotype I est considéré comme le phylotype ayant le potentiel évolutif le plus élevé (Wicker et al. 2012). Le phylotype I est très répandu dans les zones de production tropicales des Solanacées, le plus souvent à basse altitude en Asie, Afrique, Amérique du Sud et Centrale, et aux Caraïbes.

Le phylotype II est subdivisé en deux lignées évolutives (IIA et IIB). Ces deux lignées sont elles-mêmes divisées en deux clades (clades 2 et 3 pour le IIA, et clades 3 et 4 pour le IIB). Les deux lignées évolutives présentent des caractéristiques bien précises. Alors que le IIA est recombino-gène et en expansion démographique, le IIB est clonal et en faible expansion. C'est dans le phylotype IIB que l'on trouve les souches responsables de la maladie du « brown rot » ou pourriture brune de la pomme de terre. Certaines de ces souches sont capables de provoquer des symptômes à des températures fraîches (15°C nuit et 24°C jour ; Cellier and Prior (2010)).

A l'intérieur des phylotypes et des clades, un dernier niveau de subdivision permet de regrouper des souches génétiquement très proches. Il s'agit de la classification en séquevar (Fegan and Prior 2005). Les séquevars sont définis selon le pourcentage de similarité des séquences du gène de l'endoglucanase (*egl*). Si leurs gènes présentent moins de 1% de divergence, alors des souches seront classées à l'intérieur du même séquevar. Plus de 50 séquevars ont été définis jusqu'à aujourd'hui.

Enfin, le développement rapide des méthodes de séquençage des génomes a permis la définition d'espèces génomiques. Une subdivision en 3 espèces génomiques a d'abord été proposée par Remenant et al. (2011) à partir de la comparaison du génome de huit souches du RSSC. Cette division a ensuite été confirmée par Safni et al. (2014) et Prior et al. (2016). Dans cette classification, les phylotype I et III sont regroupés dans une même espèce appelée *R. pseudosolanacearum*, le phylotype II (englobant les lignées évolutives IIA et IIB) est nommé *R. solanacearum* et le phylotype IV est divisé en 3 sous-espèces de *R. syzygii* (Tableau 2).

1.2.2.2 Organisation du génome

Le séquençage complet de la souche GMI1000 en 2002 a apporté de nombreuses informations sur la composition et la structure du génome de la bactérie. Le génome, dont la taille a été évaluée à 5,8 megabase (Mb), est divisé en 2 réplicons : un chromosome de 3,7 Mb et un mégaplasme de 2,1 Mb (Salanoubat et al. 2002). Le chromosome contient les gènes de ménage codant pour des fonctions essentielles à la survie de la bactérie comme la réplication de l'ADN, la division cellulaire, la transcription ou la traduction. Par contre, le mégaplasme n'est pas indispensable à la survie de la bactérie, mais il contient des gènes codant pour des enzymes nécessaires au métabolisme primaire et la totalité des gènes *hrp* nécessaires pour induire des symptômes sur les plantes-hôtes (Salanoubat et al. 2002). Il contient également les gènes codant pour les constituants des flagelles et la synthèse des EPS. Les 2 réplicons présentent une structure en mosaïque contenant de nombreux éléments mobiles et des régions potentiellement acquises par transferts horizontaux. Cette structure particulière indique un fort potentiel évolutif de la bactérie. Depuis le séquençage de GMI1000, de nouveaux génomes complets et incomplets ont été produits (Remenant et al. 2010; Li et al. 2011; Remenant et al. 2011; Cao et al. 2013; Guinard et al. 2016a). La comparaison de huit de ces génomes a servi à définir un ensemble de gènes communs au RSSC et un ensemble de gènes variables. Il y aurait ainsi 2850 gènes conservés représentant le core-génome et 3100 gènes variables (Genin and Denny 2012). Précédemment, l'hybridation du génome de 18 souches du RSSC sur une puce pangénomique, créée à partir de la souche GMI1000, avait révélé la présence de 2690 gènes conservés et 2338 gènes variables. La présence de nombreux gènes associés à la pathogénicité dans le répertoire des gènes conservés suggère que le RSSC est un pathogène ancestral (Guidot et al. 2007).

1.2.2.3 Quelques déterminants du pouvoir pathogène

La mobilité

Les bactéries se déplacent dans le sol grâce à un flagelle. Les mutants qui n'ont pas de flagelles ou un flagelle défectueux perdent leur virulence sur des plants de tomate lorsqu'ils sont inoculés dans le sol. Par contre, ces mêmes mutants inoculés dans le xylème retrouvent leur virulence et provoquent des symptômes sur la tomate (Tans-Kersten et al. 2001). Ces résultats suggèrent que le flagelle est un élément essentiel pour que la bactérie puisse arriver aux points

d'entrée des racines (Kim et al. 2016). Par contre une fois à l'intérieur des racines, c'est le pilus de type IV qui est impliqué dans un type particulier de mobilité appelée « twitching motility » (Wall and Kaiser 1999). Ce système est fondé sur la rétraction des pili et permet des mouvements à l'interface des surfaces solides.

Les exopolysaccharides (EPS)

Les EPS sont produits en grande quantité par les souches virulentes du RSSC aussi bien en culture sur milieu nutritif que dans la plante (Denny 2006). La synthèse des EPS est contrôlée par les groupes de gènes *eps* et *ops*. Les mutants *eps* provoquent très rarement des symptômes sur les plantes-hôtes, même lorsqu'ils sont directement injectés dans le xylème (Saile et al. 1997). L'accumulation des EPS serait largement responsable des dysfonctionnements vasculaires de la plante entraînant son flétrissement. Par ailleurs, les EPS limiteraient la fixation des bactéries aux agglutines végétales, facilitant ainsi leur circulation à l'intérieur de la plante (Duvick and Sequeira 1984).

Les enzymes extracellulaires

Les bactéries du RSSC sécrètent des enzymes extracellulaires de nature pectolytique ou cellulolytique, afin de dégrader la paroi pectocellulosique végétale. La bactérie peut ainsi franchir plus facilement la barrière physique que représente la paroi végétale (Kim et al. 2016). Les exoenzymes joueraient ainsi un rôle important dans les stades précoces de l'infection. Ces enzymes sont sécrétées via le système de sécrétion de type II (SST2) (Genin and Denny 2012).

Gènes *hrp* et effecteurs de type III

Un des principaux déterminants de la virulence chez les bactéries pathogènes des plantes et des animaux est le système de sécrétion de type III (SST3), aussi appelé chez les bactéries phytopathogènes système Hrp (Hypersensitive response and pathogenicity) (Galán and Collmer 1999; Büttner and Bonas 2003). Les composants du SST3 sont codés par le cluster de gènes *hrp* situé sur le mégaplasmide (Genin et al. 1992). Ce système permet aux bactéries d'injecter dans les cellules de la plante hôte les protéines dites effecteurs de type III (ET3) qui ont un rôle dans la virulence et l'agressivité. Une mutation dans les gènes *hrp* induit l'incapacité de la bactérie à proliférer dans la plante hôte sensible, et aussi l'absence de réaction d'hypersensibilité sur les plantes hôtes résistantes (Boucher et al. 1987). Le cluster de gènes *hrp* comprend 3 types de gènes : les gènes de régulation, des gènes *hrc* (*hrp* gene

conserved) codant pour les protéines du système de sécrétion, et des gènes codants pour les ET3. D'après l'analyse du génome de GMI1000 et de RS1000, deux souches phylogénétiquement proches, le RSSC contiendrait un répertoire de 70 à 75 ET3 ; en moyenne les souches du RSSC contiennent entre 60 et 75 ET3, excepté pour les souches *R. syzygii* qui contiennent un nombre plus restreint d'ET3 (Genin and Denny 2012). Enfin, la comparaison de 11 génomes de RSSC a mis en évidence la présence de 94 gènes et 16 gènes putatifs codant des ET3 (Peeters et al. 2013a). Ce nombre d'ET3 prédit est supérieur à celui des autres bactéries phytopathogènes.

1.2.3 Contrôle du pathogène

1.2.3.1 Mesures de prophylaxie

Le pathogène étant difficile à éliminer du sol, les mesures de prophylaxie sont donc essentielles pour éviter la contamination des parcelles cultivées. La plupart des contaminations à l'échelle mondiale résultent du transport de matériaux infectés et notamment de tubercules de pomme de terre contaminés. Ceci a donné lieu à la dissémination rapide et récente des souches du clade 5 (phylotype IIB-1) (Hayward 1991; Wicker et al. 2012). Afin de limiter la propagation du pathogène, des mesures de quarantaine ont été renforcées dans de nombreux pays. Le matériel est rigoureusement inspecté pour vérifier la présence du pathogène. Les méthodes d'inspection vont de la simple inspection visuelle à des diagnostics plus précis en laboratoire (Saddler 2005). Les efforts ont principalement porté sur le contrôle des échanges de pomme de terre. Cependant le phylotype I présente aussi des signatures d'expansion rapide et sa distribution mondiale montre qu'il est nécessaire de contrôler tous les vecteurs potentiels de ce phylotype (tubercules non symptomatiques, graines, fruits) qui sont encore mal connus (Wicker 2015). Les actions de quarantaine impliquent la destruction immédiate du matériel importé. En parallèle, il est recommandé aux agriculteurs installés dans des zones infestées d'éliminer les adventices qui sont autant de réservoirs potentiels d'inoculum, d'éviter l'irrigation des cultures avec des eaux de surface et de désinfecter le matériel agricole après utilisation (<https://www.legifrance.gouv.fr/eli/arrete/1999/2/11/AGR9900326A/jo/texte>).

Les pratiques culturales peuvent aussi permettre de diminuer le niveau d'incidence de la maladie dans les zones infestées. La rotation des cultures est particulièrement recommandée pour diminuer l'incidence de maladie face à des souches ayant un spectre d'hôtes restreint, comme les souches « brown-root » (IIB-1) affectant la pomme de terre (Saddler 2005). Les

cultures non hôtes (absence de symptômes et de colonisation du xylème) sont nombreuses : luzerne, carotte, radis noir, céleri, haricot, lin, fenouil (Álvarez et al. 2008). La durée des rotations estimée pour observer une diminution significative de l'incidence de maladie est de deux à cinq ans (Saddler 2005). Par exemple, une rotation sur 5 ans pomme de terre-blé-lupin-maïs-pomme de terre permet d'avoir une incidence de flétrissement seulement de 6,3% sur le dernier cycle de culture, alors qu'avec une culture non alternée de pomme de terre, une incidence de 80,1% a été observée sur le cycle final (Verma and Shekhawat 1991).

1.2.3.2 Les agents de bio contrôle

L'utilisation d'agents biologiques pour contrôler le BW a également été proposée et a donné des résultats prometteurs. Les principaux agents de contrôle biologique étudiés jusqu'à présent sont les bactéries antagonistes du RSSC. Ces bactéries, adaptées aux mêmes conditions environnementales que les souches du RSSC, entrent en compétition avec le pathogène pour l'utilisation des ressources du sol (Ciampi-Panno et al. 1989) ou produisent des substances antimicrobiennes (El-Abyad et al. 1996). Plus récemment, une étude a mis en évidence la capacité de certaines bactéries antagonistes à former des biofilms protecteurs sur la surface des racines des plantes (Chen et al. 2013). Grâce à ce mécanisme, la densité des populations pathogènes dans la rhizosphère est ainsi réduite et l'incidence de la maladie diminue. Les rhizobactéries comme *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., ou encore *Streptomyces* spp., peuvent par exemple être utilisées pour le biocontrôle des souches du RSSC (El-Abyad et al. 1996; Guo et al. 2004; Chen et al. 2013). L'utilisation de bactériophages capables d'infecter des souches du RSSC représente un autre moyen de biocontrôle. Ces phages agissent généralement en détruisant les bactéries grâce à leur activité lytique. Différents types de phages ont montré leur efficacité sur la diminution de la densité des populations bactériennes. Par exemple, les phages ϕ RSL1 et ϕ RSA1 inhibent la croissance des colonies bactériennes *in vitro* (Yamada et al. 2007). Par ailleurs, il a été montré que ϕ RSA1 pouvait infecter 15 souches du RSSC appartenant à différents races et biovars. L'activité *in vitro* de ces deux bactériophages a également été testée *in vivo* sur des plants de tomates et seule l'efficacité de ϕ RSL1 a été confirmée (Fujiwara et al. 2011). Dans une autre étude, l'inoculation de plants de tomate avec le phage ϕ RSM3 a augmenté son niveau de résistance (Addy et al. 2012). Tout comme les autres membres de sa famille (*Inoviridae*), ϕ RSM3 ne semble pas avoir d'activité lytique. Il entraîne par contre une conversion du phénotype de la bactérie infectée qui passe ainsi d'un phénotype virulent à avirulent. Cette conversion de

phénotype serait due à une inactivation des gènes bactériens *phcA* et *hrpB* par le phage. Il semblerait également être impliqué dans l'activation des gènes de défense de la plante (Addy et al. 2012).

Ces méthodes de biocontrôle semblent être prometteuses, cependant leur efficacité et leur applicabilité n'ont pas encore été démontrées au champ (Saddler 2005). Des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier le spectre d'action de ces agents biologiques et leur durée de vie une fois appliqués dans le sol (Addy et al. 2012).

1.2.3.3 L'amélioration variétale

Malgré tous ces outils disponibles pour limiter les impacts du BW, la maladie continue encore aujourd'hui à faire des dégâts considérables et la méthode de lutte la plus efficace reste l'utilisation de variétés résistantes. Des sources de résistance sont disponibles chez certaines espèces et ont été utilisées soit pour la création de variétés résistantes, soit directement en tant que porte-greffe. L'espèce *S. torvum* est par exemple communément utilisée comme porte-greffe de l'aubergine et de la tomate sur l'île de la Réunion (Clain et al. 2004). L'utilisation de *S. torvum* en tant que porte-greffe de l'aubergine se montre aussi très prometteuse pour les zones de production en Inde (Ramesh et al. 2016). Cependant, l'utilisation de porte-greffe représente un coût pour l'agriculteur qui peut être prohibitif.

Des programmes d'amélioration génétique de la résistance au BW ont donc été mis en œuvre chez l'aubergine depuis de nombreuses années et ont permis la création de cultivars résistants comme par exemple l'hybride F₁ Kalenda mise au point conjointement par l'INRA-IRAT et initialement commercialisé dans les Antilles françaises puis en Afrique (Grubben 2004a). Chez la tomate, l'accession CRA 66 est à l'origine des variétés résistantes Caraïbo, Caracoli et Calinago cultivées dans les zones tropicales (Ano et al. 2002). D'autres sources de résistance ont été décrites par l'université d'Hawaii (Hawaii 7996, Hawaii7997 et Hawaii7998). Ces cultivars ont été peu utilisés en raison de leur valeur agronomique médiocre mais représentent par contre des porte-greffes intéressants (Nakaho et al. 2004; McAvoy et al. 2012). La pomme de terre (*Solanum tuberosum*) a quant à elle été améliorée pour la résistance au BW à partir des espèces apparentées *S. phureja*, *S. stenostomum* et *S. commersonii* (Boshou 2005).

Cependant, certaines de ces résistances s'expriment de façon très variable selon l'environnement considéré (souche bactérienne, conditions climatiques), soulignant les limites du déploiement de résistances dont le déterminisme génétique est inconnu. Brièvement, la création variétale se heurte principalement aux 3 problèmes suivants (Boshou 2005; Huet 2014) :

- La résistance variétale semble s'être érodée ou est contournée par le pathogène
- La résistance variétale est très dépendante de la souche utilisée et le niveau de résistance varie fortement en fonction de l'environnement
- La résistance est liée à des caractères agronomiques indésirables

La diversité naturelle des espèces cultivées et de leurs apparentés sauvages représente un réservoir important de facteurs de résistance encore inconnus et qui nécessitent des études génétiques plus approfondies. Les études sur ce sujet se sont principalement focalisées sur les espèces modèles telles que *Medicago truncatula* ou *Arabidopsis thaliana*. Les études génétiques sur les espèces cultivées sont moins nombreuses et consistent principalement à localiser les facteurs génétiques sur des cartes génétiques peu denses en marqueurs moléculaires. Cependant, les méthodes de séquençage de nouvelle génération (Next-Generation Sequencing ou NGS), dont le coût n'a cessé de diminuer durant la dernière décennie, ont redynamisé les études génétiques sur les espèces qui font l'objet d'un intérêt scientifique moins important. Dans la partie suivante, je décrirai brièvement les bases de la résistance des plantes aux maladies et les concepts de génétique mendélienne et quantitative qui sont utilisés pour identifier et localiser les facteurs de résistance, puis je présenterai les dernières technologies de séquençage de l'ADN qui sont des outils puissants pour localiser sur le génome et ensuite caractériser plus efficacement les facteurs de résistance aux maladies. Enfin, je ferai un point sur les mécanismes de résistance au BW décrits à ce jour.

1.3 La Résistance au flétrissement bactérien

1.3.1 Mécanismes généraux de résistance

1.3.1.1 La dualité des résistances

Parmi les millions de micro-organismes présents dans l'environnement, un petit nombre d'entre eux sont pathogènes des plantes (Lipka et al. 2008). Lorsqu'un micro-organisme n'est pas capable d'infecter une espèce végétale, le terme de résistance non-hôte est utilisé. Par contre, lorsqu'un micro-organisme infecte certains individus d'une espèce, alors que d'autres individus ne sont pas infectés, le terme de résistance hôte est utilisé (Heath 2000). Les mécanismes de résistance non-hôte impliquent généralement des systèmes de défense constitutive alors que les mécanismes de résistance hôtes sont plus souvent basés sur des interactions moléculaires induites par la présence du pathogène. Pour cette partie, je détaillerai uniquement la résistance hôte.

Selon le type de ségrégation observée dans les populations de plante, les résistances sont considérées comme quantitatives ou qualitatives (Roux et al. 2014). Dans le cas d'une résistance qualitative, une distribution discontinue du caractère mesuré est observée parmi les individus d'une population (Figure 11A, gauche). La population présente un phénotype binaire Résistant/Sensible. D'un point de vue génétique ce type de résistance est conféré par un système monogénique ou oligogénique (très peu de gènes déterminent ce caractère). Le niveau de résistance observé est souvent très élevé, on parle aussi de résistance totale. L'étude de ces systèmes a permis de mettre en évidence l'implication des gènes de type R dans ce type de résistance (Miedaner 2016). Les gènes R sont impliqués dans la reconnaissance directe ou indirecte d'effecteurs microbiens (Boller and He 2009). Les effecteurs microbiens reconnus par un gène R sont des effecteurs d'avirulence (Avr) et sont spécifiques d'un gène particulier (Figure 11B, gauche). L'interaction R-Avr induit généralement une réaction d'hypersensibilité (HR), qui est caractérisée par une nécrose des tissus infectés limitant ainsi la propagation du pathogène. La résistance conférée par la reconnaissance d'effecteurs est appelée ETI (Effector-Triggered Immunity) et elle est limitée aux pathogènes possédant le gène Avr correspondant au gène R (relation spécifique gène pour gène).

Dans le cas d'une résistance quantitative (QDR), une distribution continue du caractère mesuré est observée parmi les individus d'une population (Figure 11A, droite). Le niveau de résistance varie progressivement d'un individu à un autre (Roux et al. 2014). Ce type de

résistance est souvent déterminé par plusieurs gènes (système polygénique), chacun contribuant à la résistance finale. Les gènes responsables de ce type de résistance sont peu connus et peuvent être impliqués dans des voies métaboliques diverses (Figure 11B, droite). Le mécanisme le mieux étudié à ce jour est la reconnaissance des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Pattern) par les récepteurs transmembranaires PRRs (Pattern Recognition Receptors). Les PAMPs, également nommés MAMPs (Microbe-Associated Molecular Pattern) sont des molécules microbiennes conservées. Les MAMPs peuvent par exemple être des lipopolysaccharides bactériens, de la chitine, des peptidoglycanes ou encore de la flagelline (Monaghan and Zipfel 2012). Lors de leur entrée dans la plante, les pathogènes causent des dégâts sur les parois végétales. Les DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) sont des molécules engendrées par la dégradation des parois végétales et peuvent aussi être reconnues par les PRRs (Kushalappa et al. 2016). Ces interactions des PRRs avec les PAMPs ou les DAMPs induisent des réactions de défense appelées PTI (PAMPs-Triggered Immunity). Au cours de la PTI, des chaînes métaboliques sont activées, incluant la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et l'activation d'enzymes MAPKs et CDPKs (Mitogen-Associated et Calcium-Dependent Protein Kinases) (Malinovsky et al. 2014).

Dans les populations de plantes, les réactions de défense de type ETI et PTI seraient le résultat d'un processus coévolutif entre la plante-hôte et son pathogène. Ce processus est illustré par le modèle en zigzag (Jones and Dangl 2006). Ce schéma comporte quatre étapes successives (Figure 12):

- Dans la première étape, la reconnaissance des PAMPs par les PRRs de la plante induit la réaction de PTI, ce qui confère une résistance partielle à la plante (résistance quantitative).
- Dans la seconde étape, des pathogènes possédant des effecteurs capables d'inhiber la PTI vont être sélectionnés (en rouge). La PTI ne fonctionnant plus, la plante devient sensible donnant lieu à une ETS (Effector-Triggered Susceptibility)
- Dans la troisième étape, des plantes possédant un gène R vont reconnaître spécifiquement l'effecteur et déclencher l'ETI. L'ETI génère alors une résistance qualitative ou totale, impliquant la HR.
- Finalement dans la quatrième étape, des pathogènes ayant perdu l'effecteur reconnu par le gène R (en rouge) et possédant de nouveaux effecteurs (en bleu) vont être

sélectionnés et provoquer l'ETS. L'ETS durera jusqu'à ce qu'un nouveau gène de type R capable de reconnaître l'effecteur correspondant soit sélectionné par la plante.

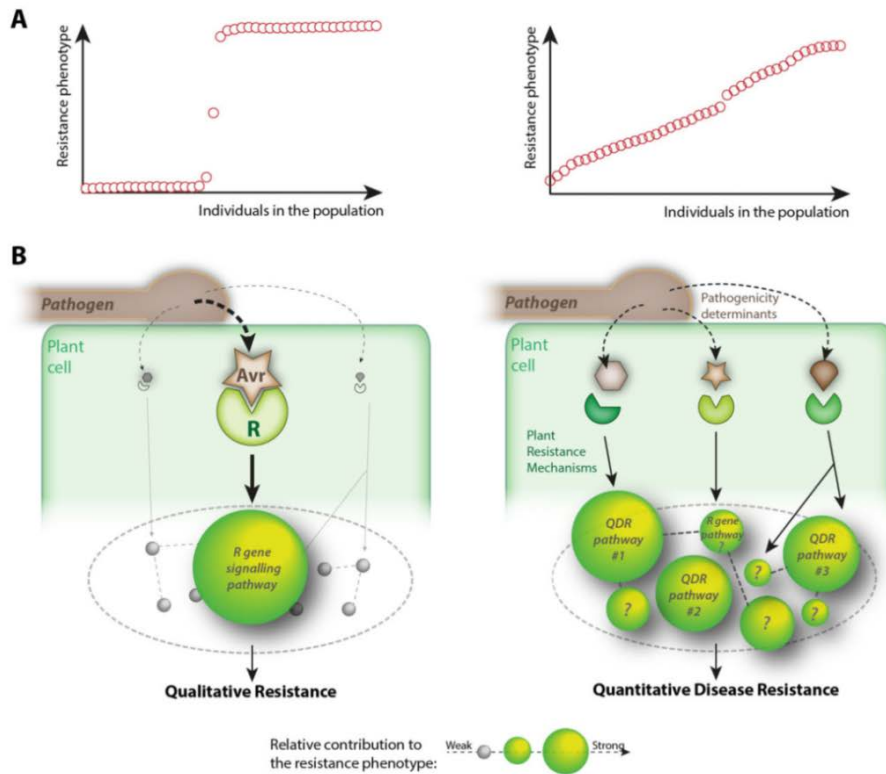


Figure 11: Présentation des deux types de résistance aux maladies présents chez les plantes, d'un point de vue populationnel et moléculaire (Roux et al. 2014). Les images de gauche et droite représentent respectivement la résistance qualitative et la résistance quantitative. Le système de résistance est décrit d'un point de vue biologique dans une population **(A)** et d'un point de vue moléculaire **(B)**.

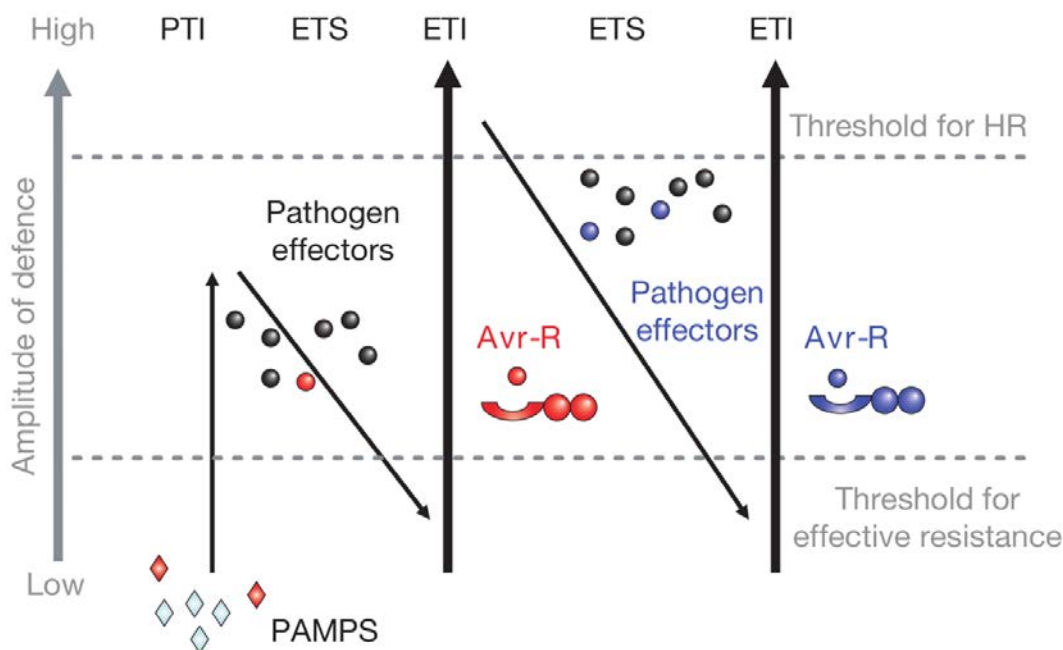


Figure 12: Présentation du modèle en zigzag (Jones and Dangl 2006).

1.3.1.2 Structure des gènes de résistance

Grâce au clonage de différents gènes de résistance, des structures typiques ont été mises en évidence et ont permis par comparaison de séquences d'identifier des RGA (Resistance Genes Analogs), gènes potentiellement impliqués dans des mécanismes de résistance. Les RGA présentent des caractéristiques structurales permettant de les reconnaître et de les classer. Les protéines présentent un domaine LRR (Leucine-Rich-Repeat) associé soit à un domaine NBS (Nucleotide Binding Site) soit à un domaine TM (Trans-Membrane). Les protéines sont ainsi classées en deux grands groupes : le groupe des NB-LRR et le groupe des TM-LRR. Les protéines NB-LRR (Figure 13A) sont des récepteurs intracellulaires généralement impliqués dans les interactions R-Avr. Cette classe de protéines serait donc responsable de la résistance qualitative observée dans les plantes. Les NB-LRR sont sous-divisés en deux groupes : le groupe des Toll-interleukin-1 (TIR) NB-LRR dont l'abréviation est TNL et le groupe des non TNL ou coiled-coil (CC) NB-LRR dont l'abréviation est CNL. Les protéines TM-LRR sont aussi subdivisées en deux groupes : les RLK (Receptor Like Kinases), qui possèdent un domaine kinase, et les RLP (Receptor Like Protein), chez qui le domaine kinase est absent (Figure 13B). Ces protéines seraient impliquées dans les interactions PRR/PAMP et seraient donc à l'origine de la PTI. En outre, des protéines

appartenant à d'autres classes (peroxydases, pentatricopeptides repeats proteins) peuvent aussi être impliquées dans les mécanismes de résistance (Sekhwal et al. 2015).

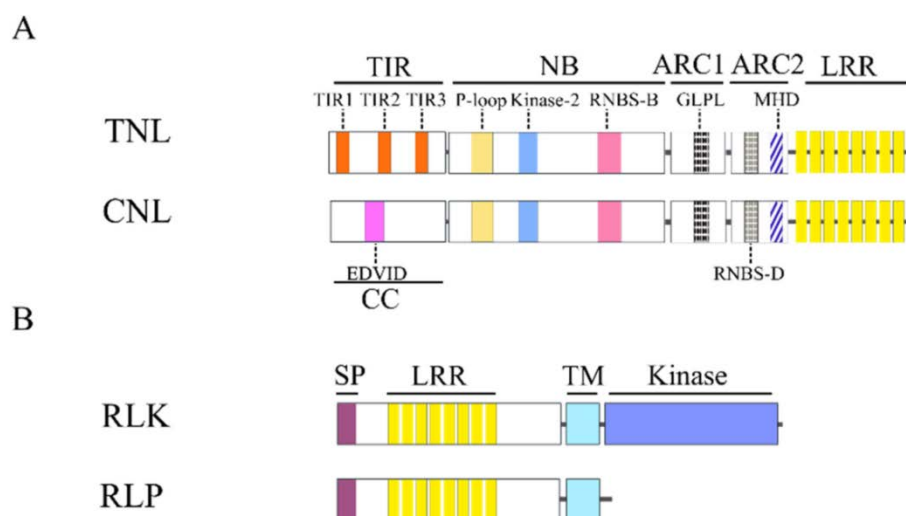


Figure 13: Représentation schématique de la structure des quatre classes majeures de protéines de résistance (Sekhwal et al. 2015).

1.3.1.3 QDR et relation gène pour gène, une distinction pas si évidente

Les gènes de résistance de type NB-LRR sont les mieux caractérisés à ce jour. Ces gènes sont traditionnellement nommés gènes R et sont utilisés depuis de nombreuses années dans les programmes d'amélioration variétale. Des interactions directes ou indirectes entre les récepteurs R et les effecteurs bactériens ont été caractérisées. Les gènes impliqués dans les résistances quantitatives (QDR) ont par contre été plus rarement identifiés. Des zones du génome impliquées dans la variation quantitative d'un trait (QTLs) ont été localisées finement chez certaines espèces mais cette localisation a rarement mené à l'identification des gènes sous-jacents. D'après Poland et al. (2009), six hypothèses principales expliquent les mécanismes génétiques sous-jacents à la QDR.

-hypothèse 1 : La QDR serait déterminée par des gènes également impliqués dans le déterminisme de traits morphologiques ou dans des voies de développement de la plante. Cette hypothèse est basée sur différentes observations : certains QTLs de résistance sont spécifiquement détectés à un stade phénologique précis (susceptibilité aux maladies accrue

après la floraison) et certains traits morphologiques (comme la densité en stomates et leur durée d'ouverture) peuvent affecter la résistance aux maladies.

-hypothèse 2 : La QDR serait déterminée par des mutations des gènes impliqués dans le PTI. Cette hypothèse a été confirmée par le clonage du gène *FLS2* (Flagellin-sensitive 2) chez *Arabidopsis Thaliana*. Certains allèles de ce gène produisent une protéine qui n'est pas perçue correctement par un récepteur membranaire de la famille des RLK. La PTI est alors affectée. En fonction de l'allèle présent, la plante présente donc un niveau de susceptibilité plus ou moins élevé conduisant à une ségrégation quantitative de la résistance.

-hypothèse 3 : La QDR serait impliquée dans une « guerre chimique » entre la plante et le pathogène. Les pathogènes produisent des phytotoxines qui sont des composés toxiques pour la plante. Afin d'éliminer ces composés, la plante produit des phytoalexines. La production de phytoalexines serait corrélée avec la QDR.

-hypothèse 4 : La QDR pourrait être déterminée par des variations dans les signaux de transduction lors de la PTI ou l'ETI. Lors de la perception du pathogène par les PRRs ou les gènes R, des mécanismes de résistance vont être mis en place. Ces mécanismes impliquent la production de phytohormones comme l'acide salicylique, l'acide jasmonique ou l'éthylène. Ces différentes chaînes métaboliques sont régulées par des gènes qui pourraient être des déterminants génétiques de la QDR.

-hypothèse 5 : La QDR serait causée par des gènes de type R (NB-LRR) qui auraient été contournés par un variant virulent. Cette hypothèse est basée sur différents exemples. Tout d'abord, la co-localisation entre des QTLs de résistance et des gènes de type R a fréquemment été observée chez de nombreuses espèces. Par ailleurs, certains gènes clonés sont des gènes R de la famille des NB-LRR et confèrent malgré cela une résistance partielle. Enfin, certains QTLs semblent isolat-spécifique ou race-spécifique, confirmant une similarité des mécanismes avec les gènes R.

-hypothèse 6 : La QDR serait déterminée par des gènes dont les fonctions restent inconnues. Dans certaines études de cartographie génétique, les QTLs de résistance ont été localisés dans une zone chromosomique ne contenant aucun gène de type R connu à ce jour.

Ces six hypothèses illustrent la complexité des mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la résistance quantitative aux maladies. L'amélioration des connaissances sur ces systèmes complexes repose en grande partie sur la localisation précise des QTLs à l'aide des cartes génétiques. Le chapitre suivant décrit les méthodes disponibles pour localiser ces QTLs et fait un point sur les QTLs et gènes de résistance au BW détectés à ce jour.

1.3.2 Cartographie de gènes de résistance

1.3.2.1 Concepts de cartographie génétique et clonage positionnel

Gregor Mendel (1822-1884) est considéré comme le fondateur de la génétique (Smýkal et al. 2016). Ses travaux sur la transmission des caractères du pois vert (*Pisum sativum*) à travers plusieurs générations ont permis d'énoncer les premières lois sur l'hérédité des caractères. Mendel propose l'existence d'unités hérissables qui ségrégent indépendamment lors de la formation des gamètes. Chaque unité contient deux allèles, l'un venant du gamète mâle, le deuxième provenant du gamète femelle. Si ces travaux ont posé les bases théoriques de la génétique classique, il faudra attendre la découverte des chromosomes et des principes de la méiose pour comprendre les bases moléculaires qui gouvernent cette hérédité. Au 20^{ème} siècle, les découvertes scientifiques se sont accélérées avec la mise en évidence de la structure de l'ADN et la compréhension du fonctionnement des gènes. Ces découvertes ont bouleversé les méthodes de sélection variétale en introduisant la notion de marqueur génétique. Les marqueurs génétiques sont des zones du génome physiquement proches d'un gène d'intérêt (Lande and Thompson 1998). Ils vont donc ségréger de la même façon que le gène d'intérêt et permettent donc de « tracer » ce gène à travers les générations, même si celui-ci n'est pas connu (Collard et al. 2005). Les marqueurs génétiques moléculaires sont aujourd'hui largement utilisés pour accélérer l'introduction de caractères d'intérêt dans les variétés commerciales. Cette utilisation des marqueurs moléculaires pour introduire des caractères d'intérêt dans une variété est communément appelé la SAM (Sélection assistée par marqueurs). Avant d'être introgressés dans une variété, les caractères d'intérêt sont généralement localisés sur une carte génétique (Collard and Mackill 2008). Pour cela, la descendance d'un croisement entre deux lignées pures (homozygote sur le génome entier) qui diffèrent fortement pour le caractère d'intérêt est fréquemment utilisée (Collard et al. 2005). Les populations généralement utilisées pour construire des cartes génétiques sont les backcross (BC), les lignées recombinantes (Recombinant inbred lines, RILs), les populations F₂ et les populations d'haploïdes doublés (Doubled haploid, DH) (Figure 14).

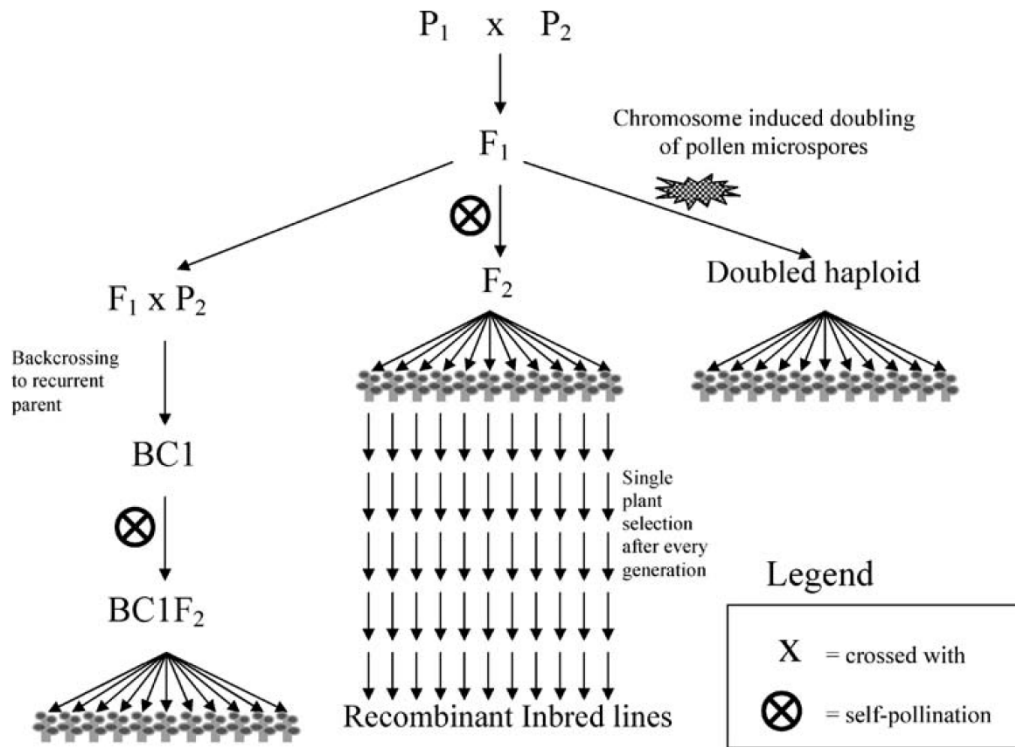


Figure 14 : Description des différents types de populations utilisées pour construire des cartes génétiques et cartographier des caractères d'intérêt (Collard et al. 2005).

Les populations BC sont obtenues en croisant la génération F_1 avec un des deux parents. La génération obtenue est à son tour croisée avec le même parent (« parent récurrent »). Les analyses génétiques se font généralement sur la génération BC_1F_2 . Les populations F_2 sont obtenues en autofécondant des individus de la génération F_1 . Les populations BC_1F_2 et F_2 présentent l'avantage d'être rapidement produites. Par ailleurs la présence d'hétérozygotes permet d'inclure les effets de dominance dans les modèles génétiques possibles (Zhang et al. 2010). En revanche, ces populations ne peuvent pas être immortalisées et ne peuvent donc être utilisées que sur un pas de temps limité (Collard et al. 2005). Les populations de RILs sont obtenues en autofécondant des individus d'une population F_2 puis en autofécondant les individus F_3 et ainsi de suite jusqu'à ce que la population soit quasiment fixée (générations F_7/F_8). Ce type de population a été très utilisée en cartographie génétique car elle représente une population dite « immortelle » qui peut être multipliée à l'infini (les générations après la F_6 sont considérées comme identiques, l'hétérozygotie résiduelle étant négligeable). Ce genre de population prend par contre du temps à produire et exige un travail important. Les DH tout comme les RILs présentent l'avantage d'être « immortelles » et leur création peut se faire beaucoup plus rapidement. Pour cela, des gamètes mâles (microspores) ou femelles (sac

embryonnaire) sont récupérés sur les F_1 et sont régénérés par culture *in vitro* (Forster and Thomas 2005). La plante obtenue est haploïde et le passage au stade diploïde nécessite souvent un traitement à base de colchicine (Barnabás et al. 1999). Les plants obtenus sont directement fixés, ce qui réduit le temps d'obtention des populations par rapport aux RILs (He et al. 2001).

Une fois la population choisie, celle-ci doit être génotypée avec les marqueurs. Pour être cartographiés dans la population, les marqueurs doivent être différenciables d'un parent à l'autre (marqueurs polymorphes). Selon le type de codage obtenu possible sur les individus, les marqueurs sont classés en deux grandes groupes : les marqueurs dominants (les hétérozygotes ne sont pas différenciables d'une des deux classes d'homozygotes) et les marqueurs co-dominants (les trois classes de génotypes sont clairement différenciables) (Collard et al. 2005). Ces marqueurs vont donc ségréger dans les différents types de populations et sont attendus selon les lois mendéliennes dans les proportions décrites dans le Tableau 3.

Tableau 3: Ratio de ségrégation pour les marqueurs dominants et co-dominants dans les quatre principaux types de populations. D'après Collard et al. (2005).

Type de population	Marqueurs co-dominants	Marqueurs dominants
F_2 ou BC_1F_2	1 : 2 : 1 (AA : Aa : aa)*	3 : 1 (AA/Aa : aa)
RIL ou DH	1 : 1 (AA : aa)	1 : 1 (AA : aa)

* AA= homozygote marqueur dominant ; aa= homozygote marqueur récessif ; A/a= hétérozygote.

Lorsqu'un marqueur ne ségrège pas selon les proportions attendues, le marqueur est dit distordu. La significativité de cette distorsion est généralement vérifiée par un test de khi-deux de Pearson. Les marqueurs fortement distordus sont souvent éliminés car ils peuvent représenter des erreurs de génotypage. Les marqueurs sélectionnés vont ensuite être utilisés pour construire la carte génétique. La construction d'une carte génétique repose sur la présence d'évènements de recombinaison (crossing-over) lors de la méiose. La présence de crossing-over lors de la méiose génère des haplotypes recombinants (le chromosome est un mélange de fragments des deux parents). Plus les marqueurs sont distants sur le chromosome, plus la fréquence de crossing-over est importante (Collard et al. 2005). Sur la Figure 15, les marqueurs les plus distants (A et B) ont des taux de recombinaison (fréquence de crossing-over) plus élevés que les marqueurs plus proches (A et C). On aura donc une proportion

élevée d'individus recombinants dans la population. Les marqueurs sur le même chromosome sont dits liés et présentent un taux de recombinaison inférieur à 50 %. Par contre, les marqueurs qui ne sont pas sur le même chromosome s'associent indépendamment les uns des autres et présentent des taux de recombinaison proches des 50 %.

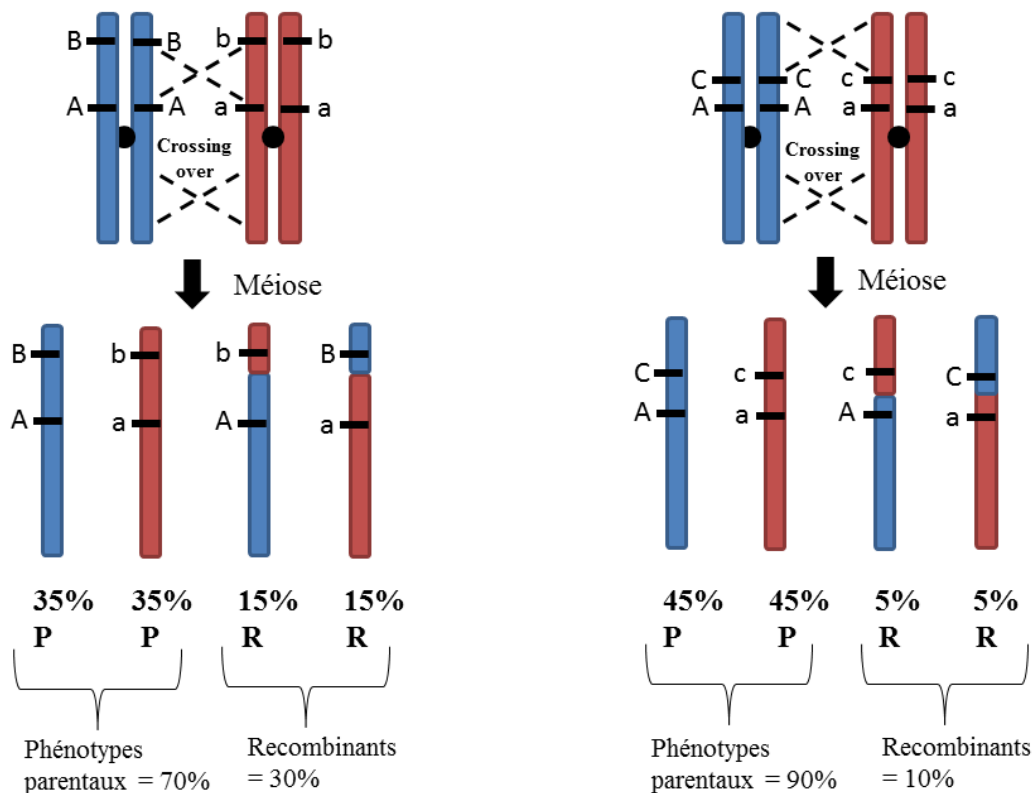


Figure 15: Conséquences de la méiose et du taux de crossing-over sur la proportion d'individus recombinants dans la population. D'après Collard et al. (2005).

Ces taux de recombinaison sont ensuite convertis en distances génétiques à partir de fonctions mathématiques dont les plus connues sont les fonctions de Haldane (Haldane 1919) et de Kosambi (Kosambi 1943). La fonction de Haldane prend en compte le fait que les événements de crossing-over sur un chromosome sont indépendants les uns des autres, alors que la fonction de Kosambi prend en compte le fait qu'il y a interférence entre les événements de crossing-over (la réalisation d'un crossing-over sur un chromosome réduit la probabilité d'un second crossing-over à proximité de celui-ci). Les distances génétiques sont exprimées en centimorgan (cM). Le calcul des taux de recombinaison (r) entre les marqueurs va permettre la construction de la carte génétique. Cette construction se fait en deux grandes étapes : (i) les marqueurs liés (r faible) sont rassemblés en groupes de liaison et (ii) les

marqueurs sont ordonnés les uns par rapport aux autres pour chaque groupe de liaison. Divers logiciels sont disponibles pour la construction de cartes génétiques comme par exemple MapMaker (Lander et al. 1987) et JoinMap (Van Ooijen 2006). En parallèle de la construction de la carte génétique, la population doit être phénotypée pour le caractère d'intérêt étudié. Une fois la population phénotypée et la carte génétique construite, l'analyse de QTLs par cartographie d'intervalle est réalisée selon différentes méthodes dont les plus utilisées sont présentées dans le Tableau 4. La méthode de « Simple Interval Mapping (SIM) » consiste à calculer entre chaque couple de marqueur une probabilité de présence d'un QTL. Cette probabilité est estimée par le logarithm of odds (LOD) : $LOD = \log_{10} \frac{L_o}{L_A}$ où L_o représente la probabilité d'une absence de QTL et L_A représente la probabilité de présence d'un QTL. Comme le LOD est calculé entre chaque paire de marqueur, cela permet de tracer une courbe du LOD le long d'un chromosome (Figure 16). Une valeur seuil généralement calculée par un test de permutation permet de définir la présence d'un QTL (Doerge and Churchill 1996). La position du QTL correspond au LOD maximum et un intervalle de confiance du QTL est alors calculé. La méthode de « Composite Interval Mapping » (CIM) emploie le même type d'analyse en y ajoutant des cofacteurs (généralement des marqueurs liés à des QTLs putatifs) dans le modèle d'analyse, permettant ainsi (i) d'améliorer la précision de la cartographie des QTLs et (ii) d'améliorer la puissance de détection d'un QTL en réduisant la part de la variance résiduelle créée par les autres. Cette méthode est donc considérée comme plus puissante que la SIM. La méthode de « Multiple Interval Mapping » (MIM) permet de détecter des QTLs sur plusieurs intervalles à la fois. Elle permet également de mieux prendre en compte les effets d'épistasie entre les QTLs (interactions entre des QTLs). Enfin, des méthodes bayésiennes (« Bayesian Interval Mapping » ou BIM) existent et permettent d'améliorer la puissance et la précision de détection des QTLs en estimant le nombre de QTLs et leurs effets séparément. En fonction du pourcentage de variance expliqué par le QTL (R^2), celui-ci est décrit comme mineur ($R^2 < 10\%$) ou majeur ($R^2 > 10\%$) (Collard et al. 2005).

Tableau 4: Présentation des principales méthodes d'analyses de QTLs par cartographie d'intervalles. D'après Erickson et al. (2004)

Méthode	Fonctionnement	Référence
Simple Interval Mapping (SIM)	Localisation des QTLs dans les intervalles de marqueurs	(Lander and Botstein 1989)
Composite Interval Mapping (CIM)	Même fonctionnement que la SIM mais en ajoutant des marqueurs adjacents ou autres QTLs comme cofacteurs.	(Zeng 1994)
Multiple Interval Mapping (MIM)	Recherche simultanée de QTLs sur l'ensemble du génome. Plus puissant pour détecter les interactions épistatiques potentielles.	(Zeng et al. 1999)
Bayesian Interval Mapping (BIM)	Estime séparément la position et l'effet des QTLs.	(Satagopan 1995)

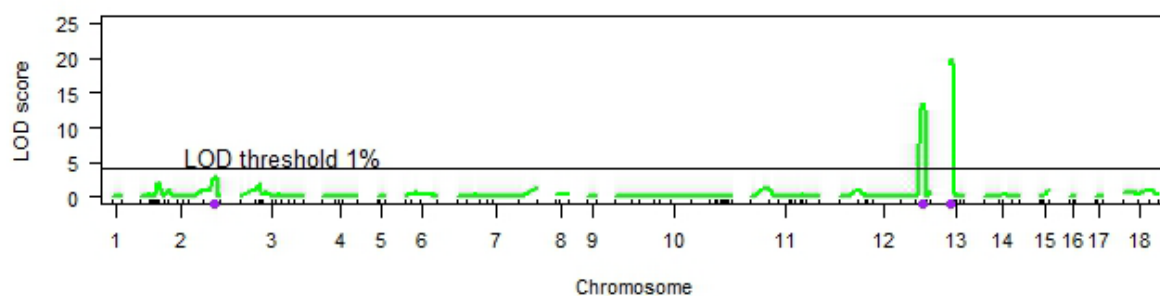


Figure 16: Exemple d'évolution du LOD score le long des chromosomes pour un caractère analysé donné. Un LOD threshold pour $\alpha = 0.01$ (erreur de type I), a été calculé pour déclarer le seuil de significativité des QTLs. Dans le cas présent, on observe un QTL sur le chromosome 12 et sur le chromosome 13.

Les analyses de QTLs dans les populations biparentales permettent généralement de localiser le trait d'intérêt dans un intervalle d'environ 10 à 30 cM (Salvi and Tuberosa 2005). Cet intervalle génétique correspond à une large portion chromosomique de plusieurs Mb et peut contenir un très grand nombre de gènes. Par exemple, un intervalle de 10 cM chez A.

Thaliana correspond à une portion chromosomique de 2,1 Mb qui comprend 440 gènes (Salvi and Tuberosa 2005). Afin de déterminer le gène ou les gènes responsables du trait d'intérêt, une cartographie plus fine de la zone est donc nécessaire. La cartographie fine d'une zone suppose la présence d'évènements de recombinaison dans l'intervalle du QTL. Ceci nécessite généralement des populations d'effectif large (> 1000 individus) (Collard et al. 2005) ou des populations plus adaptées comme les NILs (Near isogenic lines) permettant de cibler les zones du génome qui nous intéressent. Des populations de NILs ont ainsi été utilisées pour cartographier finement trois QTLs de résistance à *Phytophthora infestans* (Brouwer and Clair 2004). L'étape suivante consiste à assembler des clones chevauchants (contig) couvrant la zone d'intérêt (Figure 17). Cet assemblage va permettre de définir une zone physique de l'intervalle génétique afin d'y identifier des gènes. Parmi les gènes présents dans la région, on va identifier des gènes présentant des allèles différents entre les individus qui divergent pour le caractère étudié. Enfin, ces gènes candidats devront être validés par des techniques de génétique fonctionnelle comme la modification d'expression des gènes, la génération de mutations ciblées ou encore la transgénèse (Salvi and Tuberosa 2005).

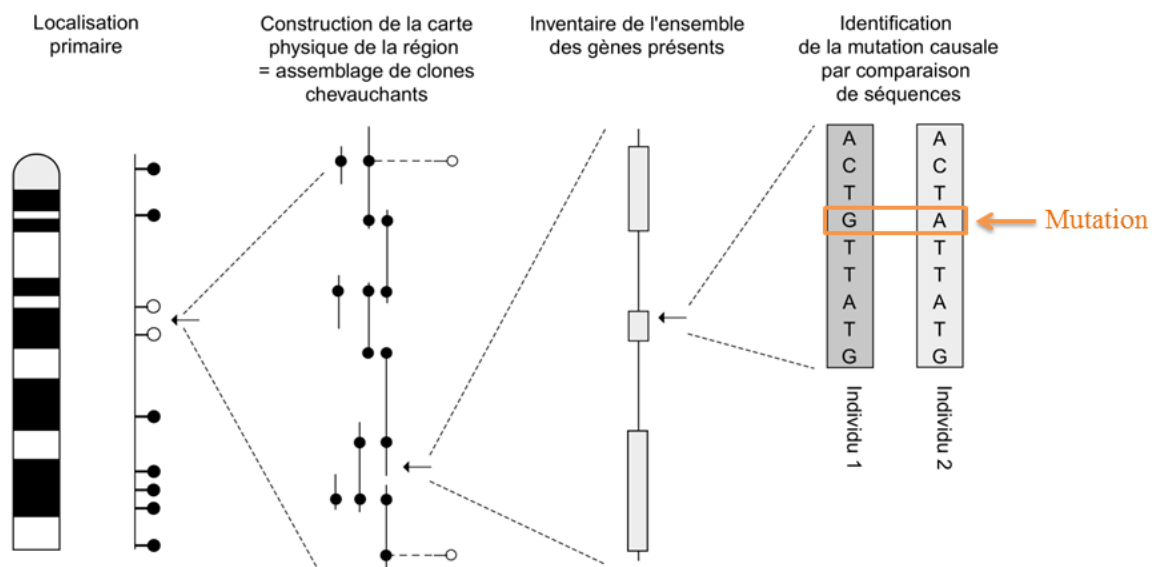


Figure 17: Description des principales étapes du clonage positionnel. (Bernot and Périlleux 2000; Eggen 2003)

1.3.2.2 L'ère des nouvelles technologies de séquençage

Les travaux de cartographie génétique sont longs et laborieux. De plus, les cartes génétiques utilisées ont généralement une densité faible et ne sont pas ancrées sur un génome connu. Les marqueurs les plus souvent utilisés, les marqueurs AFLP et RFLP sont difficilement utilisables pour la SAM, limitant ainsi le transfert des QDRs et gènes R dans les variétés d'intérêt agronomique. Les marqueurs SSR (simple sequence repeat) hautement reproductibles et simples d'utilisation sont facilement utilisables en SAM. Cependant le développement de cartes génétiques denses avec ce type de marqueurs peut être coûteux et long, particulièrement chez les espèces peu étudiées (Collard and Mackill 2008). Ce paragraphe a pour but de présenter quelques approches exploitant les NGS qui représentent des atouts majeurs pour cartographier ou identifier rapidement des facteurs de résistance. Je présenterai plus en détail l'approche de Genotyping-by-sequencing (GBS) qui est utilisée dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse.

La construction de cartes génétiques denses repose sur la génération rapide de nombreux marqueurs génétiques polymorphes. Les marqueurs SNPs (single nucleotide polymorphism) sont des paires de bases du génome qui présentent des allèles différents. Si, en principe les SNPs peuvent présenter 4 allèles différents, les SNPs sont plus fréquemment bi-alléliques. Les SNPs représentent 90% des variations génétiques chez l'espèce humaine (Brookes 1999) et sont donc une source très intéressante de marqueurs génétiques. En raison de leur fréquence élevée dans les génomes, les SNPs sont des marqueurs de choix pour la construction de carte génétique dense (Ganal et al. 2009).

La plupart des SNPs sont générés par des méthodes visant à séquencer une sous-partie du génome dans des populations diverses, soit par séquençage du transcriptome, soit par séquençage d'une partie réduite du génome (Wang et al. 2014). Le séquençage d'une partie réduite du génome se base sur la construction de bibliothèques réduites de séquences (RRL). Parmi les techniques basées sur la construction de RRL, le RAD-seq (Restriction site Associated genomic DNA) et le GBS (Genotyping-by-sequencing) sont les plus couramment utilisées (Berthouly-Salazar et al. 2016). La technique RAD-seq repose sur la construction de RRL par digestion enzymatique puis sur le multiplexage de différents individus d'une population grâce à de petites séquences uniques (barcodes) permettant d'identifier chaque individu (Baird et al. 2008). Grâce à ces barcodes, différents individus peuvent ainsi être

analysés dans une même ligne de séquençage, réduisant ainsi le coût du génotypage. La méthode de Genotyping-by-Sequencing (GBS) se base aussi sur la construction de RRL et le multiplexage de nombreux individus grâce aux barcodes (Elshire et al. 2011). Comparée à la méthode RAD, le GBS est moins compliqué (pas d'étape de sélection de taille des fragments, moins d'étape de digestion enzymatique et de purification) et son coût est encore diminué (Elshire et al. 2011; He et al. 2014).

Les différentes étapes de la méthode GBS sont décrites dans la Figure 18. Dans la première étape, les échantillons sont digérés avec une enzyme de restriction (ApeKI par exemple). Les fragments générés sont de tailles très diverses. Comme seules les parties des fragments autour des sites de restriction sont séquencées, les librairies GBS représentent une partie réduite du génome de la plante (RRL). Les fragments d'ADN des librairies GBS présentent à chaque extrémité le site de coupure de l'enzyme (sticky end sur la figure). Dans l'étape 2, une séquence de quelques nucléotides (barcode) va être attachée d'un côté du fragment d'ADN. Chaque individu possède un barcode unique. Les amorces universelles « illumina » vont aussi être accrochées à cette étape. Dans la troisième étape, les individus vont être multiplexés (48, 96 ou 384 individus peuvent être multiplexés ensemble). Les ADN multiplexés sont amplifiés par PCR (polymorphism chain reaction) et sont ensuite séquencés grâce à la technologie Illumina. Lors de l'étape 4, les données de séquence vont être soumises à des contrôles qualité, puis les fragments séquencés vont être séparés en fonction de leur barcode (étape de démultiplexage). Une fois les séquences nettoyées et attribuées à chaque individu, celles-ci sont assemblées soit en alignant ces séquences sur un génome de référence (méthode d'assemblage guidé) soit directement sans référence (méthode d'assemblage *de novo*). Un catalogue de locus (séquences assemblées) répertoriant les allèles présents dans l'ensemble ou un sous-ensemble de la population est ensuite créé. Les séquences des individus sont finalement comparées à ce catalogue et l'appel de variant est effectué. Les logiciels couramment utilisés pour l'analyse bio-informatique de données GBS avec ou sans génome de référence sont Tassel (Glaubitz et al. 2014) et Stacks (Catchen et al. 2011). Cette liste est non exhaustive et un certain nombre de laboratoire utilise également des suites personnalisées de programmes. Les SNPs générés sont filtrés en fonction de différents critères (e.g. pourcentage maximal de génotypes manquants, pourcentage minimal de l'allèle le moins fréquent et pourcentage d'hétérozygotie).

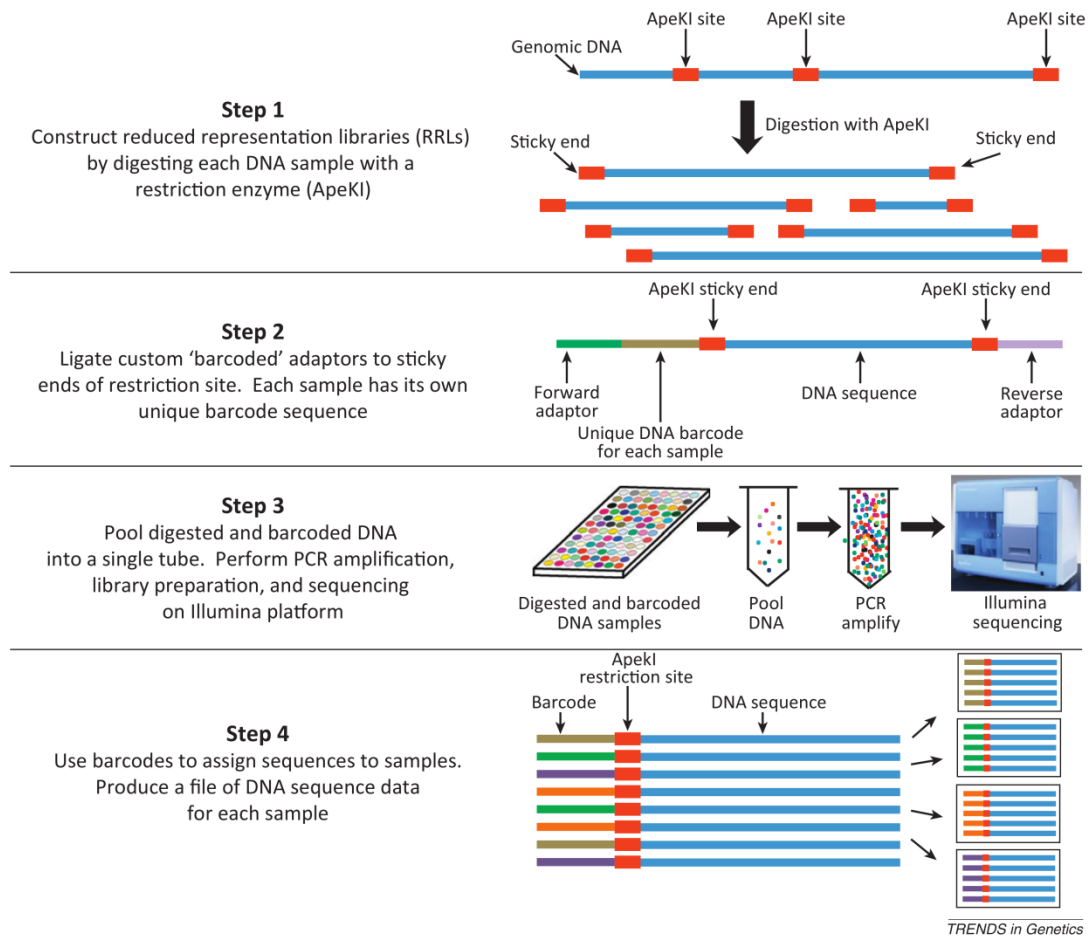


Figure 18: Illustration de la technique de Genotyping-By-Sequencing (Myles 2013).

Les données de génotypage triées peuvent ensuite être utilisées pour (i) la construction de cartes génétiques et la cartographie génétique de traits d'intérêt, ou pour (ii) réaliser des études de génétique d'association. Ces dernières années, l'approche GBS a été utilisée avec succès pour déterminer la position précise de QTLs ou gènes de résistance. Par exemple, un QTL de résistance au champignon *Venturia inaequalis* a été localisé précisément chez le pommier grâce à la construction d'une carte dense avec des SNPs issus de l'approche GBS. Une cartographie fine avec des marqueurs SNPs sélectionnés a permis l'identification de neuf gènes candidat de type NBS-LRR (Bastiaanse et al. 2016). De même, la construction d'une carte génétique dense à partir de GBS-SNPs a permis de localiser dans un intervalle de 1,2 Mb un QTL de résistance majeur à *Fusarium oxysporum* chez la pastèque (Branham et al. 2017). Ces deux exemples illustrent bien l'utilité des NGS dans l'identification des QTLs et gènes de résistance. Néanmoins, ces facteurs de résistance, qu'ils soient caractérisés ou non, doivent être utilisés judicieusement afin d'éviter le contournement rapide de la résistance,

notamment lorsqu'il s'agit d'un pathogène au pouvoir évolutif élevé. Des stratégies pour améliorer la durabilité des résistances existent et sont présentées dans le paragraphe suivant.

1.3.2.3 Vers une gestion durable des résistances variétales

Le clonage d'un gène R demande du temps et des travaux de recherche laborieux. Lorsqu'un gène de résistance majeur est déterminé, il est généralement déployé largement dans les cultivars commerciaux à de larges échelles (« the boom »). Cependant la forte pression de sélection exercée par ce gène sur le pathogène peut engendrer l'émergence d'une sous-population virulente à partir de mutants déjà présents dans la population initiale ou introduits (« the bust »). Le cultivar peut donc passer d'un phénotype hautement résistant à hautement sensible à plus ou moins long terme. Les QDR ont longtemps été considérées comme plus durables. Cependant des cas d'érosion de la résistance où le cultivar devient de plus en plus sensible au fil des cycles de cultures ont déjà été observés. La rapidité du contournement de la résistance dépend à la fois des mécanismes de résistance de la plante mais aussi de la biologie du pathogène. D'après McDonald and Linde (2002), le potentiel évolutif d'un pathogène dépendrait de cinq forces :

- Le taux de mutation

La mutation est la principale source de variation génétique et permet la formation de nouveaux allèles dans une population. L'acquisition de nouveaux allèles peut entraîner le contournement d'un gène majeur lorsque cette mutation s'effectue sur un effecteur Avr du pathogène. Les mutations peuvent aussi apporter un gain de pathogénicité à certaines souches et ainsi participer à l'érosion de la QDR. Le taux de mutation est assez faible dans les populations pathogènes et dépend du type de pathogène et de la taille de ses populations.

- La taille de population et la dérive génétique

La taille de la population affecte doublement la diversité génétique du pathogène. D'une part, la probabilité d'apparition d'un mutant est plus élevée dans une grande population, d'autre part les petites populations sont soumises à la dérive génétique et ont un risque élevé de perdre les allèles nouvellement formés. Ainsi, les populations soumises à des fluctuations d'effectifs importantes (par exemple lors d'une rotation de culture ou lorsque les conditions environnementales réduisent drastiquement la population pathogène), présentent des risques faibles d'apparition et de sélection de variants virulents.

- Les flux de gènes et de génotypes

Des populations géographiquement éloignées peuvent s'échanger des gènes ou des génotypes de manière naturelle ou par des actions anthropiques. Les pathogènes qui présentent des flux de gènes/génotypes importants sont censés avoir une diversité génétique plus importante et présentent un risque élevé de contournement des résistances.

- Le système de reproduction

La reproduction des pathogènes peut se faire de manière sexuée, asexuée ou par des stades mixtes de reproduction sexuée et asexuée. Les pathogènes qui auraient un modèle de reproduction mixte serait les plus dangereux pour le contournement des résistances. Pendant le cycle sexué, de nouvelles combinaisons d'allèles sont créées par la recombinaison. Les génotypes recombinés les mieux adaptés à un environnement sont ensuite sélectionnés et multipliés clonalement. Ces génotypes recombinants et bien adaptés sont donc produits en grand nombre et peuvent provoquer des épidémies.

- La sélection imposée par la plante-hôte

Lorsqu'un seul gène R est déployé dans un cultivar il exerce une sélection sur la population du pathogène qui va entraîner une augmentation rapide de la fréquence des variants non reconnus par le gène. Ce type de sélection est dit directionnel, car à terme, la population de départ va être entièrement remplacée par cette sous-population de mutants virulents. Afin d'éviter cette sélection directionnelle, des stratégies de déploiement des gènes de type R ont été proposées. Ces stratégies reposent sur la présence de plusieurs gènes de type R contrôlant un même pathogène (carré orange, rond vert, étoile jaune et losange rouge dans la Figure 19).

L'approche traditionnelle qui a largement été utilisée jusqu'à présent et qui a généré des cycles de « boom and bust » est présentée dans la Figure 19a. Un gène est déployé puis une fois contourné il est remplacé par un second gène qui une fois contourné sera à son tour remplacé par un troisième et ainsi de suite. Une autre stratégie consiste à pyramider dans le même cultivar, plusieurs gènes R à la fois (Figure 19b). Pour contourner la résistance, le pathogène devra donc accumuler des mutations sur tous les effecteurs Avr, ce qui ralentit fortement l'apparition de mutants virulents.

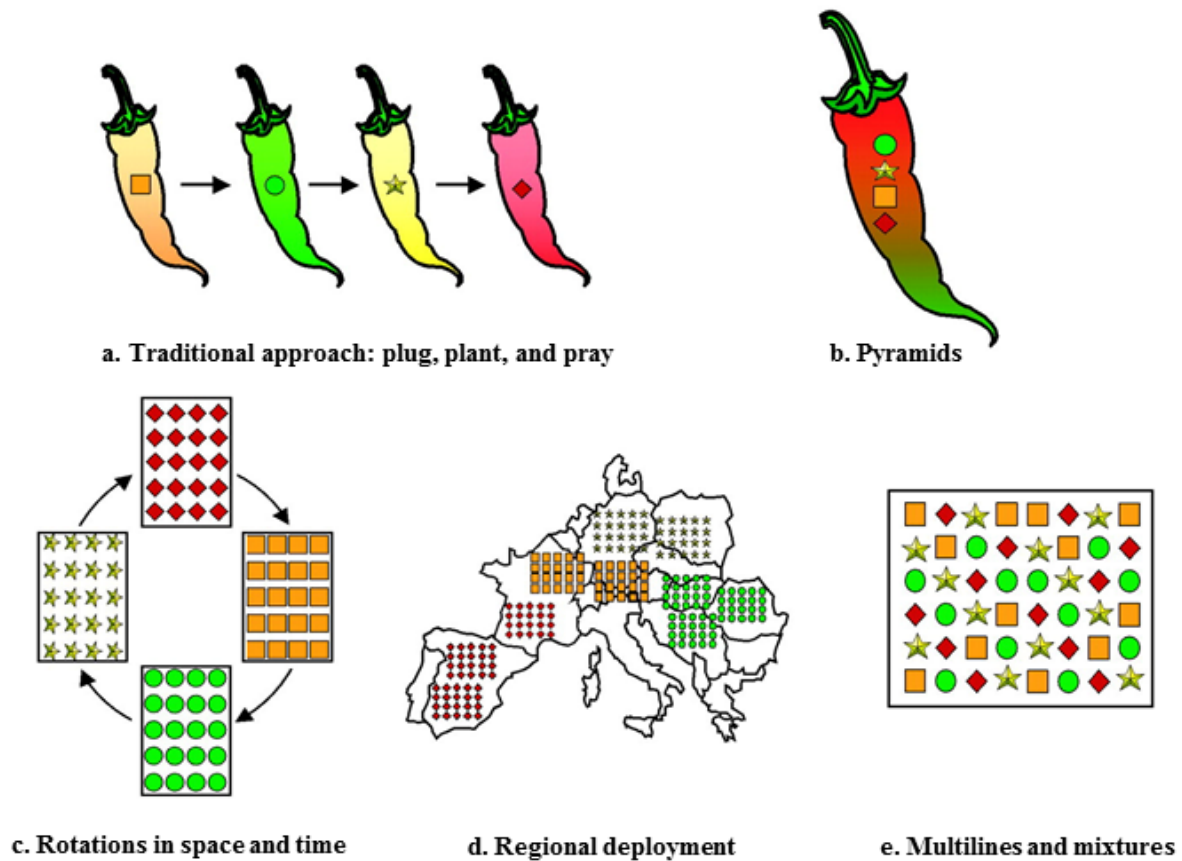


Figure 19: Stratégie de déploiement de gènes de résistance (d'après McDonald and Linde 2002).

Une autre stratégie consiste à éviter la sélection directionnelle en faisant de la sélection disruptive. La sélection disruptive peut être obtenue en faisant des rotations de gènes R (Figure 19c), en déployant les gènes R au niveau régional (Figure 19d) ou en mélangeant dans un même champ des gènes R (Figure 19e). Ceci permet d'éviter qu'un mutant particulier augmente en fréquence dans une population en raison de la sélection par un seul gène R. En fonction des caractéristiques évolutives d'un pathogène, certaines stratégies vont être préférables à d'autres. Un diagramme de décision permet d'aider dans ces choix (Figure 20). Par exemple, dans le cas des souches du RSSC, ce diagramme montre qu'une approche gène R unique pourrait être utilisée pour les souches du phylotype IIB qui présentent un taux de mutation peu élevé, qui ont un mode de reproduction clonal et qui sont en faible expansion démographique. Par contre, l'utilisation de gènes R à l'échelle régionale ou l'utilisation de QDR seraient mieux adaptée pour les autres phylotypes et particulièrement pour le phylotype I qui présente un taux de mutation élevé, qui est très recombino-gène et en forte expansion démographique.

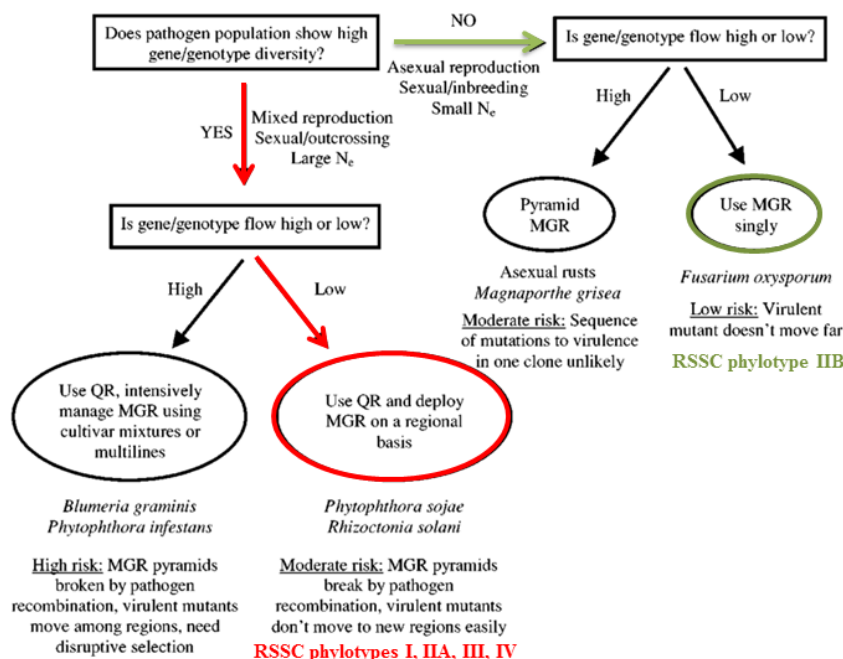


Figure 20: Présentation d'un diagramme simplifié d'aide à la décision dans le choix des stratégies d'amélioration variétale et de déploiement de résistances. Ce schéma nécessite d'avoir localisé des gènes majeurs de résistance (MGR) et des QTLs de résistance (QR) dans l'espèce végétale considérée. D'après (McDonald and Linde 2002).

Enfin, la dernière stratégie proposée pour contrôler durablement un pathogène est la combinaison de QDR avec un gène R. L'efficacité de cette stratégie a récemment été démontrée sur le pathosystème *Leptosphaeria maculans/Brassica napus* (Brun et al. 2010). Dans cette étude, l'introduction du gène R *Rlm6* dans la variété « Darmor-MX » qui contient un QDR, induit un contrôle efficace du pathogène au moins durant cinq ans de culture alors que l'introduction de ce même gène dans la variété « EuroIMX » qui ne contient pas de QDR, est contourné au bout de deux ans de culture. Cette stratégie s'est également avérée efficace pour le pathosystème *Meloidogynes spp./Capsicum annum*. En effet, les gènes *Me1* et *Me3* introduits dans le cultivar sensible « Doux Long des Landes » confèrent un niveau de résistance moins élevé que lorsqu'ils sont introduits dans le cultivar partialement résistant « Yolo Wonder » (Barbary et al. 2014). Plus récemment, une autre étude a démontré que ce niveau de résistance plus élevé dans le fond partialement résistant était en fait dû à la présence de plusieurs QDR (Barbary et al. 2016). La combinaison des QDR avec les gènes R permettrait de maintenir à un faible effectif la population du pathogène. Ainsi, la probabilité d'apparition d'un mutant virulent serait a priori plus faible et ce type de résistance potentiellement plus durable.

Dans le pathosystème *Capsicum annum*/virus la durabilité du gène R *pvr2*³ est également modulée par quatre QTLs. Parmi ces quatre QTLs, trois sont impliqués dans la résistance quantitative (Quenouille et al. 2014). Ces résultats montrent bien l'intérêt de combiner dans une même variété un gène majeur R et des QDR. Cette stratégie est par ailleurs très utile lorsqu'on dispose d'un nombre limité de gènes R dans un pathosystème donné et qu'il est donc nécessaire d'en préserver la durabilité. La disponibilité de gènes R pour contrôler les bactéries vasculaires comme le RSSC est particulièrement réduite (Bae et al. 2015). Dans la dernière partie de cette introduction, je ferai un bilan des QDR et gènes R détectés à ce jour pour contrôler le BW.

1.3.3 Cartographie génétique de la résistance au flétrissement bactérien : bilan des travaux réalisés à ce jour

1.3.3.1 QTLs et gènes de résistance au flétrissement bactérien chez les espèces modèles

Le premier gène de résistance au BW a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* dans l'accension Nd-1 (Deslandes et al. 2002). Ce gène, nommé *RRS1*, confère un fort niveau de résistance à un large spectre de souches (Deslandes et al., 1998). Sa structure est de type TNL avec un motif WRKY atypique, et il interagit spécifiquement avec l'effecteur ET3 *PopP2* (Deslandes et al. 2003) et le facteur RD19 (Bernoux et al., 2008). La résistance d'*Arabidopsis* repose spécifiquement sur l'interaction physique *RRS1-popP2* dans le noyau et sur l'activité acétyl-transférase de *popP2* (Tasset et al., 2010). Plus récemment, il a été démontré que *RRS1* fonctionnait conjointement avec *RPS4* (resistance to *Pseudomonas syringae*) un second gène de résistance de la classe des TNL (Sohn et al. 2014). Les protéines codées par ces deux gènes reconnaissent les effecteurs AvrRps4 du pathogène *Pseudomonas syringae* et PopP2 du RSSC. Dans une autre accession, kil-o, l'interaction *RRS1-PopP2* entraîne un haut niveau de tolérance dans la plante (Van der Linden et al. 2013). Ces résultats montrent qu'un même gène de résistance peut à la fois contribuer à des mécanismes de résistance et de tolérance.

Un autre type de gène, *ERECTA*, a été mis en évidence chez *A. thaliana*. Ce gène connu pour affecter le développement des organes aériens de la plante, joue également un rôle dans la résistance au RSSC (Godiard et al. 2003).

Enfin, le gène *WAT1* (Walls Are Thin) est impliqué dans une résistance à large spectre permettant de réduire l'incidence de maladies dues à des pathogènes vasculaires, dont le RSSC (Denancé et al. 2013).

Chez *Medicago truncatula* l'étude de lignées recombinantes, issues du croisement Jemalong A17 (S) x F83005.5 (R), a révélé la présence de trois QTLs impliqués dans la résistance à la souche GMI1000. Un QTL majeur appelé *MtQRRS1* a été identifié sur le chromosome 5 et expliquerait jusqu'à 38,5% de la variance phénotypique. Deux autres QTLs ont été détectés sur les chromosomes 3 et 7, expliquant respectivement 13,1% et 17,6% de la variance phénotypique (Vailleau et al. 2007). Par ailleurs, la résistance de la lignée F83005.5 a été évaluée vis-à-vis de 48 mutants de GMI1000 dont les séquences géniques d'effecteurs ET3 ont été mutées. Aucun des mutants étudiés n'a permis de mettre en évidence du flétrissement sur F83005.5. Quelques années plus tard, une étude sur des RILs issues du croisement A17 x DZA315.16 (parent résistant différent de F83005.5) a permis de mettre en évidence la présence d'un QTL majeur sur le chromosome 5 colocalisant avec *MtQRRS1* (Ben et al. 2013). Dans la même étude, la cartographie fine du locus *MtQRRS1* a été réalisée grâce à des lignées quasi-isogéniques (NIL) sélectionnées à partir de RILs issues du croisement A17 x F83005.5. Ce travail a permis de positionner de manière plus précise *MtQRRS1* dans un intervalle de 0,6 cM et d'identifier 15 gènes candidats au niveau de ce locus. Parmi ces 15 gènes, 7 gènes putatifs de résistance ont été identifiés. Les domaines qu'ils contiennent (NBS-ARC/LRR/TIR) sont caractéristiques des gènes associés à la résistance aux pathogènes chez les plantes (gènes RGA).

1.3.3.2 QTLs et gènes de résistance au flétrissement bactérien chez les Solanacées

Tomate

De nombreux QTLs de résistance ont aussi été identifiés chez les Solanacées. Chez la tomate, les résultats publiés suggèrent que la résistance est polygénique et de type quantitatif. Les différentes études réalisées sur des populations issues du croisement Hawaii 7996 (R) x WVa 700 (S) et L285 (R) x C286 (S) ont montré l'existence de QTLs sur les chromosomes (chr) 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 11 et 12 (Tableau 5). Ces QTLs ont été nommés *Bwr* pour « bacterial wilt résistance » suivi du numéro de chromosome. Parmi eux, *Bwr-6* est un QTL à effet majeur qui présente un large spectre de résistance. Sa position fluctue largement sur le chr 6, suggérant la présence de plusieurs QTLs dans cette zone qui agiraient à des stades spécifiques de l'infection (Mangin et al. 1999). Il est détecté dans deux fonds génétiques différents et participe à la diminution de l'incidence de la maladie vis-à-vis de 9 souches du RSSC qui appartiennent à la fois au phylotype I et II. Le deuxième QTL à effet majeur est *Bwr-12*. Ce

QTL est détecté uniquement avec des souches du phylotype I suggérant la présence d'un modèle de résistance phylotype-spécifique. *Bwr-6* et *Bwr-12* ont été cartographiés finement dans des intervalles physiques assez restreints (Wang et al. 2013). Les autres QTLs détectés sont mineurs et leur expression dépendante des conditions environnementales. Ces études ayant été réalisées sur des cartes génétiques peu denses et comprenant peu de marqueurs ancrés sur la carte physique, l'estimation de leur position sur le génome de la tomate est très difficile.

Tableau 5: Bilan des QTLs de résistance au flétrissement bactérien détectés chez la tomate et estimation de leur position physique.

Nom ^a	cultivar ^b	Position ^c	Souches ^d	Références ^e
<i>Bwr-2</i>	WVa 700	T2 (Nd ^f)	PSS4	5
<i>Bwr-3</i>	Hawaii 7996	T3 (61.2-70.8)	GMI8217, JT516, Tm151	3, 6, 7
<i>Bwr-4a</i>	Hawaii 7996	T4 (Bas chr)	GMI8217, JT516	2, 3, 6
<i>Bwr-4b</i>	Hawaii 7996	T4 (Haut chr)	GMI8217	2, 3
<i>Bwr-6</i>	Hawaii 7996, L285	T6 (36.9-38.8)	PSS4, PSS186, JT519, UW364, JT516, GMI8217, TC, CM, PW	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>Bwr-7</i>	C286	T7 (0.2-60.3)	UW364	1
<i>Bwr-8</i>	Hawaii 7996	T8 (Nd)	PSS4, JT516, GMI8217	3, 5, 6
<i>Bwr-10</i>	L285	T10 (1.0-59.9)	UW364	1, 3
<i>Bwr-11</i>	Hawaii 7996	T11 (Nd)	GMI8217	2, 3
<i>Bwr-12</i>	Hawaii 7996	T12 (2.8-3.3)	PSS4, JT519, PSS186, TC, Tm151, CM, PW	5, 6, 7

^a Nom du QTL (Bwr pour bacterial wilt resistance suivi du numéro de chromosome sur lequel il a été détecté)

^b Cultivar apportant l'allèle résistant du QTL

^c chromosome de la tomate de T1 à T12, suivi de la position estimée en Mbp sur la version SL2.50 du génome écrit entre parenthèses.

^d Souches du RSSC avec lesquelles le QTL a été détecté. PSS4, PSS186, TC, Tm151, CM, PW, JT519 et UW364 sont des souches du phylotype I alors que GMI8217 et JT516 sont des souches du phylotype II.

^e Ces travaux correspondent à : 1 (Danesh et al. 1993) ; 2 (Thoquet et al. 1996a) ; 3 (Thoquet et al. 1996b) ; 4 (Mangin et al. 1999) ; 5 (Wang et al. 2000) ; 6 (Carmeille et al. 2006) ; 7 (Wang et al. 2013).

^f Non déterminé

Piment/poivron

Des travaux de cartographie de la résistance au BW chez le piment ont été conduits durant les travaux de doctorat de Mahbou-Somo-Toukam (2010). Deux populations ont été utilisées lors de ces travaux. La première population issue du croisement Yolo Wonder (S) × PM687 (R) et comprenant 93 lignées DH a été génotypée et phénotypée vis-à-vis de deux souches du RSSC, l'une du phylotype I (CMR134) et l'autre du phylotype II. La résistance dans cette population s'est avérée polygénique, avec de nombreux QTLs mineurs détectés ayant des effets à la fois additifs et épistatiques. Les QTLs détectés sur les chr P4, P6, P9, P10 et P11 pourraient être respectivement synténiques des QTLs *Bwr-4*, *Bwr-6*, *Bwr-12*, *Bwr-10* et *Bwr-11* de la tomate. Les QTLs sur les chr P2, P10 et P11 affichaient eux un spectre d'action plus large, car détectés avec les souches des deux phylotypes. Par contre, les QTLs sur les chr P6 et P9 ont été détectés seulement avec la souche du phylotype II. La seconde population étudiée est issue du croisement CM334 (R) × Yolo Wonder (S) et comprenait 93 familles F₆ qui ont été phénotypées vis-à-vis d'une souche de phylotype I (CMR134). Cette étude a permis la détection de six QTLs avec des interactions digéniques entre certains d'entre-eux. Les principaux QTLs situés sur P4 et P9 pourraient être synténiques de *Bwr-4a* et *Bwr-12* chez la tomate. Cette étude suggère également que ces QTLs permettent de restreindre la multiplication bactérienne à l'intérieur des tissus de la tige. Dans une étude plus ancienne, Grimault and Prior (1993), avaient pourtant montré que la variété résistante Narval ne présentait pas de réduction de la colonisation bactérienne et suggéraient plutôt la présence de mécanismes de tolérance chez le piment. Toutes ces études suggèrent que les mécanismes de contrôle du BW chez le piment sont probablement divers et associés soit à de la résistance, soit à de la tolérance. Dans une autre population issue du croisement LS2341 (R) × California Wonder (S) et phénotypée avec la souche KP9547 du phylotype I, un seul QTL majeur appelé *Bw1* expliquerait 33% de la variance phénotypique (Mimura et al. 2009). Initialement placé sur le chr P1, ce QTL serait en fait localisé sur le chr P8 (Mimura et al. 2012).

Tabac

Le tabac est, parmi les espèces de Solanacées, une de celles qui présentent un des plus hauts niveaux de résistance au BW. Des réactions de HR ont été observées sur plusieurs espèces de tabac dont *N. tabacum*, *N. benthamiana* et *N. glutinosa* (Poueymiro et al. 2009). Ces réactions de HR sont provoquées par la présence chez le pathogène des ET3 *avrA* et *popP1*. *AvrA* est reconnu à la fois chez *N. tabacum* et *N. benthamiana*, alors que *PopP1* semble être le principal éliciteur de la HR chez *N. glutinosa*. Des analyses de QTLs ont été conduites dans la

population F₃ issue du croisement Enshu (R) × TI448A (S) et la population F₄ issue du croisement Yanyan97 (R) × TI448A (S) (Qian et al. 2013). Les deux populations ont été phénotypées dans des champs infestés par des souches du phylotype I. Quatre QTLs ont été détectés : *qBWR-3a* ($R^2=9\%$), *qBWR-3b* ($R^2=19.7\%$), *qBWR-5a* ($R^2=17.3\%$) et *qBWR-5b* ($R^2=17.4\%$). Les résistances apportées par *qBWR-3a*, *qBWR-5a* sont issues de Enshu et les résistances apportées par *qBWR-3b*, *qBWR-5b* sont issues de Yanyan97. Le QTL *qBWR-3a* co-localise avec *qBWR-3b* et *qBWR-5a* co-localise avec *qBWR-5b*.

Bringellier marron

Une espèce proche de l'aubergine, *S. torvum*, présente de très hauts niveaux de résistance vis-à-vis de nombreuses souches du RSSC (Clain et al. 2004; Gousset et al. 2005). Récemment, une étude a montré que l'ET3 rip36 (plus récemment renommé RipAX2) induit une réaction de HR lorsqu'il est infiltré dans les feuilles du cultivar Torubamubiga (Nahar et al. 2014). Rip36 présente un motif « Zn-dependent protease » qui est essentiel dans l'interaction avec la plante. La souche bactérienne possédant une version mutée du gène *Rip36* sur ce motif n'est plus reconnue par la plante. Rip36 aurait pour fonction de couper une protéine particulière de *S. torvum*. Cette protéine ainsi fragmentée serait reconnue par un gène R de la plante déclenchant par la suite une HR. A ce jour, cette hypothèse n'a pas été confirmée et le gène R de la plante en interaction avec *Rip36* n'a pas encore été identifié.

Aubergine

Tout comme le tabac, l'aubergine possède de hauts niveaux de résistance au RSSC. Des travaux visant à caractériser une collection d'accessions de tomate, piment et aubergine de diverses origines (Core-TEP) a permis de mettre en évidence des interactions incompatibles (absence de symptômes et de colonisation) avec des souches du RSSC (Lebeau et al. 2010). Ces réactions d'incompatibilité sont fréquentes chez l'aubergine (Tableau 6). L'accession E6 (AG91-25) présente notamment un bon niveau de résistance vis-à-vis des souches du phylotype I. E6 est une accession issue d'un programme de sélection au BW mené aux Antilles dans les années 80-90 (Ano et al. 1991). Elle combine des facteurs de résistance au BW issus de l'accession MM134 (*S. aethiopicum* Aculeatum aussi nommé *S. integrifolium*) et de l'accession d'origine turque P18 (*S. melongena*). Un autre de ses géniteurs est la variété Aranguez résistante à l'anthracnose des fruits. A partir du croisement MM738 (S) × AG91-25 (R) une population de RILs (F₆) a été développée. Cette population a été phénotypée vis-à-vis

de quatre souches du phylotype I (GMI1000, PSS366, CMR134 et PSS4). Un facteur majeur de résistance, *ERs1*, a ainsi été détecté sur le LG2 (Figure 21).

Tableau 6: Résultats des niveaux d'interactions entre les accessions de tomate, aubergine et piment (Core-TEP) et une collection de souche du RSSC couvrant quatre phylotypes (Core-Rs2) d'après Lebeau et al. (2010).

		GMI1000 I-18	CMR134 I-13	CFBP3059 III-23	CFBP2957 IIA-36	CMR32 III-29	CMR39 IIA-41	PSS366 I-15	PSS358 I-15	PSS4 I-15	CMR15 III-29	CMR34 IIB-1	CFBP6783 IIB-4NPB
T O M A T O	T1	2	4	4	2	1	3.1	5	4	5	4	5	5
	T2	5	3.1	3.2	2	2	4	5	4	5	5	5	5
	T3	4	3.2	3.2	2	1	3.2	5	4	5	5	5	5
	T4	4	4	4	1	2	2	5	4	5	5	5	5
	T5	1	1	3.2	2	1	1	5	2	2	4	5	5
	T6	1	2	5	3.1	1	2	4	4	3.1	4	5	5
	T7	2	2	4	2	1	3.2	4	2	4	5	5	5
	T8	1	1	4	2	2	2	2	3.1	2	5	5	5
	T9	2	2	3.2	2	1	2	4	4	4	5	5	5
	T10	5	5	5	5	3.2	5	5	5	5	5	5	5
E G G P L A N T	E1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	4
	E2	1	1	2	1	1	1	4	2	4	3.1	3.2	1
	E3	2	1	2	1	1	1	4	4	2	2	2	4
	E4	1	1	1	1	1	2	1	1	2	4	2	2
	E5	2	3.1	2	1	1	2	4	4	4	4	3.2	2
	E6	3.1	2	4	2	1	1	1	2	5	5	5	4
	E7	3.2	4	5	1	1	3.1	4	4	5	4	3.1	3.1
	E8	5	4	5	4	3.1	4	4	5	5	5	5	4
	E9	3.2	2	1	1	1	1	2	2	2	4	1	4
	E10	4	5	5	2	4	4	4	5	5	5	5	5
P E P P E R	P1	3.2	4	4	2	2	2	3.2	1	4	2	3.2	5
	P2	3.2	3.2	4	2	4	3.2	2	1	4	3.2	3.2	4
	P3	3.2	5	5	1	1	2	2	1	4	3.2	3.2	5
	P4	3.2	2	4	1	1	4	2	1	1	4	3.2	5
	P5	3.2	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	4
	P6	2	3.2	3.2	1	2	1	1	1	1	1	2	4
	P7	3.2	3.1	3.2	1	1	2	1	1	2	1	2	5
	P8	3.2	2	3.2	1	1	1	2	1	2	1	3.2	5
	P9	3.2	2	3.2	1	2	1	1	1	1	1	2	5
	P10	4	5	5	2	2	2	3.2	1	4	3.2	3.2	5

Les numéros dans le tableau correspondent aux classes phénotypiques définies par une méthode de classification hiérarchique (Lebeau et al. 2010) : 1 = hautement résistant ; 2 = Modérément résistant ; 3.1 = partiellement résistant ; 3.2 = infection latente ; 4 = modérément sensible ; 5 = hautement sensible. Les noms des souches sont suivis de leur classification en phylotype-sequevar.

Ce facteur confère un très haut niveau de résistance vis-à-vis des souches GMI1000, PSS366 et CMR134. L'allèle de résistance est dominant (100% de la F₁ est résistante). Un QTL mineur de résistance a aussi été détecté vis-à-vis de ces trois souches et se situe sur le LG3. Par contre la souche PSS4 n'est pas contrôlée par *ERs1*. Trois QTLs sont détectés avec la méthode SIM vis-à-vis de cette souche. Deux QTLs (*QTL_{LG13a}* et *QTL_{LG13b}*) sont situés sur le LG13 et un QTL (*QTL_{LG2}*) est détecté sur le LG2. Par contre, avec la méthode CIM, seul le *QTL_{LG13a}* est détecté.

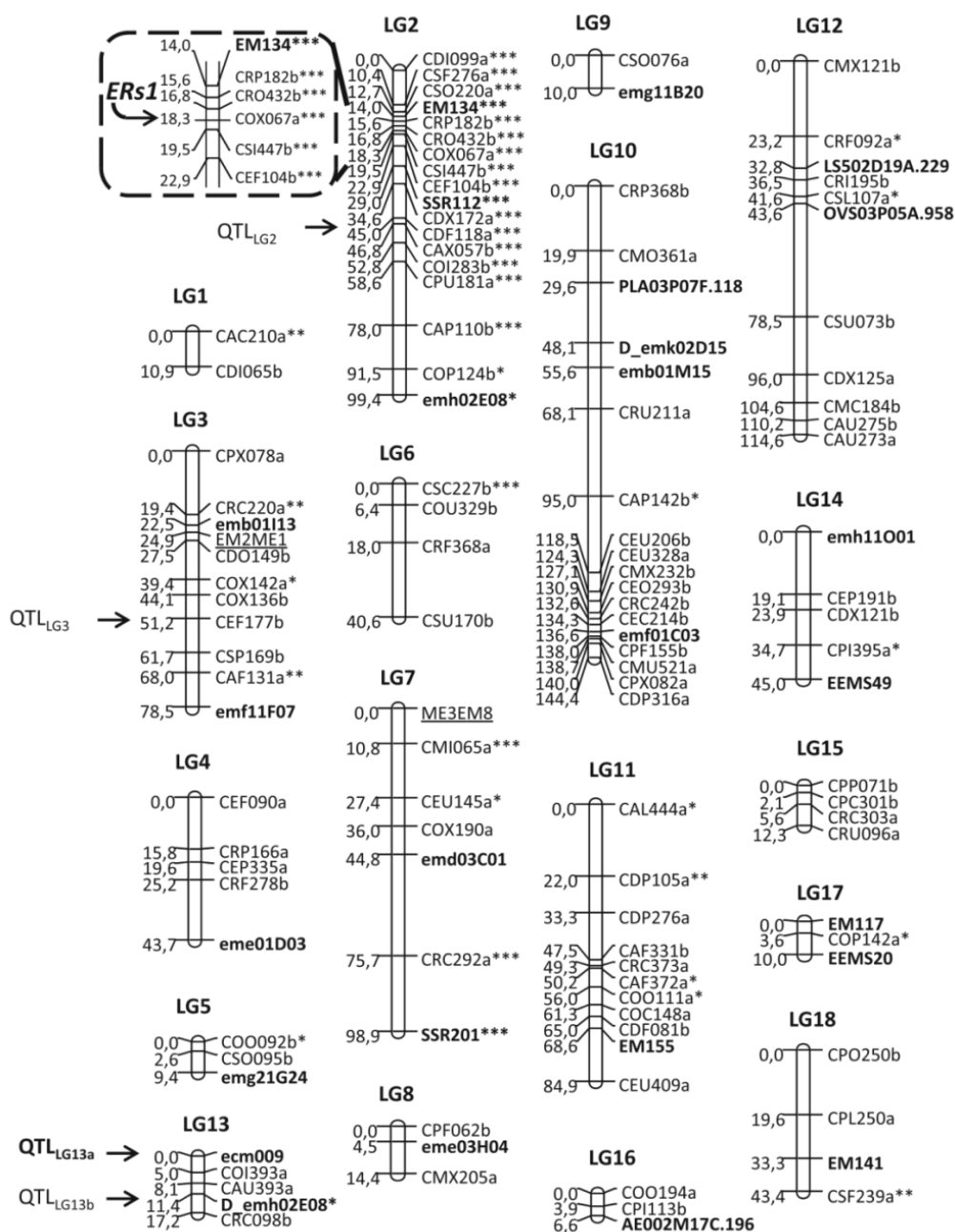


Figure 21: Cartographie génétique de la population de RILs issues du croisement MM738×AG91-25 (Lebeau et al. 2013). La présence d'un QTL est signalée par une flèche sur la gauche du groupe de liaison (LG).

Enfin des travaux menés sur l'accèsion d'aubergine E-31 ont permis le clonage du premier gène de résistance au BW chez les Solanacées. Ce gène appelé *RE-bw* code pour une protéine présentant 77.8% de similarité avec la protéine codée par le gène *RRS1* (*A. Thaliana*) et interagit avec l'ET3 popP2 (Xi'ou et al. 2014) présent dans une souche du phylotype I. Etant donné son fort niveau de similarité avec *RRS1* et le fait qu'il interagisse avec le même effecteur, le gène *RE-bw* pourrait être un orthologue du gène *RRS1*.

1.4 Rappel des principaux objectifs

Les travaux conduits dans le cadre de la thèse d'Aurore Lebeau (décrits dans la dernière partie de la synthèse bibliographique) ont débouché sur (i) l'identification, dans la core-TEP, d'aubergines hautement résistantes à certaines souches de la Core-Rs2, (ii) la détection, dans la population MM738 (S) × AG9125 (R), du facteur de résistance majeur *ERs1* contrôlant trois souches du phylotype I mais contourné par une souche virulente de ce même phylotype et, d'un QTL mineur permettant de ralentir la progression des symptômes de BW causés par la souche virulente.

Ce 1^{er} état des lieux a soulevé les questions suivantes:

- Quel est le spectre d'action d'*ERs1* et quels sont les éventuels autres QTLs impliqués dans la résistance au BW chez l'aubergine AG91-25 ?
- Existe-t-il dans la diversité de l'aubergine d'autres QTLs qui pourraient compléter ceux déjà détectés chez AG91-25?
- Les facteurs de résistance identifiés, en particulier *ERs1*, peuvent-ils être utilisés afin d'améliorer le niveau de résistance des cultivars locaux de la Réunion ?

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour but de répondre à ces questions et de proposer des perspectives de recherche. Le manuscrit est organisé en trois parties. La première a pour objectif la caractérisation du spectre d'action d'*ERs1* vis-à-vis de souches appartenant aux phylotypes non testés dans la thèse d'A. Lebeau et la cartographie fine de ce facteur de résistance majeur (chapitre 2). La seconde partie traite de l'identification de facteurs génétiques complémentaires à *ERs1* dans deux nouvelles populations d'haploïdes doublés issues des croisements EG203 (R) × MM738 (S) et MM152 (R) × MM738 (S) (chapitre 3). Les lignées EG203 et MM152 ont été choisies en raison du haut niveau de résistance qu'elles présentent vis-à-vis de deux souches qui contournent *ERs1* (PSS4 et R3598). Enfin, la troisième partie de cette thèse présente une tentative de transfert et de valorisation des résultats obtenus au cours des travaux d'A. Lebeau. Les travaux de ce chapitre ont ainsi porté sur l'introgession de facteurs de résistance, dont *ERs1*, dans deux cultivars d'aubergines sensibles (chapitre 4).

Chapitre 2 – Diversité et spécificité des QTLs de résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine AG91-25

Préambule à l'article

Les résultats obtenus durant la thèse d'A. Lebeau ont mené à la détection du premier facteur de résistance majeur chez l'aubergine. Ce facteur de résistance, appelé *ERs1*, confère un très haut niveau de résistance à certaines souches du phylotype I. Néanmoins, l'efficacité de ce facteur de résistance reste inconnue vis-à-vis des souches appartenant aux autres phylotypes du RSSC. De plus, la carte génétique de la population intraspécifique MM738 (S) × AG91-25 (R) a surtout été construite avec un nombre limité de marqueurs AFLPs, difficilement transformables en « breeder friendly markers » et ne pouvant pas être ancrés sur les génomes de référence de l'aubergine et des autres Solanacées. La construction d'une carte dense et ancrée sur les génomes de l'aubergine et de la tomate est un prérequis pour une détection précise des QTLs de résistance présents chez AG91-25 vis-à-vis des différents phylotypes du pathogène, mais également dans l'objectif à plus long terme de caractériser *ERs1*. Du fait d'une synténie étroite entre l'aubergine et la tomate, les connaissances actuelles sur le génome de la tomate (génome complet séquencé avec l'ensemble des gènes annotés) devrait faciliter l'identification de gènes candidats et par la suite la caractérisation d'*ERs1*.

Cette première partie de mon travail de thèse a consisté à préciser le spectre d'action d'*ERs1* en phénotypant la population RILs MM738 x AG91-25 avec quatre nouvelles souches du RSSC. Les souches utilisées appartiennent aux différents phylotypes du RSSC (I, IIA, IIB et III). En raison de leur absence sur l'île de la Réunion et des mesures de quarantaine qui nous sont donc imposées, les souches du phylotype IV n'ont pas été utilisées dans cette étude. La carte génétique publiée de la population de RILs a été complétée par l'ajout de marqueurs SNPs issus de la technique GBS. Des analyses de QTLs ont ainsi été conduites sur les données obtenues avec 4 nouvelles souches ainsi que 4 souches originellement utilisées par Lebeau et al. (2013), cela en utilisant une nouvelle carte génétique densifiée à l'aide de marqueurs SNPs. Un article a été publié dans la revue *Frontiers in Plant Sciences*.



Eggplant Resistance to the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Involves Both Broad-Spectrum and Strain-Specific Quantitative Trait Loci

Sylvia Salgon^{1,2,3*}, Cyril Jourda¹, Christopher Sauvage⁴, Marie-Christine Daunay⁴, Bernard Reynaud^{1,3}, Emmanuel Wicker^{1,5} and Jacques Dintinger^{1*}

¹ UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Saint-Pierre, Réunion, ² Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et Horticole, Saint-Pierre, Réunion, ³ UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical, Université de la Réunion, Saint-Pierre, Réunion, ⁴ UR 1052 Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, Institut National de la Recherche Agronomique, Montfavet, France, ⁵ UMR Interactions Plantes-Microorganismes-Environnement, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Boshou Liao,
Oil Crops Research Institute (CAAS),
China

Reviewed by:

Zonghua Wang,
Fujian Agriculture and Forestry
University, China
Carlos Alberto Lopes,
Brazilian Agricultural Research
Corporation, Brazil

*Correspondence:

Sylvia Salgon
sylvia.salgon@gmail.com
Jacques Dintinger
jacques.dintinger@cirad.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 16 January 2017

Accepted: 02 May 2017

Published: 19 May 2017

Citation:

Salgon S, Jourda C, Sauvage C,
Daunay M-C, Reynaud B, Wicker E
and Dintinger J (2017) Eggplant
Resistance to the *Ralstonia*
solanacearum Species Complex
Involves Both Broad-Spectrum
and Strain-Specific Quantitative Trait
Loci. *Front. Plant Sci.* 8:828.
doi: 10.3389/fpls.2017.00828

Bacterial wilt (BW) is a major disease of solanaceous crops caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). Strains are grouped into five phylotypes (I, IIA, IIB, III, and IV). Varietal resistance is the most sustainable strategy for managing BW. Nevertheless, breeding to improve cultivar resistance has been limited by the pathogen's extensive genetic diversity. Identifying the genetic bases of specific and non-specific resistance is a prerequisite to breed improvement. A major gene (*ERs1*) was previously mapped in eggplant (*Solanum melongena* L.) using an intraspecific population of recombinant inbred lines derived from the cross of susceptible MM738 (S) × resistant AG91-25 (R). *ERs1* was originally found to control three strains from phylotype I, while being totally ineffective against a virulent strain from the same phylotype. We tested this population against four additional RSSC strains, representing phylotypes I, IIA, IIB, and III in order to clarify the action spectrum of *ERs1*. We recorded wilting symptoms and bacterial stem colonization under controlled artificial inoculation. We constructed a high-density genetic map of the population using single nucleotide polymorphisms (SNPs) developed from genotyping-by-sequencing and added 168 molecular markers [amplified fragment length polymorphisms (AFLPs), simple sequence repeats (SSRs), and sequence-related amplified polymorphisms (SRAPs)] developed previously. The new linkage map based on a total of 1,035 markers was anchored on eggplant, tomato, and potato genomes. Quantitative trait locus (QTL) mapping for resistance against a total of eight RSSC strains resulted in the detection of one major phylotype-specific QTL and two broad-spectrum QTLs. The major QTL, which specifically controls three phylotype I strains, was located at the bottom of chromosome 9 and corresponded to the previously identified major gene *ERs1*. Five candidate R-genes were underlying this QTL, with different alleles between the parents. The two other QTLs detected on chromosomes 2 and 5 were found to be associated with partial resistance to strains of phylotypes

I, IIA, III and strains of phylotypes IIA and III, respectively. Markers closely linked to these three QTLs will be crucial for breeding eggplant with broad-spectrum resistance to BW. Furthermore, our study provides an important contribution to the molecular characterization of *ERs1*, which was initially considered to be a major resistance gene.

Keywords: plant–pathogen interaction, *Solanum melongena*, bacterial wilt, quantitative resistance, candidate genes

INTRODUCTION

Ralstonia solanacearum, a widespread soil-borne pathogen present in all continents, is the causal agent of bacterial wilt (BW) disease. The pathogen enters the plant via the roots, then colonizes the xylem vessels and spreads through the vascular system of susceptible plants. It causes typical wilting symptoms, leading to the host plant's rapid death. BW has been reported on cash crops, such as tobacco, as well as on major food crops, such as banana, potato, tomato, and eggplant. Recently, it has been ranked second in the list of the most scientifically/economically important bacterial pathogens (Mansfield et al., 2012). *R. solanacearum* was considered as a species complex for the first time by Gillings and Fahy (1994) because it includes a large number of genetic groups. Later, the *R. solanacearum* species complex (RSSC) was subdivided into five monophyletic groups called phylotypes. A probable geographical origin has been attributed to each phylotype: phylotype I strains originate from Asia, phylotype IIA strains from the north of Latin America and the Caribbean, phylotype IIB strains from South America, phylotype III strains from Africa, and phylotype IV strains from Indonesia, Australia, and Japan (Fegan and Prior, 2005; Wicker et al., 2012). Using both a comparison of sequenced genomes and a polyphasic classical taxonomy approach, RSSC was recently subdivided into three genomic species: (i) *Ralstonia solanacearum*, including phylotype IIA and IIB; (ii) *R. pseudosolanacearum*, including phylotypes I and III; and (iii) *R. syzygii*, including the former *R. solanacearum* phylotype IV and the clove pathogen *R. syzygii* (Safni et al., 2014). Although a recent study combining genomics, proteomics and functional phenotypic assays confirmed this classification (Prior et al., 2016), its ecological and evolutionary relevance is not yet known.

Ralstonia solanacearum species complex strains represent a significant threat for crops because of their unusually broad range of host plants (more than 200 plant species), their extensive genetic diversity and persistence in the field (Genin and Denny, 2012). Strategies to manage BW, such as crop rotation, elimination of weeds that provide alternative hosts and biological control are insufficient and the disease still causes major profit loss (Huet, 2014). Thus, breeding resistant cultivars that have broad spectrum-resistance to diverse strains of RSSC is an important part of a composite strategy for controlling BW in infested areas. Until now, the genetic mechanisms underlying resistance have been studied almost exclusively in model plant species. In *Arabidopsis thaliana*, several molecular studies led to the identification of the major resistance gene *RRS1*, coding for a TIR-NBS-LRR resistance protein, which interacts directly

with the avirulence effector PopP2 (Deslandes et al., 1998, 2002, 2003; Lahaye, 2004). *RRS1* also requires the presence of a Cys protease, encoded by the *RD19* gene, to mediate resistance to GMI1000, a phylotype I strain (Bernoux et al., 2008). More recently, the *RRS1* gene was found to work closely with the *RPS4* gene (resistance to *Pseudomonas syringae* 4), increasing resistance to both *Pseudomonas* and RSSC strains with AvrRps4 and PopP2 effectors, respectively (Narusaka et al., 2009; Sohn et al., 2014). *A. thaliana* quantitative BW-resistance is mediated by the *ERECTA* gene, a member of the receptor-like kinase (RLK) family (Godiard et al., 2003). The latest gene identified, which was found to be associated with *A. thaliana* resistance to BW, is *wat1* (walls are thin1). It confers broad-spectrum resistance to vascular pathogens, including RSSC strains, *Xanthomonas campestris* and *Verticillium dahliae* (Denancé et al., 2013). BW-resistance studies have also been carried out on crops, mainly on solanaceous species. However, these studies focus on resistance inheritance and rarely characterize the molecular mechanisms. In the tomato (*S. lycopersicum*) accession Hawaii 7996, BW-resistance is controlled by two major and several minor quantitative trait locus (QTLs). The major QTLs called *bwr-12* and *bwr-6*, confer partial resistance to phylotype I and both phylotypes I and IIB strains, respectively (Wang et al., 2000, 2013; Carmeille et al., 2006). In eggplant (*Solanum melongena* L.), a major gene (*RE-bw*) was cloned. The RE-bw protein was found to interact with the type III effector PopP2 (Xi'ou et al., 2014). Furthermore, wild relatives of eggplant have been shown to harbor highly effective resistance factors, especially in the *S. aethiopicum* Aculeatum group (generally referred to as *S. integrifolium*) and *Solanum torvum*, which exhibits HR in the presence of the type III effector Rip36 (=RipAX2) (Nahar et al., 2014). A panel of 10 eggplant accessions, tested under controlled conditions against a core collection of 12 strains representative of all RSSC phylotypes (Lebeau et al., 2010), revealed that eggplant is a potential host for all phylotypes. It also exhibits a wide range of incompatible reactions (absence of wilting symptoms and colonization). These results indicate that eggplant and some related *Solanum* species probably harbor major strain-specific BW-resistance genes.

Eggplant and its close wild relatives also display resistance for a broad range of pathogens (Daunay, 2008; Syfert et al., 2016). In cultivated eggplant, introgression breeding of resistance, originating from related species, has been limited until now (Daunay, 2008). However, crossability studies have illustrated the potential of introgression breeding (Behera and Singh, 2002; Premabati et al., 2015; Kaushik et al., 2016; Plazas et al., 2016). Whereas the majority of Solanaceae crop species originate from the New World (tomato, potato, and pepper), eggplant and its wild relatives are native to the Old World. Eggplant's ancestor

was East African and probably spread to Asia via the Middle East, either spontaneously or during human migrations (Weese and Bohs, 2010). Eggplant seems to have been domesticated in Southeast Asia. The long-lasting co-evolution between eggplant and its Old World pathogens may explain why specific resistance genes do not exist in solanaceous crops in the New World (Hirakawa et al., 2014). Similar to tomato and pepper, eggplant is an autogamous diploid species with 12 chromosomes and a genome size estimated at 1.1 Gb (Arumuganathan and Earle, 1991). Despite its agronomical importance, eggplant genetics and genomics are less documented than other major solanaceous crops. Given the absence of high-density linkage maps for eggplant, it is difficult to detect reliable QTLs in short delimited genomic intervals and to identify the underlying putative resistance alleles. Thanks to the recent publication of the first sequenced draft genome of eggplant (Hirakawa et al., 2014) and the decreasing cost of high-throughput sequencing technologies (HTS), it is now easier to construct high-resolution maps for this species. Among the HTS methods, the genotyping-by-sequencing (GBS) method has been widely used to genotype thousands of individuals at a relatively low cost, by multiplexing samples with individual barcodes (Elshire et al., 2011). In eggplant, an SNP-based linkage map inferred from GBS would facilitate comparison between genetic and physical maps of syntenic crops, in particular tomato and potato, which have been studied extensively. Thus, with the recent advances in marker discovery and eggplant's special position in Solanaceae phylogeny, eggplant constitutes an outstanding model for mapping and comparing resistance factors to pathogens and their underlying molecular mechanisms.

Eggplant is potentially resistant to all the RSSC phylotypes. Therefore, it is a particularly interesting species for the study of BW-resistance. In this context, a population of recombinant inbred lines (RILs), from a cross between a susceptible parent (line MM738) and a resistant parent (line AG91-25), was phenotyped with phylotype I strains by Lebeau et al. (2013). An intraspecific map of the population was set up with 119 molecular markers positioned on 18 linkage groups. This study led to the detection of a major monogenic resistance locus (called *ERs1*), a unique case in crop RSSC resistance. However, the low density of this map, the lack of anchor markers, together with the very low level of molecular polymorphism in the RIL population, limited further investigation into the genetics of AG91-25 RSSC resistance. Our primary goal was to develop tools for breeding broad-spectrum resistant cultivars. Therefore, we focused on the genetic architecture of AG91-25 resistance, with the following objectives:

- (i) Determine the phylotype spectrum of *ERs1*-associated resistance to a collection of RSSC strains encompassing all phylotypes that affect solanaceous crops (phylotypes I, IIA, IIB, and III).
- (ii) Identify other QTLs contributing either to broad host resistance or phylotype-specific resistance.
- (iii) Determine physical position of *ERs1* and other identified QTLs by constructing a dense anchored genetic map; investigate whether the resistance loci contain orthologous

genes of already known R-genes, by using the tomato reference genome as a comparison.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and RSSC Strains

We studied a population of 180 RILs, derived from the cross between *S. melongena* MM738 (susceptible) and *S. melongena* AG91-25 (resistant to BW). This population, previously phenotyped for BW-resistance to four strains of phylotype I (Lebeau et al., 2013), was exposed to four new strains belonging to phylotypes I, III (*R. pseudosolanacearum* sensu lato, Safni et al., 2014), IIA and IIB (*R. solanacearum* sensu lato, Safni et al., 2014). **Table 1** provides further information on the eight strains, in particular their geographical origin and the host on which they were isolated. All strains are very aggressive on the susceptible parent and display different levels of aggressiveness on the resistant parent (Lebeau et al., 2010). We chose not to consider resistance to phylotype IV strains (*R. syzygii* subsp. *indonesiensis* sensu lato, Safni et al., 2014) because of the quarantine restriction in Réunion and also because this phylotype was reported to be of low epidemiological potential (Wicker et al., 2012) and of little agronomic importance for Solanaceae (Lebeau et al., 2010).

DNA Extraction, Library Construction, and Sequencing

DNA was extracted from a bulk of young leaves using a modified CTAB procedure (Doyle and Doyle, 1987). The quality and quantity of DNA were analyzed using the Qubit fluorometric technology (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and agarose gel electrophoresis. GBS libraries were produced by the Global Genetik Teknolojileri (GGT) Company (Istanbul, Turkey) according to the protocol developed by Elshire et al. (2011) and using barcode sequences (for details, see Supplementary Table S1). Libraries were sequenced using Illumina technology with DNA-seq paired-end protocols on a HiSeq2000 sequencer (Illumina, Inc., San Diego, CA, United States) by the Wisconsin Biotech Center.

Sequence Data Processing and Polymorphism Detection

Illumina adapter sequences were removed from raw reads and remaining reads were assigned to individual lines using barcode sequences (one specific barcode sequence for each line) with the GBS barcode splitter tool¹. Barcode sequences were trimmed, unassigned reads were removed and remaining reads were trimmed to 90 bp. The STACKS software v.1.28 (Catchen et al., 2013) was used to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 180 RIL population and their two parental lines. First, reads of low quality (below an average phred score of 10 with a sliding window of 15 bp) and reads with uncalled bases were removed using the *process_radtags* program. Remaining reads were merged into one single file per individual line using a

¹<https://sourceforge.net/projects/gbsbarcode/>

TABLE 1 | Description of the eight *R. solanacearum* species complex strains used for phenotyping the eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population.

Strain	Alternative name	Host of origin	Country	Classification ^a
GMI1000 ^b	RUN0054, JS753	<i>Solanum lycopersicum</i>	French Guyana	I-18
PSS366 ^b	RUN0155	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15
CMR134 ^b	RUN0215, CFBP7058	<i>Solanum scabrum</i>	Cameroon	I-13
PSS4 ^b	RUN0157, CIP410	<i>Solanum lycopersicum</i>	Taiwan	I-15
TO10 ^c	RUN0969	<i>Solanum lycopersicum</i>	Thailand	I-47
CFBP2957 ^c	RUN0036, MT5	<i>Solanum lycopersicum</i>	Martinique	IIA-36
CFBP3059 ^c	RUN0039, JS904	<i>Solanum melongena</i>	Burkina Faso	III-23
CMR34 ^c	RUN0147, CFBP7029	<i>Solanum lycopersicum</i>	Cameroon	IIB-1

^aClassification using the Phylotype-Sequevar nomenclature (Fegan and Prior, 2005). ^bStrains used for RIL population phenotyping in Lebeau et al. (2013). ^cStrains used for RIL population phenotyping in the present study.

concatenate function. The quality of cleaned reads was checked using the FastQC tool (Andrews, 2010). Next, cleaned reads were assembled and genotyped using both the *de novo* pipeline (without the use of a reference genome) and the *reference-guided* pipeline (after mapping reads on the available eggplant genome) in STACKS.

For the reference-guided pipeline, bowtie software version 1.1.1 (Langmead et al., 2009) was used to map cleaned reads on the *S. melongena* genome SME_r2.5.1 (Hirakawa et al., 2014). Only the best uniquely mapped reads with a maximum of one mismatch were selected. For the two methods, three identical reads were required to produce a locus. The catalog of loci was constructed from six samples including parental lines MM738 and AG91-25 and four individuals of the progeny with highest sequencing depths. Additional filters were added to select significant SNPs:

- Loci present in at least 40% of individuals;
- Minimum SNP allele frequency of 5% in the RIL population;
- Maximum SNP heterozygosity of 15% in the RIL population.

The minimum SNP allele frequency was set to the low value of 5% according to the study conducted by Lebeau et al. (2013) in which BW-resistance was associated to highly distorted markers. We allowed the high heterozygosity rate of 15% in RILs because of genotyping errors and bias in SNPs, where up to 60% of data was missing. Erroneous loci containing paralogous sequences or repetitive sequences were expected to contain more polymorphisms than true loci with different allelic sequences only (Tang et al., 2006; Treangen and Salzberg, 2012). Thus, highly polymorphic loci (> 3%) were discarded to avoid potentially false positive SNPs. Missing genotyping data were imputed using a classification method called “random forest” (Breiman, 2001; Poland et al., 2012) implemented in the missForest package (Stekhoven and Bühlmann, 2012). The package also provided the proportion of falsely classified entries (PFC) for imputed data.

Genetic Map Construction

The genetic map was constructed from all SNPs that were polymorphic between the two parents of the RIL population, using JoinMap® 4.1 (Van Ooijen, 2006). A minimum independence value of logarithm of odds score (LOD) of

5.0 was attributed in order to group the markers. Linkage groups containing less than three markers were discarded. Resulting linkage groups were merged when markers from one group indicated cross-links (SCL) with markers from another group. Recombination fractions were converted to map distances in centimorgans (cM) using the Kosambi mapping function. Markers with a recombination frequency > 0.7 and LOD > 1 were declared unrelated to a linkage group and consequently removed. Perfectly identical markers (similarity value of 1) were excluded before ordering markers to speed up the analysis time. Markers were ordered using the default values of JoinMap. After ordering, the mean chi-square contributions of each marker were computed. A high chi-square contribution indicates that the marker does not display a good fit in the linkage group. Thus, markers with mean-square contributions over five were removed and the remaining markers were re-ordered. In order to compare our map with published Solanaceae maps, catalogs of our loci were aligned on the eggplant (*Solanum melongena*) genome (SME_r2.5.1; Hirakawa et al., 2014), the tomato (*Solanum lycopersicum*) genome (SL2.50; Sato et al., 2012) and the potato (*Solanum tuberosum*) genome (PGSC_DM_v4.03; Xu et al., 2011) using the Blastn program in the NCBI's BLAST+ v 2.2.28 software (Camacho et al., 2009). The cut-off values for a significant hit were fixed at 1×10^{-20} for the eggplant genome and 1×10^{-15} for tomato and potato genomes. Maps were plotted using MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

Resistance Assays and Phenotypic Data Analysis

Experimental Design

We performed resistance assays for the four new RSSC strains on a set of 158 to 180 F₆₋₇ RILs at the experimental station of the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) in Saint-Pierre, Réunion Island (140 m elevation, 21°S, 55.3°E). The number of phenotyped RILs differed slightly between assays, depending on their germination rate and post-transplanting mortality rate. An additional strain, TO10 (Table 1) was tested at CIRAD (assay nickname “TO10.Réunion”) and at an experimental station belonging to a partner seed company in central Java, Indonesia (339 m elevation, -8°N, 110°E) (assay nickname “TO10.Indonesia”). Each assay was conducted

in two greenhouses during two seasons between 2010 and 2015, representing four replicates, following protocols described below. Each replicate included five plants of each RIL family, 85 to 125 plants of each parent, 20 plants of the F_1 and 100 plants of each BC_1 generation. Plants were arranged using a randomized complete block design to control environmental effects. For “TO10.Indonesia” assay, two replications of eight plants for each RIL family and 12 plants of each parental line were implemented. Supplementary Table S2 shows the details for each assay, including environmental conditions (period, temperature, and relative humidity).

Inoculation and Disease Assessment

Ralstonia solanacearum species complex strains were grown at 28°C on 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride medium (Kelman, 1954). Actively growing cultures were harvested after a 24 h incubation period, by flooding plates with 5 mL of Tris buffer (Trizma 0.01 M pH 7.2; Sigma, St Louis, MO, United States). The bacterial suspension was then titrated by spectrophotometry to adjust the inoculum concentration at approximately 1×10^8 CFU per mL ($OD_{600nm} = 0.1$).

Plants were inoculated at the 4–5 fully expanded leaf stage, after a preliminary knife-scarification of the roots. The bacterial suspension was drenched through the drip irrigation system immediately after the roots were damaged with a knife. In this way, each plant was inoculated with an estimated average of 100–200 mL at 10^6 CFU per mL. For tests in Indonesia, each plant was inoculated with 30 mL of a bacterial suspension at 10^8 CFU per mL.

Symptom scoring was carried out twice a week using a wilting scale, as defined by Lebeau et al. (2013). For every scoring date, we computed the wilt mean score (mean rating of all plants from each replicate, coded SCO), as well as the proportion of wilted plants (proportion of plants with a score ≥ 1 , coded W) for each recombinant line, the parents and the progenies. At the end of the assay, the presence of latent infection was tested on all asymptomatic plants: a section of each plant stem base was sampled, transferred into a tube filled with 5 mL Tris buffer and left for 1–2 h at room temperature to allow bacteria to stream out of the xylem vessels. Thereafter, 50 μ L was streaked onto a plate of selective medium (Granada and Sequeira, 1983) and incubated at 28°C for 3 days. A plate was considered positive when RSSC colonies were visible. The Colonization Index (CI) of each RIL was then computed (Lebeau et al., 2013). The area under the disease progress curve (AUDPC) was computed at the end of each assay for (i) the score (SCOaudpc) and (ii) the percentage of wilted plants (Waudpc). For the test in Indonesia, scoring was restricted to the incidence of BW (number of wilted plants in each family) and carried out once a week for 4 weeks. The W value was calculated at each scoring date and the AUDPC value was computed for the proportion of wilted plants at the end of the assay.

Statistical Analysis of Phenotypic Data and QTL Mapping

Descriptive statistics and analysis of variance (ANOVA) were carried out using R software (R Core Team, 2014). Phenotypic

variables W, SCO, CI, Waudpc, and SCOaudpc were computed, as described previously (Carmeille et al., 2006; Lebeau et al., 2013). Phenotypic correlations between variables were estimated using the Pearson coefficient for each assay. ANOVA on Waudpc was computed for each strain using the linear model implemented in the R package stats. The ANOVA fixed effects model for each individual assay took into account only the “genotype” and “greenhouse” factors. The ANOVA fixed effects model for combined seasons took into account the “genotype,” “season,” and “greenhouse nested within the season” factors, as well as the interaction between “genotype” and “season.” Genotypic and environmental variance was calculated using ANOVA results to estimate the broad-sense heritability (h^2) (Hallauer and Miranda, 1981). The normal distribution of phenotype values was tested with Shapiro–Wilk tests (normality was accepted for P -values > 0.05). Phenotypic data from assays with strains GMI1000, PSS366, and CMR134 were analyzed separately. They were also combined, insofar as the strain effect in the ANOVA model was not found to be significant by Lebeau et al. (2013). For the purposes of consistency with previous work, data from strains GMI1000, PSS366, and CMR134 were considered together and named “grouping,” whereas data from individual strains analyzed across two seasons were named “combined.” According to their W and CI values, parental lines and progeny were attributed to the six phenotypic classes defined in Lebeau et al. (2010): 1 = highly resistant, 2 = moderately resistant, 3.1 = partially resistant, 3.2 = latent infection, 4 = moderately susceptible, 5 = highly susceptible.

QTL mapping was performed for Waudpc variable using the R/qtl package version 1.39 (Broman et al., 2003). R/qtl considers a RIL population as fixed (without heterozygote genotypes) and treats the heterozygotes as missing data. An initial scan was performed using Simple Interval Mapping (SIM) (Lander and Botstein, 1989) with a 1 cM step and a non-parametric model. All variables with a distribution close to normality were then analyzed with Composite Interval Mapping (CIM) (Zeng, 1994) by using a parametric model with the simple regression method (Haley and Knott, 1992). The number of covariates was fixed according to the number of QTLs detected in SIM analysis. Another model with the detected QTLs was created and their positions were re-estimated using the `makeqtl` command and the `refineqtl` command with default parameters, respectively. Lastly, the `fitqtl` function was used to estimate the proportion of phenotypic variation explained by each QTL (R^2), as well as the additive effects of each QTL. The digenic epistatic interaction between QTLs pairs was also tested. The Waudpc means were compared for “AA” and “BB” genotypes (corresponding to the genotype of the susceptible parent and the genotype of the resistant parent, respectively) at each QTL, using a Fisher’s least-significance-difference test (LSD) (Hayter, 1986). In order to detect potential closely linked QTL, an automated stepwise model selection, scanning for additive and epistatic QTL, was performed using the `stepwiseqtl` function (Manichaikul et al., 2009).

Phenotypic variables obtained in assays with strains GMI1000, PSS366, and CMR134, displaying strong deviations from normality, were also analyzed using a binary model and the Haley Knott (HK) regression. For the binary model, Waudpc

was coded as “0” when the value was ≤ 10 and “1” elsewhere. These values were chosen because they clearly differentiate two classes from the bimodal distributions of the phenotypes. The LOD thresholds, which indicate “significant” for any QTLs, were estimated using 1,000 permutations with a genome-wide significance level of $\alpha = 0.05$ (Churchill and Doerge, 1994) for the normal and binary models, and $\alpha = 0.01$ for the non-parametric model. The Haley Knot regression was used for its speed and robustness against non-normality (Rebaï, 1997). The confidence interval for each QTL peak was derived from the Bayesian 95% credible interval using the bayesint function implemented in R/qtl. All the QTLs detected were named as follows: EBWR ‘linkage group number’ (EBWR, the acronym for Eggplant Bacterial Wilt Resistance).

Searching for Candidate R-Genes Underlying the Detected QTLs

The ITAG2.4 tomato annotated transcriptome (Sato et al., 2012²) and the annotated transcriptome of the susceptible parental line MM738 (Sarah et al., 2016³) were used to search typical R-genes belonging to the TNL (TIR-NB-LRR), the CNL (CC-NB-LRR), the RLP (receptor-like proteins) and the RLK classes. Transcripts of the MM738 accession were mapped on the eggplant draft genome using the “Exonerate version 2.2.0” software with the est2genome model (Slater and Birney, 2005). RNA-seq reads of the resistant eggplant AG91-25 were produced, cleaned and assembled following the method published previously (Sarah et al., 2016). Cleaned reads of the two parents were mapped onto the MM738 transcriptome using the Burrows–Wheeler Aligner (Li and Durbin, 2009) and the variant calling was performed using the Genome Analysis Toolkit, version 3.3 (McKenna et al., 2010). Candidate R-genes found in QTL regions were further analyzed by comparing the parental line alleles. We also searched candidate R-genes in transcripts which are uniquely present in AG91-25 line. Sequences of cloned BW-resistance genes *RRS1* and *RPS4* (genes ID 834562 and 834561; Deslandes et al., 1998, 2003), *RD19* (gene ID 830064; Bernoux et al., 2008), *RE-bw* (Accession ID JQ429763.1; Xi’ou et al., 2014), *ERECTA* (gene ID 817173; Godiard et al., 2003) and *wat1* (gene ID 843886; Denancé et al., 2013) were aligned on tomato and eggplant genomes using the BLAST tool included on the SOL genomics network website⁴.

RESULTS

A New Dense Genetic Map of Eggplant, Anchored on Tomato, Potato, and Eggplant Genomes

The sequencing of GBS libraries resulted in 662×10^6 paired-end reads of 100 bp (2×100). After the cleaning step, a mean of 1.3M reads were demultiplexed for each individual in the RIL population (63% of the reads were discarded). The number of

reads in parental lines was 2.5×10^6 for MM738 and 1.9×10^6 for AG91-25. The *de novo* pipeline produced 1,779 filtered SNPs with a mean heterozygosity of 0.04 and a mean missingness rate of 35.6%. The *reference-guided* pipeline produced 890 filtered SNPs with a mean heterozygosity of 0.07 and a mean missingness rate of 27.9%. The two sets of SNPs were merged and redundant SNPs (same physical position) were manually discarded. Good performance of missForest led to a PFC value close to 0. Thus, imputed markers with a PFC > 0.2 were discarded for subsequent analyses. The final data set consisted of 180 genotyped RILs with 1,590 SNPs from the two GBS pipelines and 185 additional molecular markers [amplified fragment length polymorphisms (AFLPs), simple sequence repeats (SSRs), and sequence-related amplified polymorphisms (SRAPs)] previously reported by Lebeau et al. (2013). The genetic map was constructed and based on 867 SNPs, 139 AFLPs, 28 SSRs, and 1 SRAP arranged in 14 linkage groups. Thirty-five percent of the markers were not included in the final map (ungrouped, unrelated or high mean-square contribution markers). Lengths of linkage groups ranged from 37.7 to 156.5 cM and the total length of the map was 1518.1 cM, with an average marker density of 1.47 cM and 22–138 markers per linkage group (Table 2). Among the 867 SNP markers (The 90 bp sequences wearing the SNPs), 827 markers gave significant hits on the eggplant reference genome, 199 gave significant hits on the tomato reference genome and 249 gave significant hits on the potato reference genome. Among the 33,873 contigs of the eggplant genome, 595 contigs were anchored in our genetic map, of which 454 were aligned on the tomato genome SL2.40 version. The final dataset, which includes the genetic map and the physical position of SNPs, is provided in Supplementary Table S3. Overall, the data generated a dense new linkage map of eggplant from an intraspecific cross, with 14 linkage groups that have several regions anchored on the tomato genome and produce 12 chromosomes encoded from E01 to E12 (Figure 1).

Patterns of Bacterial Wilt Resistance in the RIL Population

The frequency distributions of Waudpc induced by the eight RSSC strains in the RIL population are shown in Figure 2. GMI1000, PSS366 and CMR134 RILs distributions were similar to those reported by Lebeau et al. (2013). Thus, we only present the distribution from the three strains combined (Figure 2A). For strain TO10, results are presented separately for Indonesia (Figure 2C) and Réunion (Figure 2D) because different protocols were used for both assays.

For strains PSS4, CFBP2957, CFBP3059, and CMR34, results for Waudpc variable (Figures 2B,E–G) are presented for combined seasons. Each season represents a repetition. For the four strains, frequency distributions for individual seasons are presented in Supplementary Figure S1 (Waudpc). Disease evolution curves of parental lines and the F1 generation are presented in Supplementary Figure S2. Maximal wilting, maximal score, SCOaudpc and CI are not displayed, as these variables are all correlated with Waudpc ($0.45 < R^2 < 1$, depending on strains and seasons). Results indicate four RILs distribution

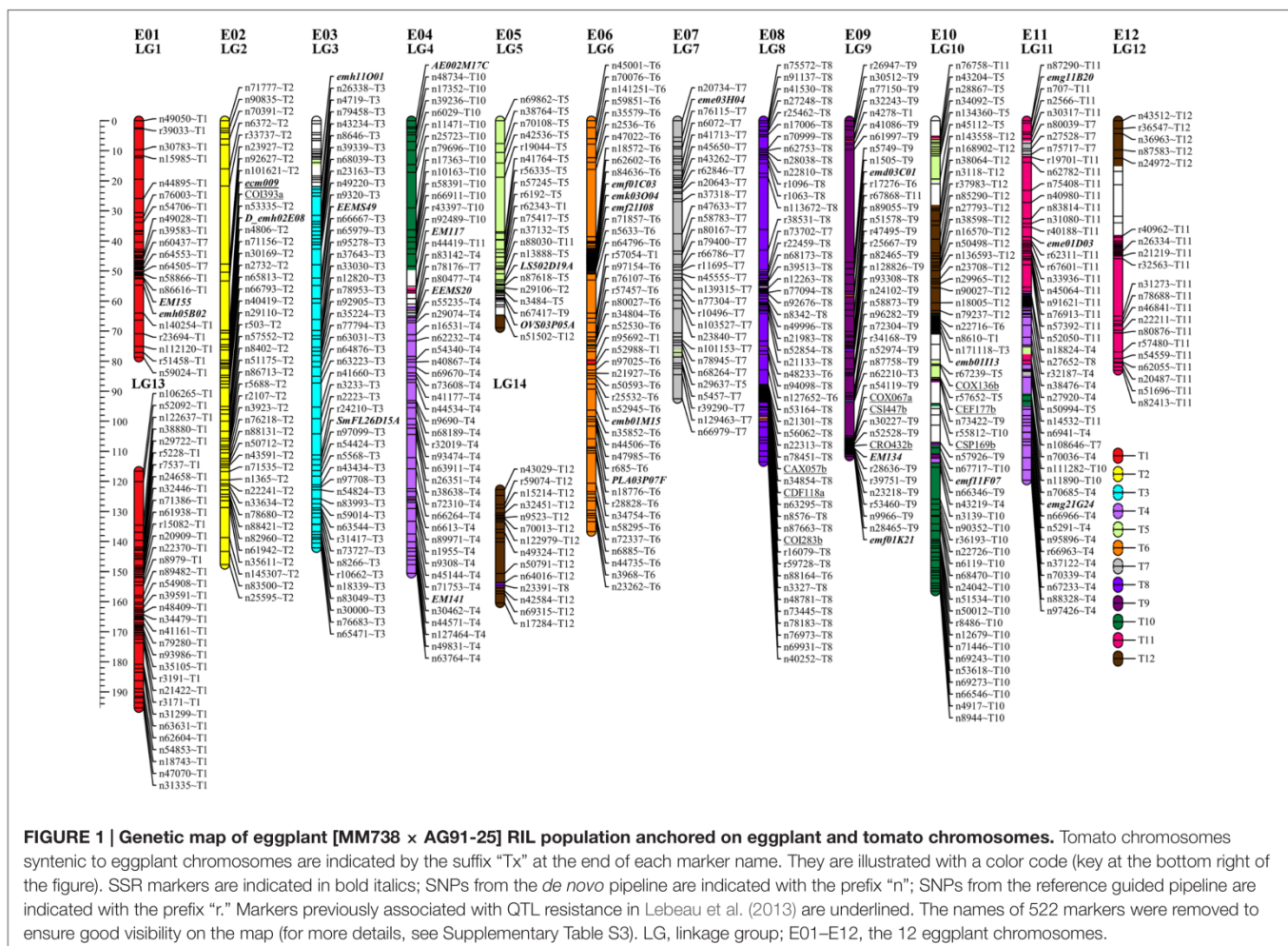
²[ftp://ftp.sgn.cornell.edu/tomato_genome/annotation/ITAG2.4_release](http://ftp.sgn.cornell.edu/tomato_genome/annotation/ITAG2.4_release)

³<http://arcad-bioinformatics.southgreen.fr/node/17>

⁴www.solgenomics.net

TABLE 2 | Statistics of the eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population genetic map, including SSR, SRAP, and AFLP from previous work by Lebeau et al. (2013) and newly genotyped SNP markers.

Linkage group (Chromosome)	Length (cM)	Number (No.) markers	No. SNPs	No. SSRs	No. SRAPs	No. AFLPs	Average density ^a (cM)	Number of gaps ^b (> 10 cM)
1 (E01)	78.7	51	37	2	0	12	1.54	0
13 (E01)	78.7	58	54	0	0	4	1.36	1
2 (E02)	147.7	55	49	2	0	4	2.69	3
3 (E03)	142.1	73	67	3	0	3	1.95	0
4 (E04)	150.6	63	54	4	0	5	2.39	1
5 (E05)	68.9	39	31	2	0	6	1.77	1
14 (E05)	37.7	22	17	0	0	5	1.71	1
6 (E06)	136.7	122	90	5	0	27	1.12	2
7 (E07)	92.5	46	41	1	0	4	2.01	1
8 (E08)	113.5	138	121	1	0	16	0.82	1
9 (E09)	111.6	135	114	3	0	18	0.83	2
10 (E10)	156.5	111	92	2	1	16	1.41	1
11 (E11)	119.6	84	68	3	0	13	1.42	0
12 (E12)	83.1	38	32	0	0	6	2.19	2
Total	1518.1	1035	867	28	1	139	1.47	16

^aNumber of markers per cM. ^bGenetic region without marker.

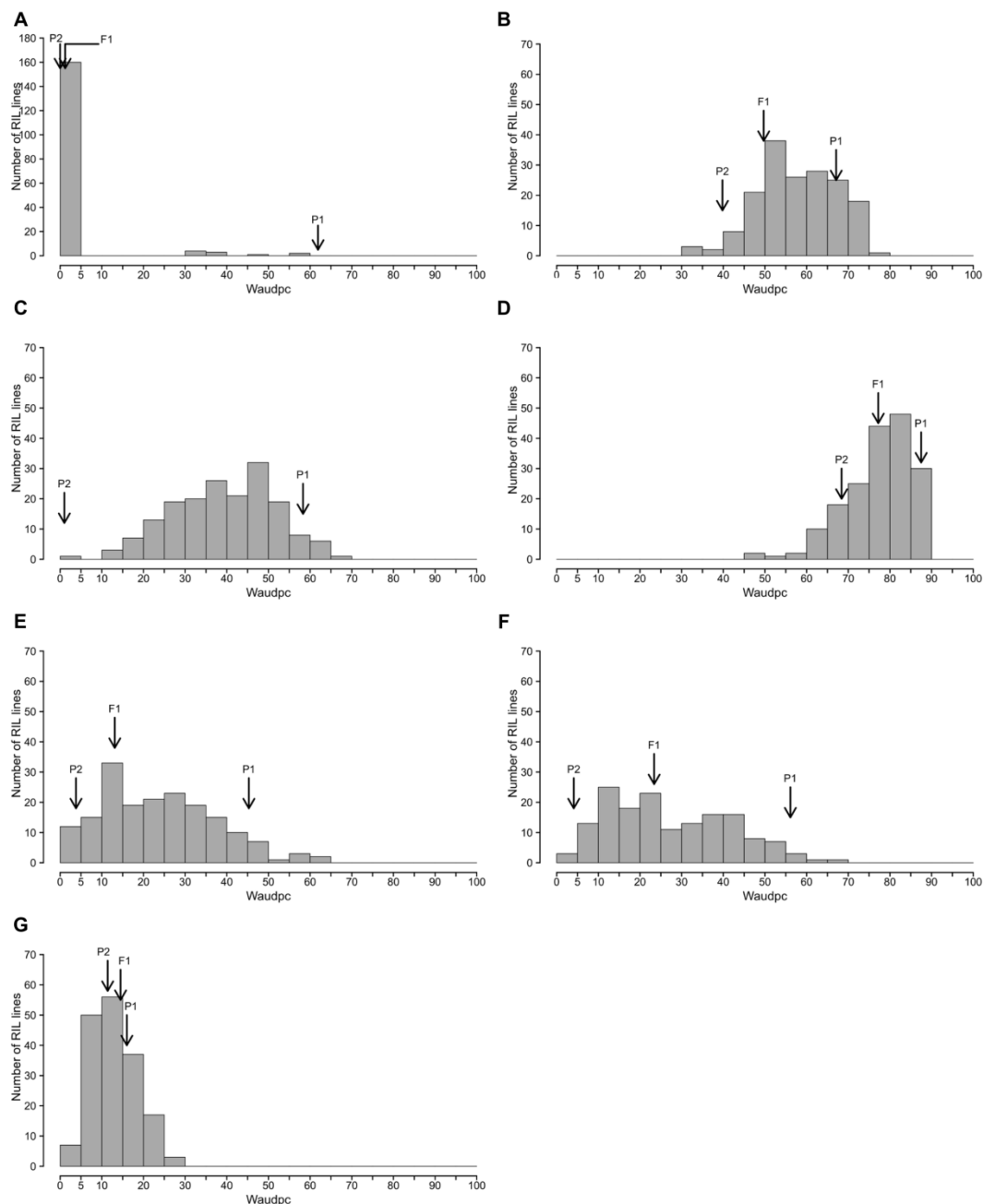


FIGURE 2 | Frequency distributions of Waudpc in the eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population, inoculated with eight *R. solanacearum* species complex strains. Frequency distribution of Waudpc (area under the disease progress curve, based on the progressive percentage of wilted plants) for strains GMI1000, CMR134, and PSS366 combined in a single analysis (A); combined seasons for strain PSS4 (B); TO10.Indonesia (C) TO10.Réunion (D); and combined seasons for strains CFBP2957 (E), CFBP3059 (F) and CMR34 (G); Arrows indicate the means of susceptible parent P1 (MM738), resistant parent P2 (AG91-25) and their F1 (P1 × P2).

patterns, specific to (i) strains GMI1000, PSS366, and CMR134 (phylotype I); (ii) PSS4 and TO10 (phylotype I); (iii) CFBP2957 and CFBP3059 (phylotypes IIA and III, respectively); and (iv) CMR34 (phylotype IIB).

With the strains GMI1000, PSS366, and CMR134, as published by Lebeau et al. (2013), RILs distribution is discontinuous and

skewed toward the highly resistant parent P2 (Figure 2A), suggesting that the control of resistance is monogenic.

With strain PSS4, also previously published by Lebeau et al. (2013), the RIL distribution is continuous (Figure 2B), P2 is moderately susceptible with a delayed infection and slower pathogenesis than on susceptible P1 (Supplementary Figure S2B).

This suggests that a resistance factor influences disease kinetics. When infected with strain TO10, RILs distribution is continuous (Figure 2C) and normal ($P = 1.1 \times 10^{-01}$) for Waudpc in Indonesia. However, it is skewed toward the parent P1 in Réunion ($P = 1 \times 10^{-06}$) (Figures 2D). Parent P1 is highly susceptible in both trials (Table 3), particularly in Réunion Island. P2, resistant in Indonesia (Table 3), is highly susceptible in the Réunion Island trial, although its disease progression is slower than for P1 (Supplementary Figure S2D), which again suggests that the presence of QTL acts primarily in the early stage of the infection. The broad sense of heritability of the Waudpc is higher in Indonesia ($h^2 = 0.71$) than in Réunion Island ($h^2 = 0.38$).

For both strains CFBP2957 (Figure 2E) and CFBP3059 (Figure 2F), RILs display a continuous distribution; the parental lines are positioned near the extremes of the frequency distribution. P1 is moderately susceptible, whereas parental line P2 is moderately resistant to both strains (Table 3). The values for Waudpc in RIL families did not have a normal distribution (P -values of 1.2×10^{-03} for CFBP2957; 3.0×10^{-04} for CFBP3059). RILs with transgressive phenotypes were observed on both strains (Figures 2E,F). The F1 progeny were skewed toward AG91-25, indicating partly dominant inheritance in favor of resistance (Supplementary Figures S2E,F). For both strains, the backcross with parent AG91-25 (BC1P2) was moderately resistant, whereas the backcross with parent MM738 (BC1P1) was moderately susceptible. The ANOVA revealed a highly significant effect of the genotype on Waudpc ($P < 0.001$) (Table 3). The genotype $\times$ season interaction was not significant in CFBP2957 assay and significant in the CFBP3059 assay ($P < 0.001$; Table 3). Waudpc variable is highly heritable with h^2 values of 0.48 and 0.73 for CFBP3059 and CFBP2957 strains, respectively.

Recombinant inbred line distribution is also continuous in the case of strain CMR34. The parental lines are placed in the middle of the distribution (Figure 2G). Both are moderately resistant in the first season and partially resistant in the

second (Supplementary Figures S1G,H). Waudpc has a normal distribution ($P = 2.0 \times 10^{-01}$). Values for F1, BC1P2 and BC1P1 progeny (Table 3) are all close to those of their parents for both variables. The absence of a genotype effect according to ANOVA indicates that the continuous distributions of the Waudpc variable probably resulted mainly from environmental effects. As the genotype effect was not significant, heritability was not calculated for this strain.

The four patterns of distribution observed for Waudpc indicate the probable co-existence of both complete monogenic and partial polygenic resistance in the RIL population. QTL mapping was undertaken to check this hypothesis.

A Polygenic Resistance in AG91-25 with a Major QTL and Broad-Range QTLs

Simple Interval Mapping, with both binary (bin) and non-parametric (np) models, was performed on Waudpc values. Strains GM11000, PSS366, and CMR134 were analyzed separately and in combination (Table 4). A single QTL was identified and located on linkage group 9 (Chr. 9) between 106.4 and 106.8 cM (bin model) and between 105.8 and 106.9 cM (np model). LOD scores obtained with the bin model were more homogeneous (13.9–16.5) than those obtained with the np model (13.1–23.9). The QTL, named *EBWR9* according to its position on LG9, co-localized with the COX067a, CRO432b and CSI447b AFLP markers (Figure 3) flanking *ERs1* resistance gene, as reported by Lebeau et al. (2013). These results indicate that *EBWR9* and *ERs1* represent the same locus. The genetic region carrying *EBWR9* is extremely distorted in favor of the resistant parent (P2) allele “B.” Among the 170 genotyped and phenotyped RILs, 160 had the “BB” genotype (Waudpc = 0.3 ± 0.8) (Figure 4A), whereas 10 had the “AA” genotype (with Waudpc = 40.7 ± 10.1) at the r19023 marker. The locus *EBWR9* was not detected against the other strains of the RSSC.

TABLE 3 | Mean Waudpc values (with standard errors) for parents P1 (MM738), P2 (AG91-25) and their progenies, obtained with eight *R. solanacearum* species complex strains.

Strain	Location	Parents		Progenies of [P1 $\times$ P2]			RILs			
		P1 ^a	P2 ^a	F ₁	BC ₁ P1	BC ₁ P2	Mean	V.F ^b	V.F $\times$ S ^b	h^{2c}
GM11000	Réunion	65.5 (11)	0 (0)	3.5 (0.8)	0.4 (0.4)	0.8 (0.8)	2.9 (0.6)	–	–	–
PSS366	Réunion	53.7 (2.4)	0 (0)	0 (0)	0.4 (0.4)	1.9 (1.9)	2.8 (0.6)	–	–	–
CMR134	Réunion	66.5 (3.2)	0.1 (0.1)	0 (0)	1.4 (0.7)	0 (0)	2.3 (0.5)	–	–	–
Grouping ^d		61.9 (4)	0 (0)	1.2 (0.8)	0.7 (0.3)	0.9 (0.6)	2.7 (0.3)	–	–	–
PSS4	Réunion	67.1 (5.6)	39.8 (10.3)	49.7 (12.5)	59 (8.3)	46.1 (9.2)	57.7 (0.7)	42.36***	6.12	0.49
TO10	Indonesia	58.3 (3.1)	1 (1)	–	–	–	37.9 (0.8)	131.40***	–	0.71
	Réunion	87.5 (0.8)	68.4 (4.9)	77.2 (7.8)	84.6 (1.4)	78.7 (5.4)	77.3 (0.5)	25.00***	–	0.38
CFBP2957	Réunion	45.3 (8.3)	3.8 (1.4)	13.1 (3.9)	31.7 (6.3)	8.8 (3.4)	23.7 (0.7)	133.13***	12.68	0.73
CFBP3059	Réunion	56.1 (10.1)	4.1 (2)	23.4 (6.6)	35.9 (13.1)	9.9 (5.5)	26.4 (1)	94.94***	98.56***	0.48
CMR34	Réunion	16 (1.7)	11.4 (1.3)	14.5 (3.3)	13.5 (2.4)	11.3 (1.1)	12.9 (0.4)	NS	NS	–

Variance components and heritability are indicated for the eggplant RIL population. Symptoms with CFBP2957, CFBP3059, CMR34, and PSS4 strains were evaluated across two seasons. ^aP1 and P2 are the MM738 and the AG91-25 parental lines, respectively. ^bV.F is the estimated variance between RIL families and V.F $\times$ S is the estimated variance of RIL families $\times$ seasonal interaction. Values are not significant (NS) or significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. ^c h^2 , broad-sense heritability. ^dData combined for strains GM11000, PSS366, and CMR134.

TABLE 4 | QTLs of resistance to three phylotype-I strains of *R. solanacearum* species complex (GMI1000, PSS366, CMR134), detected by Simple Interval Mapping in eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population for the Waudpc variable.

Strain	LG ^a	Chr. ^b	QTL ^c	Binary model				Non-parametric model			
				Location ^d (cM)	Nearest marker	95% CI ^e (cM)	LOD	Location ^d (cM)	Nearest marker	95% CI ^e (cM)	LOD
GMI1000	9	E09	EBWR9	106.4	r19023	106.4–106.8	16.5	106.5	COX067a	106.4–106.9	19.5
PSS366	9	E09	EBWR9	106.4	r19023	106.4–106.8	16.5	106.5	COX067a	106.4–106.9	23.9
CMR134	9	E09	EBWR9	106.5	r52478	106.4–106.7	13.9	106.4	r19023	106.4–106.7	21.4
Grouping	9	E09	EBWR9	106.4	r19023	106.4–106.8	16.5	106.5	COX067a	105.8–106.9	13.1

QTL analysis was carried out for individual strains, as well as for their combined data (Grouping). ^aLinkage group. ^bChromosome corresponding to linkage group. ^cName of the QTL: eggplant bacterial wilt resistance (EBWR) followed by linkage group number. ^dPosition of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM). ^eBayesian confidence interval.

Composite Interval Mapping indicated the presence of another resistance QTL on linkage group 14 (E05) (Table 5), which was effective against strains CFBP2957 and CFBP3059. For the CFBP2957 strain, a maximum LOD score of 16.3 was observed at 3.0 cM. For the CFBP3059 strain, a maximum LOD

score of 27.1 was observed at 8.0 cM. The position of maximum LOD differed slightly according to the strain. However, as the confidence intervals overlapped, the QTL is assumed to be the same and was named *EBWR14*. This QTL was also detected in the analyses season per season, with a maximal LOD position

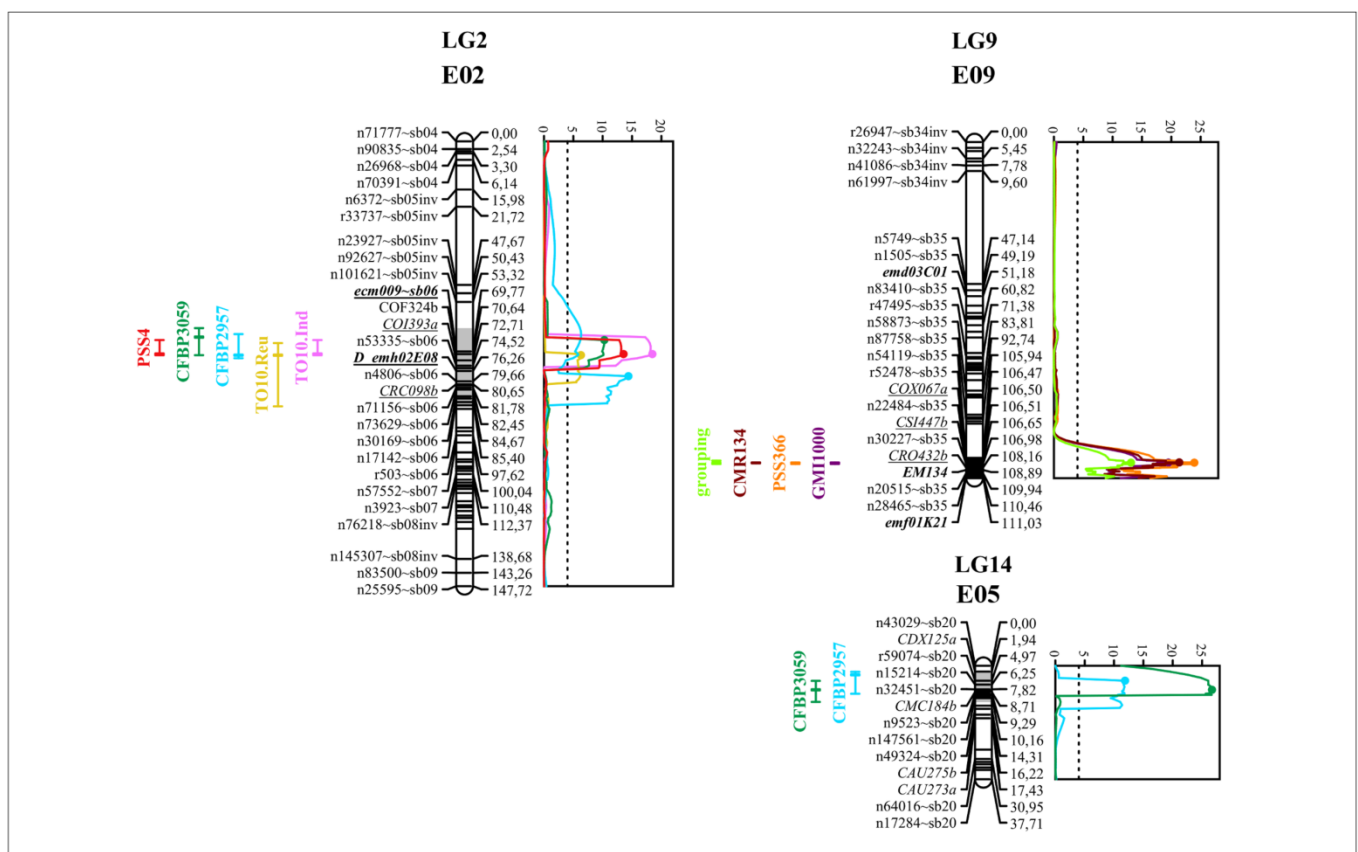


FIGURE 3 | Graphs of LOD scores, and intervals of *EBWR2*, *EBWR9*, *EBWR14* resistance QTLs to *R. solanacearum* species complex positioned on their respective linkage group and chromosome (LG2-E02, LG9-E09, and LG14-E05). Strains controlled by *EBWR2*, *EBWR14*, *EBWR9* QTLs are indicated on the left of each LG. Eggplant/tomato synteny blocks are indicated as “~sb” at the end of each marker name. Lebeau et al. (2013) markers, linked to resistant QTLs, are underlined. Markers in bold are SSRs. QTL intervals are indicated on the left of each linkage group (LG); LOD curves are plotted on the right of each linkage group (LG). QTL intervals and LOD curves were obtained using CIM for combined seasons (strains CFBP2957, CFBP3059, and PSS4) and individual assays (strains TO10.Indonesia and TO10.Réunion). QTL intervals and LOD curves were obtained with SIM method (strains GMI1000, PSS366, and CMR134) on an individual as well as combined basis. LOD curves were obtained before refining the QTL position with refineqtl R command, whereas QTL intervals were obtained after the refineqtl command.

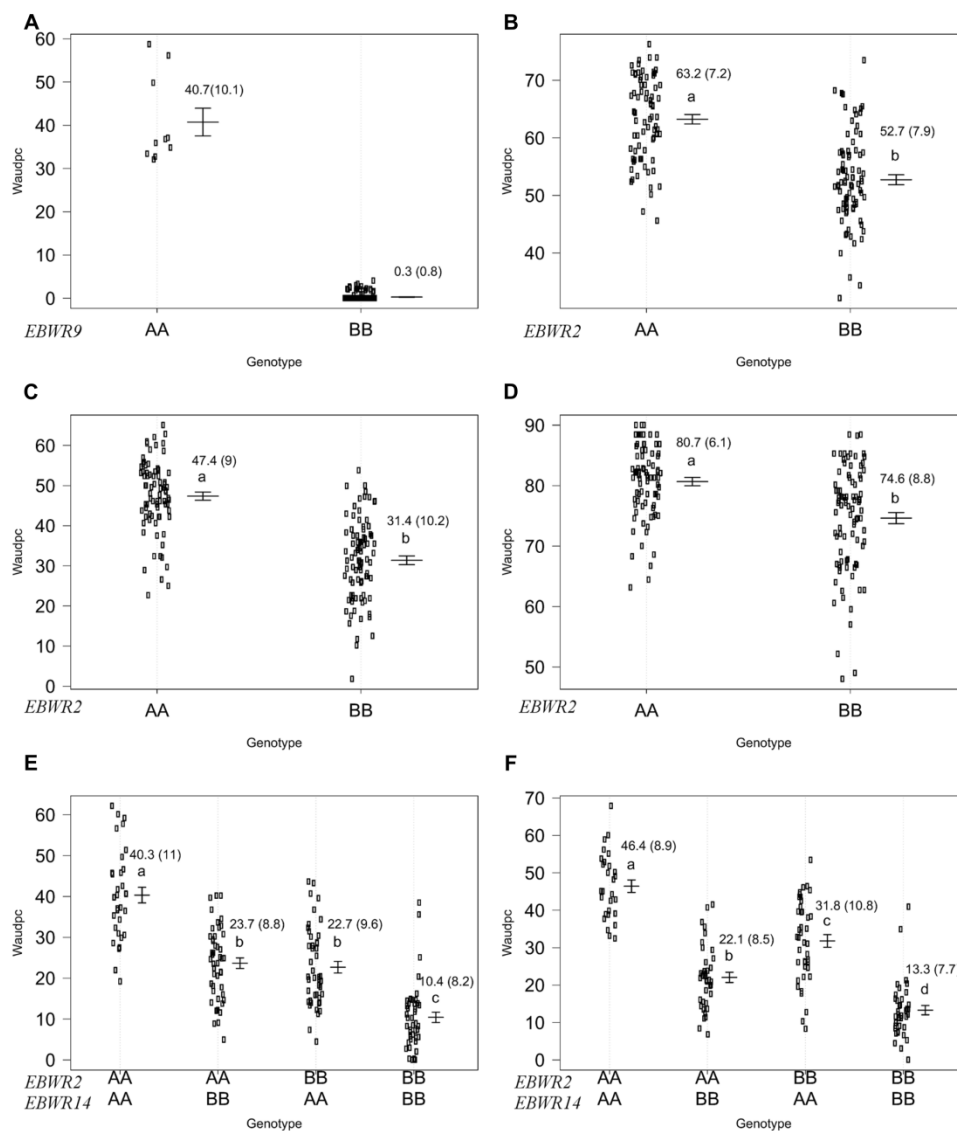


FIGURE 4 | Phenotypic distribution of genotypes at three eggplant bacterial wilt resistance QTLs for the Waudpc variable. Allelic effects (allele “A” of susceptible parent P1 and “B” of resistant parent P2) are plotted with the “effectplot” module of R/qtl package at: - *EBWR9* locus, combined data of GM1000, PSS366, and CMR134 strains (**A**); - *EBWR2* locus, strain PSS4 (**B**); strain TO10.Indonesia (**C**); strain TO10.Réunion (**D**); - *EBWR2/EBWR14* loci, strain CFBP2957 (**E**); strain CFBP3059 (**F**). Means of Waudpc, standard errors (in brackets) and allelic effects ranking (ANOVA followed by LSD test, 95% confidence interval) are indicated. LSD test was not conducted for *EBWR9* locus due to its group’s imbalanced number of RILs. Allelic effects for Waudpc are presented at marker r19023 for *EBWR9*, marker ecm009 for *EBWR2* and at n32451 for *EBWR14*. Heterozygous genotypes are not presented here, as they are very rare in the near fixed RIL population.

varying from 3 to 12 cM (Supplementary Table S4). This QTL explains 26.1 and 49.6% of the phenotypic variance with the CFBP2957 and CFBP3059 strains, respectively. Thus, it was considered to be a major QTL. The additive effect of the QTL was further analyzed by comparing genotypes homozygous for the P1 (susceptible) allele “A” and homozygous for P2 (resistant) allele “B” at the n32451 marker. The LSD test applied to Waudpc indicated a significant difference (P -value < 0.05) between genotypes “AA” and “BB” (Supplementary Table S5). As indicated by the negative additive effect, the resistance-conferring

allele of *EBWR14* originated from the resistant parental line P2 (AG91-25).

Another QTL (Table 5) was detected by CIM on linkage group 2 (E02) for strains CFBP3059, CFBP2957, TO10, and PSS4 (Waudpc). Maximum LOD was positioned between 65 and 71 cM, and the LOD scores varied from 6.3 to 18.5 (Table 5). This QTL explains Waudpc phenotypic variance for TO10.Indonesia (38.3%), TO10.Réunion (14.9%), CFBP2957 (27%), CFBP3059 (12.8%), and PSS4 (30.8%). For each strain, the additive effect is always negative: this indicates that the resistance comes

from the P2 resistant parent. A significant difference between genotypes “AA” and “BB” for Waudpc was found at this QTL (P -value < 0.05, Supplementary Table S5) for strains PSS4 (Figure 4B), TO10.Indonesia (Figure 4C), and TO10.Réunion (Figure 4D). As the LOD curve on linkage group 2 displays two peaks between 50 and 80 cM (Figure 3), the presence of a second QTL was checked using the stepwise procedure implemented in R/qtl. However, no other QTL was found on LG2 (data not shown). Thus, we concluded that only one QTL, called *EBWR2*, was present. It co-localizes with *ecm009* and *COI393a* markers, which are reported by Lebeau et al. (2013) to be linked to the QTL effective against PSS4 strain. Our results confirm the presence of this QTL and demonstrate that it is broad-spectrum because it is also effective against three other strains (TO10, CFBP2957, and CFBP3059).

Strains CFBP3059 and CFBP2957 are controlled by both *EBWR2* and *EBWR14* loci (Table 5). No significant epistatic digenic interaction between *EBWR2* and *EBWR14* was found (fitqtl function of R/qtl). For both strains, the RIL group that is homozygous for P2 resistant alleles at both *EBWR2/EBWR14* loci (i.e., allele “B” at *EBWR2* and “B” at *EBWR14*, i.e., genotypes BB/BB) display significantly lower Waudpc means (Figures 4E,F and Supplementary Table S5) than the group with only one resistant allele at any locus (genotypes BB/AA or AA/BB). The latter genotypes do not differ from each other for the CFBP2957 strain (Figure 4E). In contrast, for strain CFBP3059 (Figure 4F and Supplementary Table S5), genotypes AA/BB display a significantly lower Waudpc means than genotypes BB/AA.

Lastly, the present study did not detect a QTL controlling the strain CMR34 in any of the analyses carried out (CIM or stepwise method; and regardless of whether the seasons were considered separately or together).

In short, QTLs analyses identify three QTLs in the RIL population. *EBWR9* has a major effect but is only detected with three strains (GMI1000, PSS366, and CMR134) belonging to the phylotype I. *EBWR2* and *EBWR14* are both involved in the resistance to strains CFBP2957 and CFBP3059, but they do not interact. *EBWR2* is the sole QTL detected with PSS4 and TO10 strains. Lastly, no QTL controls CMR34.

Anchoring Resistance QTLs on the Tomato Physical Map

The three different QTLs of resistance to RSSC were mapped on the eggplant genome thanks to the anchor SNPs from our new linkage map. The corresponding eggplant/tomato synteny blocks were assigned according to the position of eggplant contigs (Hirakawa et al., 2014). The corresponding tomato physical positions are from the latest SL2.50 tomato genome version. The physical position on the older SL2.40 tomato genome version can be found in Supplementary Table S3, as all eggplant contigs were anchored on this genome version by Hirakawa et al. (2014). *EBWR9*, the major QTL controlling strains GMI1000, PSS366, and CMR134, was located on a section of eggplant and tomato Chr. 9, matching eggplant/tomato synteny block 35. According to the largest confidence interval obtained from QTL analysis (105.8 to 106.9 cM), *EBWR9* is located approximately between 69.4 and 70.5 Mbp on tomato Chr. 9.

EBWR14, the major QTL that controls the strains CFBP2957 and CFBP3059, was located on a section matching eggplant Chr. 5 and tomato Chr. 12. This section is part of the synteny block 20 (Figure 3 and Supplementary Table S3). The *EBWR14* confidence interval varies from 2 to 12 cM, depending on the strains (CFBP2957 and CFBP3059). This second section matches the 64.4–66.9 Mbp region of the tomato Chr. 12.

Broad spectrum QTL *EBWR2*, which controls strain PSS4, TO10, CFBP2957, and CFBP3059, was located on the eggplant and tomato Chr. 2, corresponding to the eggplant/tomato synteny blocks sb05inv and sb06 (Figure 3 and Supplementary Table S3). The *EBWR2* confidence interval varies from 61 to 79 cM and corresponds to a physical interval of 38.3 to 45.9 Mbp of the tomato Chr. 2. However, the presence of two large gaps and the lack of anchor markers in the QTL interval complicate the definition of its physical interval.

Thanks to the dense and anchored eggplant genetic map that we set up, the three QTLs of resistance to RSSC were located at physical sections on the eggplant/tomato synteny blocks. *EBWR2* and *EBWR14* are still positioned with a large interval; the densification of good quality markers associated to these QTLs is necessary before conducting a candidate gene approach. On

TABLE 5 | QTLs of resistance to four strains of *R. Solanacearum* species complex, detected by Composite Interval Mapping and Haley–Knott regression model in eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population for the Waudpc variable.

Strain	Location	LG ^a	Chr. ^b	QTL ^c	Location ^d (cM)	Nearest marker	95% CI ^e (cM)	LOD	R ^{2f}	Total R ^{2g}	Add effect ^h
PSS4	Réunion	2	E02	<i>EBWR2</i>	70.6	COF324b	66.0–71.0	13.6	30.8	30.8	–5.2***
TO10	Indonesia	2	E02	<i>EBWR2</i>	70.6	COF324b	66.0–71.0	18.5	38.3	38.3	–7.8***
	Réunion	2	E02	<i>EBWR2</i>	71.0	COF324b	67.0–88.0	6.3	14.9	14.9	–3.3***
CFBP2957	Réunion	2	E02	<i>EBWR2</i>	71.0	COF324b	64.0–72.0	16.7	27.0	49.4	–7.3***
		14	E05	<i>EBWR14</i>	3.0	CDX125a	2.0–9.3	16.3	26.1		–7.3***
CFBP3059	Réunion	2	E02	<i>EBWR2</i>	65.0	<i>ecm009</i>	62.0–71.0	9.3	12.8	58.8	–6.2***
		14	E05	<i>EBWR14</i>	8.0	n32451	5.0–12.0	27.1	49.6		–10.4***

QTL analysis was carried out on two seasons combined data for PSS4, CFBP2957, CFBP3059 and CMR34 strains, and for individual location for TO10 strain. ^aLinkage group. ^bChromosome corresponding to linkage group. ^cName of the QTL: eggplant bacterial wilt resistance (*EBWR*) followed by the linkage group number. ^dPosition of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM). ^eBayesian confidence interval. ^fR²: Estimates of the proportion of phenotypic variance (percentage) explained by the QTL detected. ^gEstimate of the total proportion of phenotypic variance explained by the additive model. ^hAdditive effect: Positive values mean that the resistance allele comes from the P1 (MM738) parent, while negative values mean that the resistance allele comes from the P2 (AG91-25) parent.

the contrary, the *EBWR9* locus is saturated with markers and adding new markers will not help narrow the interval. Therefore, we immediately decided to look for candidate genes within the *EBWR9* locus.

Physical Interval Containing *EBWR9* QTL and Search for Candidate Genes

Markers positioned at the *EBWR9* locus were reorganized according to their physical position on the eggplant/tomato synteny block 35. Among the 170 phenotyped and genotyped RILs, 151 had a fixed haplotype with the P2 (AG91-25) resistant allele (B), seven had a fixed haplotype with the P1 (MM738) susceptible allele (A), eight had heterogeneous regions (heterogeneous inbred families, HIFs) and only four families had fixed recombinant haplotypes (Table 6). Resistant families (phenotype R) should be homozygous for the “B” allele (light gray box), whereas susceptible families (phenotype S) should be homozygous for the “A” allele (black boxes) at the *EBWR9* locus. Accordingly, *EBWR9* was positioned between the Sme2.5_00457.1 and Sme2.5_00934.1 contigs of eggplant. This region spans a physical distance of 1.8 Mbp between 69.40 and 71.17 Mbp of tomato Chr. 9, corresponding to 3.0 Mbp of the potato Chr. 9. Among the eight HIFs, four have a resistant phenotype and are homozygous for the P2 “B” allele within the refined locus limits (Table 6). The four other RIL families segregated for these markers included two that were resistant and two that were susceptible.

Seven R-gene analog (RGA) fragments of the P1 (MM738) transcriptome were found in the LG9-*EBWR9* refined region. The list of the transcripts and their corresponding tomato orthologous genes are described in Table 7. Only two genes of the NBS-LRR class were found in the region, the singlet_11792 on Sme2.5_04376.1 and the singlet_6456 on Sme2.5_00239.1. The singlet_40855, matching the tomato Solyc09g091260.2 RLK gene, was found on eggplant contig Sme2.5_00507.1. The singlet_57090 and singlet_10906, mapped on the same eggplant contig Sme2.5_00341.1 probably belong to the same gene and correspond to two different exons of the RLK tomato Solyc05g009040.2 gene. Both Singlet_34133 and singlet_13069, mapped on the Sme2.5_00934.1 contig, probably belong to another RLK gene, very similar to the tomato Solyc09g091990.2 gene. All seven transcripts listed in the table had different SNP alleles and predicted genes products between the MM738 and AG91-25 parental lines (Supplementary Table S6). Moreover, all the eggplant contigs listed in Table 7 contain markers that have been mapped on LG9: Sme2.5_04376.1 contains n93417, which is mapped at 106.33 cM; Sme2.5_00239.1 contains r8676, n14281, n9304, n62318, and r8690, which are mapped, respectively, at 106.22, 106.26, 106.61, 106.69, and 106.79 cM; Sme2.5_00507.1 contains n59329, mapped at 105.83 cM; Sme2.5_00341.1 contains n53260 mapped at 107.22 cM, Sme2.5_00934.1 contains n52528 and n136813 mapped, respectively, at 107.73 and 107.04 cM (Supplementary Table S3). Thus, we can assume that the five candidate genes described in Table 7 are all co-segregating with the major QTL *EBWR9*. Only one RGA gene (Solyc09g091400.2), found in the tomato transcriptome, which matches the locus

EBWR9 in eggplant, is absent (not expressed) in the P1 parent (MM738) transcriptome. This gene is a member of the RLK family and could be considered as a candidate gene for BW-resistance in eggplant. Finally, RGA genes were not specifically present in *EBWR9* locus of the resistant parent P2.

Ralstonia solanacearum species complex resistance genes *RRS1*, *RPS4*, *ERECTA*, *RD19* and *wat1* in *A. thaliana* and *RE-bw* in *S. melongena* were mapped on tomato and eggplant genomes with the Blastn tool. No significant hits were found for the *RRS1* and *RPS4* genes. *ERECTA* had a significant hit on Sme2.5_05203.1 of the eggplant Chr. 8 and on the tomato Chr. 8 at 49 Mbp. *RD19* had a significant hit on the Sme2.5_00650.1 of the eggplant Chr. 1 and on the tomato Chr. 1 at 96.8 Mbp. Two significant hits were found for *RE-bw* on tomato chromosomes: one on Chr. 11 at 55.3 Mbp and the other on Chr. 8 at 2.2 Mbp. Best significant hits ($E\text{-value} > 1 \times 10^{-30}$) for *RE-bw* were found on the eggplant contigs Sme2.5_05713, Sme2.5_01979.1, Sme2.5_00683.1, Sme2.5_16002.1 (chromosome E12/syntenic block sb54inv), Sme2.5_15564.1 (E11/sb46inv), Sme2.5_08973.1, Sme2.5_13120.1 (E12/sb55inv) and Sme2.5_08697.1 (E01/sb01). The *wat1* gene gave one significant hit on the Sme_00003.1 of eggplant Chr. 4 and one significant hit on the tomato Chr. 4 at 65 Mbp.

Based on these results, none of the RRSC resistance genes cloned so far significantly hit the *EBWR9* E09/sb35 region.

DISCUSSION

A New Dense Anchored Map of the [MM738 × AG91-25] RIL Population

The map of the intraspecific RIL population previously published consisted of 119 markers spread over 18 linkage groups. The markers were mainly AFLP and the map could not be traced back to the 12 chromosomes of tomato or eggplant. Thanks to the use of GBS, this map has been significantly improved. With 867 new SNPs, it is now anchored on the physical chromosomes of tomato and potato. The large number of sequenced loci resolved the initial problem of low polymorphism. The anchor SNPs are positioned on 50 of the 56 reference eggplant/tomato synteny blocks. Thus, we assume that this map provides a comprehensive overview of the eggplant genome. GBS usually produces a great deal of missing data, particularly when using an effective cutting enzyme, such as ApeKI. However, the genetic map is almost consistent with the physical order of markers on eggplant and tomato chromosomes, apart from a few inconsistencies for the position or order of some markers. The map still has some large gaps, particularly two that are close to *EBWR2*. In future, markers should be added to these regions to ensure greater density coverage and finer mapping of this broad-spectrum QTL.

Distorted markers occurred in some chromosomal regions, particularly on Chr. 8 and 9. Segregation distortions are frequently observed in mapping populations and the amount of distorted markers has been correlated to the taxonomic divergence between parental lines (Zhang et al., 2003). P2 (AG91-25), the resistant parent of the RIL population, is a line that comes from a complex breeding program involving one

TABLE 6 | Fine physical position of *EBWR9*, an eggplant major resistance QTL to 3 phyto-type-I strains.

Linkage Map	Position (cM)	Position of significant blast (Mbp) on chromosome 9	Families with P2 allele	Families with fixed recombinant haplotypes				Families with P1 allele	Heterogeneous inbred families (HIF)										No. F ^a	Waudpc ^b
				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Marker		SME_r2.5.1 eggplant contig	SL2.50 tomato genome	ST4.03 potato genome	151	0.3 ± 0.7	0.0	0.0	0.0	34.8	40.5 ± 9.9	4.1	0.0	3.3	0.0	0.0	32.7	0.0	56.1	
r52235	105.65	Sme2.5_06621.1	69.26	55.80																
n88110	105.75	Sme2.5_00457.1	69.40	55.93																
n53141	106.34	Sme2.5_00962.1	69.64	56.40																
n22484	106.51	Sme2.5_00926.1	69.85	NA																
n71272	106.93	Sme2.5_02724.1	70.42	57.53																
n45326	106.91	Sme2.5_07637.1	70.47	57.61																
n9704	106.75	Sme2.5_09044.1	70.76	58.34																
n30227	106.98	Sme2.5_09651.1	71.08	58.78																
n52528	107.73	Sme2.5_00934.1	71.17	58.96																
n23218	110.05	Sme2.5_05618.1	71.37	59.43																
r39751	109.50	Sme2.5_03583.1	NA	59.96																
r3542	109.56	Sme2.5_00066.1	71.83	NA																
n43702	109.42	Sme2.5_01863.1	72.09	61.05																
n76414	109.57	Sme2.5_03596.1	72.15	61.13																

RILs were grouped according to their genotypes for 14 markers: light gray boxes represent genotypes "BB" homozygous for the P2 (AG91-25) resistant allele; black boxes represent genotypes "AA" homozygous for the P1 (MM738) susceptible allele; gray hatched boxes represent putative heterogeneous regions (haplotypes are unclear, displaying "AB," "AA," or "BB" genotypes depending on the markers. This indicates that the families segregate in the region, i.e., heterogeneous inbred families). Lines written in bold represent the markers flanking the physical interval of *EBWR9*. ^aNumber of RILs in each haplotype group. ^bMean Waudpc for each haplotype group. ^cR for resistant groups (Waudpc < 10) and S for susceptible groups (Waudpc > 10).

accession of *S. aethiopicum* Aculeatum Group (resistant to BW) and several *S. melongena* accessions (Ano et al., 1991). We assume that *EBWR9*, the major resistance QTL on Chr. 9, is probably positioned on an *S. aethiopicum* introgressed segment. This introgression could explain the higher polymorphism and the segregation distortion rate in this region. In future, the species origin of the chromosomal segment harboring *EBWR9* could be confirmed by comparing the transcriptome of P2 (AG91-25) to the reference transcriptomes of *S. melongena* (Hirakawa et al., 2014) and *S. aethiopicum* (Gramazio et al., 2016).

RSSC Resistance of AG91-25 Is a Complex System with Both a Major Specific QTL and Broad-Spectrum QTLs

Three QTLs controlling resistance to RSSC were identified in the [MM738 × AG91-25] RIL population. The first QTL, *EBWR9*, located on Chr. 9, matches the major gene *ERs1* (Lebeau et al., 2013). *EBWR9* is detected with GMI1000, PSS366, and CMR134 (phylogroup I strains). The Waudpc variable controlled by this QTL has a qualitative distribution, which suggests a monogenic control of the resistance. This QTL has a very strong effect: all RIL lines with the resistant parent allele (B) are highly resistant. The QTL was not detected with the virulent PSS4 and TO10 (also phylogroup I strains), nor with strains belonging to other phylogroups (CFBP2957, CFBP3059, and CMR34). This result suggests a possible phylogroup-specificity of *EBWR9*, together with a strain-specificity within phylogroup I. A relationship between BW-resistance QTLs and phylogroups has already been proposed in tomato (Carmeille et al., 2006). Two major QTLs, *bwr-6* and *bwr-12*, were identified in this study. The moderate effect of *bwr-6* on a large spectrum of strains suggested that several phylogroups were controlled. The major effect of *bwr-12* seemed to be phylogroup I-specific. Therefore, we suggest that there are probable similarities between eggplant and tomato BW-resistance mechanisms.

The second major QTL that we identified in the RIL population, *EBWR14*, is positioned on eggplant Chr. 5. Interestingly, *EBWR14* is located in a region of tomato Chr. 12 on the same chromosome as *bwr-12*. However, *bwr-12* was located between the SLM12-10 and SML12-2 markers

(Carmeille et al., 2006; Wang et al., 2013), within a physical region between 2.78 and 3.30 Mbp. This region belongs to the eggplant/tomato synteny block 51. As *EBWR14* is located on synteny block 20, both QTLs are distinct, although they are located on tomato Chr. 12.

The third QTL, *EBWR2*, positioned on Chr. 2, partially controls strains belonging to phylogroups I (strains PSS4, T010), phylogroup IIA (CFBP2957) and phylogroup III (CFBP3059). It is not detected with three other phylogroup I strains (GMI1000, PSS366, and CMR134). Its effect is minor or intermediate, depending on strains and environmental conditions. Its confidence interval is large (61–79 cM) and varies depending on the strains. The two peaks in the LOD curves indicate that the presence of two closed QTLs is highly likely. Interestingly, Lebeau et al. (2013) detected one or two QTLs on eggplant LG13 (matching Chr. 2 in our study), depending on the analysis method used (SIM and CIM, respectively). In tomato, a QTL with a large confidence interval was subdivided into two QTLs, each acting at different stages of the infection (Mangin et al., 1999). Coupled QTLs such as this, for which the maximum LOD score is located between the two QTLs, have been reported as “ghost QTLs” (Martinez and Curnow, 1992; Broman and Speed, 1999). We used the stepwise automated procedure of R/qtl (multiple QTL mapping method) to prevent the “ghost” QTL detection. However, we did not detect the presence of a second QTL on Chr. 2. The existence of a second QTL could be checked in future, after the region has been densified with high quality markers (Nilsson et al., 1999; Li et al., 2010; Stange et al., 2013), developed from Kompetitive Allele Specific PCR (KASP; Semagn et al., 2014) or high resolution melting PCR (HRM; Gundry et al., 2003). The size of the mapping population could also be a major limitation to resolve linked QTLs and should be increased in future research.

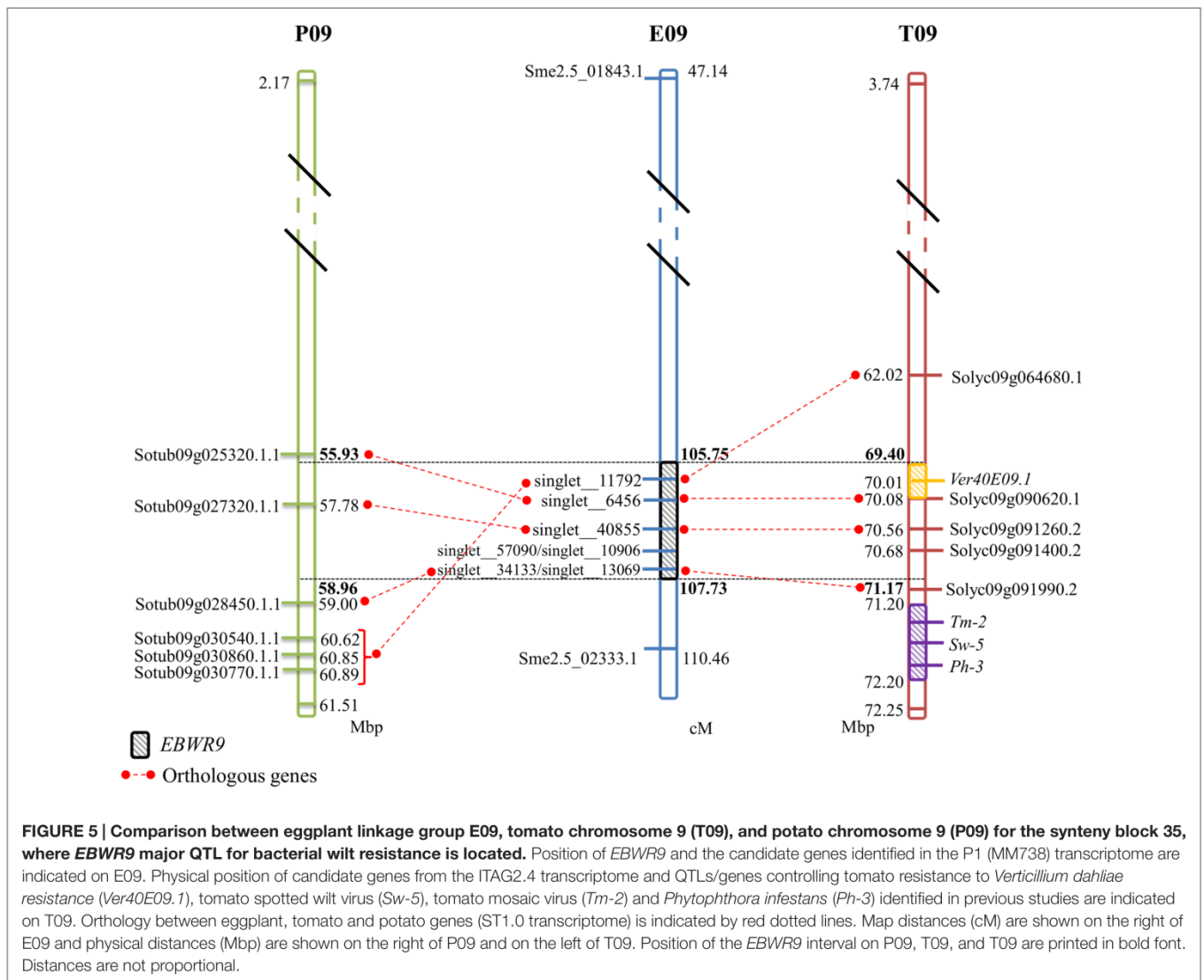
EBWR9, Close to a Hot Spot of Resistance Genes, Is Distinct from RSSC Resistance Cloned Genes

No significant hits were found between *EBWR9* and known BW-resistance genes. However, at this extremity of the long arm of Chr.9, three other resistance loci have been reported in tomato.

TABLE 7 | List of putative candidate genes for resistance to bacterial wilt retrieved from the eggplant P1 (MM738) parental line transcriptome in the *EBWR9* physical region and their positions on the eggplant genome.

Position of MM738 transcripts on the SME_r2.5.1 eggplant genome				Significant hit on the tomato genome			
Transcript ID ^a	Eggplant genome contig ID	Position start	Position end	Tomato gene ID	Identity (%)	Blast e-value	Gene class
singlet__11792	Sme2.5_04376.1	2044	2462	Solyc09g064680.1	83.82	4.0×10^{-27}	NBS-LRR
singlet__6456	Sme2.5_00239.1	117683	116834	Solyc09g090620.1	86.83	1.0×10^{-146}	CC-NBS-LRR
singlet__40855	Sme2.5_00507.1	98065	103689	Solyc09g091260.2	93.64	0.0	RLK
singlet__57090	Sme2.5_00341.1	1051	1487	Solyc05g009040.2	90.11	1.0×10^{-147}	RLK
singlet__10906	Sme2.5_00341.1	1632	2123	Solyc05g009040.2	92.67	0.0	RLK
singlet__34133	Sme2.5_00934.1	41969	42396	Solyc09g091990.2	95.48	1.0×10^{-163}	RLK
singlet__13069	Sme2.5_00934.1	43828	42504	Solyc09g091990.2	91.40	0.0	RLK

The corresponding orthologs genes found in the tomato transcriptome ITAG2.4 are indicated. ^aTranscripts from P1 (MM738) susceptible parent.



They confer resistance against tomato spotted wilt virus (*Sw-5*), tomato mosaic virus (*Tm-2*) and *Phytophthora infestans* (*Ph-3*). *Sw-5* and *Tm-2* have been located between 71.2 and 72.2 Mb and *Ph-3* between 71.4 and 71.5 Mb on the tomato Chr. 9 (Zhang et al., 2013, 2014; Andolfo et al., 2014; Panthee et al., 2015). We located *EBWR9* between 69.40 and 71.17 Mbp, just before the cluster of *Sw-5*, *Tm-2*, and *Ph-3* resistance genes (Figure 5). Furthermore, *EBWR9* was mapped at the same physical position as the minor QTL for *Verticillium dahliae* resistance (*Ver20E09.1*, located at 70.14 Mbp on tomato; Toppino et al., 2016). The population used for mapping *V. dahliae* resistance derives from a cross between the *S. melongena* susceptible 67/3 line and the 305E40 resistant line, which has an *S. aethiopicum* ancestor in its pedigree similar to our P2 (AG91-25) (Ano et al., 1991). These results suggest that the *EBWR9* and *Ver20E09.1* *V. dahliae* resistance QTLs could be the same and may both originate from an *S. aethiopicum* introgression fragment.

Overall, these results suggest that the ends of tomato and eggplant Chr. 9 are enriched in disease resistant genes.

This region is, therefore, of special interest for breeding cultivars resistant to diverse pathogens.

A First Step toward Cloning *EBWR9*

The region harboring *EBWR9* major QTL is distorted in favor of P2's resistant allele "B" (AG91-25). In this region, genetic and physical orders display some discrepancies. To reduce the QTL interval, we rearranged the markers according to their physical position and refined the confidence interval by comparing phenotypes from the haplotype groups. The physical position of *EBWR9* was defined within a 1.77 Mbp interval on tomato Chr. 9. In this interval, we did not found RGA which are uniquely expressed in the resistant line P2. However, the published transcriptome of the susceptible line P1 (Sarah et al., 2016) enables the detection of seven transcripts encoded by this region, five of which correspond to RGA, which significantly hit the tomato transcriptome. All five genes are expressed in both P1 (MM738) and P2 (AG91-25), but their alleles differ. Four of them are located on the eggplant/tomato syntenic block 35

and two below the *EBWR9* region (Figure 5). Each transcript contains non-synonymous substitutions which induce variation in the predicted resistance protein. Therefore, they are candidate genes for BW-resistance in eggplant. In future, it should be possible to determine the differential expression of the five genes during GMI1000 strain infection, by using quantitative reverse transcription-PCR to test whether or not they are involved in defense mechanisms. However, a candidate gene found in the tomato transcriptome is absent from the eggplant transcriptome. The expression of resistance genes is not always constitutive. Resistance genes can be induced or drastically up-regulated after the plant has recognized the pathogen (Yoshimura et al., 1998; Levy et al., 2004). Moreover, 13% of the 237 tomato genes found inside the *EBWR9* locus are not annotated. Thus, our list of candidate genes is not exhaustive and will probably be enlarged in future.

Heterogeneous inbred families, i.e., RILs with residual heterozygosity at the *EBWR9* locus, will be used for fine mapping the putative resistance gene(s) via the creation of near isogenic lines (NILs) (Tuinstra et al., 1997; Yeri et al., 2014). Four HIFs from our RIL population are particularly interesting because their heterogeneity within the refined *EBWR9* locus will make it possible to reduce the physical interval of *EBWR9*. Even if only five candidate genes have been found in the *EBWR9* region, their number must be reduced in order to characterize the gene underlying the *EBWR9* QTL. A number of the 41 SNPs, identified within the *EBWR9* physical interval, deserve to be validated by using the KASP or HRM SNP genotyping system so that they can subsequently be used on the NILs for fine mapping. New SNPs residing in the five RGA could also be designed from their transcriptomic sequences and fine mapped in the HIFs.

Breeding for Broad Spectrum and Durable Resistance to RSSC

Strains of RSSC have a worldwide distribution and exhibit a very large host range. Eggplant has the disadvantage of being a potential host for strains belonging to the four phylotypes of RSSC. Thus, in order to breed eggplant for resistance to BW, we need to further our understanding of the molecular and genetic bases of resistance controlling the diversity of RSSC strains. We dissected the BW-resistance of the P2 (AG91-25) line, by mapping its resistance factors in a RIL population. Three resistance QTLs control strains belonging to one or more phylotypes. *EBWR9* provides the highest level of resistance, although its range of efficiency is limited to phylotype I strains (GMI1000, PSS366, and CMR134). *EBWR2* has the largest range of efficiency because it is effective against strains of phylotypes I (PSS4 and TO10), IIA (CFBP2957) and III (CFBP3059). *EBWR14* only controls strains of phylotype IIA and III. Therefore, both *EBWR2* and *EBWR14* are useful for breeding resistant varieties in areas where phylotypes IIA and III are present. Our phenotyping tests were carried out under greenhouse conditions with very high inoculation pressure. Therefore, we may have under-estimated the efficiency of both QTLs in real cropping conditions. Furthermore, assays conducted with TO10 strain in two different places (greenhouses in Indonesia and

Réunion Island) revealed a strong interaction between phenotype (P) $\times$ environment (E). The P2 (AG91-25) parent showed different phenotypes, while the P1 (MMM738) parent remained susceptible in both environments. The environmental influence on P2 resistance mechanisms was also detected in QTL analysis. In Indonesia, *EBWR2* was detected from day 14 after the inoculation (dai) until the end of the assay. However, in Réunion, *EBWR2* was only detected between 7 and 14 dai (data not shown). These results cannot be correlated to the inoculum pressure given that the quantity of bacterium delivered in each plant was superior in Indonesia than in Réunion. The results underline the importance of conducting breeding programs in real environmental conditions. By combining *EBWR2*, *EBWR14*, and *EBWR9*, breeders could obtain cultivars with a large spectrum of BW-resistance. Despite the medium-term risk of the emergence of strains that bypass the major resistance controlled by *EBWR9*, this QTL is of immediate value for breeders because it can easily be introgressed in commercial cultivars using Marker Assisted Selection. However, we advise combining *EBWR9* with other major genes or QTLs for resistance in order to avoid rapid resistance breakdown (Brun et al., 2010; Djian-Caporalino et al., 2014; Barbary et al., 2016). Furthermore, *EBWR9* has already been demonstrated to be ineffective against at least two strains of phylotype I. Therefore, it is important to identify other sources of resistance in eggplant's natural genetic diversity, with a broader scope in terms of controlling bacteria genetic diversity, which can be used through a pyramiding strategy of resistance genes. To reach this objective, conducting a genome-wide association study on a core collection of eggplant accessions may be an effective way to identify additional loci involved in other sources of resistance.

The high level of resistance conferred by *EBWR9*, together with its strain specificity, suggests the existence of a gene-for-gene relationship of an R/Avr type. Cloning *EBWR9* requires further time-consuming and expensive experiments. The identification of the corresponding avirulence effector is promising, since effectors can be used to determine functional redundancy in plant germplasm. This could help breeders choose complementary sources of resistance (Vleeshouwers and Oliver, 2014). Furthermore, the effectors matching *EBWR9* could be used to find its homologs in Solanaceae in both cultivated and wild germplasm, particularly potato, tomato, and capsicum pepper. In this respect, the ripP2 and ripAX2 are type-III effectors, which are of great interest because of their association with avirulence on AG91-25 (Pensec et al., 2015).

CONCLUSION

A complex polygenic system of resistance based on three BW-resistance QTLs was dissected in the [MMM738 $\times$ AG91-25] RIL population. Thanks to the new densified and anchored linkage map, the physical positions of the QTLs were estimated. The QTL that provides the highest level of resistance is *EBWR9*, which is highly effective against GMI1000, PSS366, and CMR134 phylotype I strains. However, it is ineffective against virulent strains of phylotype I and strains of phylotypes II and III. Two other QTLs were detected, namely *EBWR2* and *EBWR14*.

They drastically reduce wilting symptoms and stem colonization by strains that are not controlled by *EBWR9*, when both resistant alleles are combined. Thus, AG91-25 is an outstanding source of resistance to BW, which should lead to the development of broad-spectrum resistant cultivars. The GBS sequences flanking the QTLs can be used to develop breeder-friendly markers (e.g., using the KASP or HRM method), which are indispensable for a rapid transfer of BW-resistance in commercial cultivars. In addition to their direct applicability to breeding, our results provided the first step toward the cloning of *EBWR9* (previously known as *ERs1*). *EBWR9* is located at the end of Chr. 9, a region reported to be rich in disease-resistance factors. A cluster of R-genes can be found close to its physical interval, but none of them co-localize with *EBWR9*. However, seven transcripts from the susceptible MM738 line, corresponding to five annotated R-genes, were found in this region. These transcripts will be characterized in the near future. Ultimately, our results should (i) provide a better understanding of the interaction between RSSC genetic diversity and eggplant resistance QTLs, (ii) lead to the investigation of the possible R/Avr system involved in AG91-25 resistance, and (iii) contribute to the development of breeding strategies that encourage a sustainable approach to controlling this devastating pathogen.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-CD, BR, EW, and JD designed the study. M-CD produced the mapping population seeds. SS carried out the phenotyping experiments. CS performed transcriptomic experiments. SS, CJ, and CS performed bioinformatics analyses. SS put together the linkage map and conducted the QTL analysis. SS drafted the manuscript. CJ, CS, JD, EW, and M-CD contributed to writing and finalizing the paper. All authors have read and approved the final manuscript.

FUNDING

This research was financially supported by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le

Développement (CIRAD), the Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning through the “RESAUBER” project (CASDAR C-2013-09) and the Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) through the CIFRE PhD. (Grant No. 2013/1477 for SS). This work was also funded by the European Regional Development Fund (ERDF), by the Conseil Régional de la Réunion and by the Conseil Général de la Réunion.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Jean-Michel Baptiste and Sylvain Lebon (CIRAD, La Réunion, France) for their excellent technical work in the greenhouse trials. We also wish to thank Thierry Jaunet and Samabhorn Bhuvitarkorn (HM. Clause Company) for providing the phenotypic data with strain TO10 in Indonesia. We are grateful to David Savio for preparing the seeds for the RIL population. We thank Edith Lallemand, Didier Fontaine, Martial Grondin, Véronique Ledoux, and Emmanuelle Chapier (CIRAD, La Réunion, France) for providing technical assistance in the microbiology experiments, Sami Doganlar and Anne Frary (Izmir Institute of Technology, Urla, Turkey) for their advice on the GBS project, Frédéric Chiroleu (CIRAD, La Réunion, France) for his help with statistical analyses and Olivier Garsmeur (CIRAD, Montpellier, France) for his help with the bioinformatics analysis. We would also like to thank the SouthGreen Bioinformatics Platform (<http://www.southgreen.fr/>) for computational resources and the Plant Protection Platform (3P, IBISA) where phenotyping assays were conducted. Finally, we would like to thank the Global Genetik Teknolojileri Company for preparing the GBS libraries and the Wisconsin Biotech Center for the sequencing work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00828/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Andolfo, G., Jupe, F., Witek, K., Etherington, G. J., Ercolano, M. R., and Jones, J. D. G. (2014). Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biol.* 14:120. doi: 10.1186/1471-2229-14-120
- Andrews, S. (2010). *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Ano, G., Hebert, Y., Prior, P., and Messiaen, C. (1991). A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L × *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11, 555–560. doi: 10.1051/agro:19910703
- Arumuganathan, K., and Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 208–218. doi: 10.1007/BF02672069
- Barbary, A., Djian-Caporalino, C., Marteu, N., Fazari, A., Caromel, B., Castagnone-Sereni, P., et al. (2016). Plant genetic background increasing the efficiency and durability of major resistance genes to root-knot nematodes can be resolved into a few resistance QTLs. *Front. Plant Sci.* 7:632. doi: 10.3389/fpls.2016.00632
- Behera, T. K., and Singh, N. (2002). Inter-specific crosses between eggplant (*Solanum melongena* L.) with related *Solanum* species. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 95, 165–172. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00019-5
- Bernoux, M., Timmers, T., Jauneau, A., Brière, C., de Wit, P. J. G. M., Marco, Y., et al. (2008). RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell* 20, 2252–2264. doi: 10.1105/tpc.108.058685
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Mach. Learning*. 45, 5–32. doi: 10.1023/A:1010933404324
- Broman, K., and Speed, T. (1999). A review of methods for identifying QTLs in experimental crosses. *Lect. Notes-Monogr. Ser.* 33, 114–142. doi: 10.1214/lnms/1215455550
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889–890. doi: 10.1093/bioinformatics/btg112

- Brun, H., Chèvre, A. M., Fitt, B. D., Powers, S., Besnard, A. L., Ermel, M., et al. (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* 185, 285–299. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., et al. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:1. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Carneille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113, 110–121. doi: 10.1007/s00122-006-0277-3
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., and Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22, 3124–3140. doi: 10.1111/mec.12354
- Churchill, G. A., and Doerge, R. W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138, 963–971.
- Daunay, M.-C. (2008). “Eggplant,” in *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*, eds J. Prohens and F. Nuez (New York, NY: Springer), 163–220. doi: 10.1007/978-0-387-74110-9_5
- Denancé, N., Ranocha, P., Oria, N., Barlet, X., Rivière, M., Yadeta, K. A., et al. (2013). *Arabidopsis* wat1 (walls are thin1) mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant J.* 73, 225–239. doi: 10.1111/tbj.12027
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounloham, M., Boucher, C., et al. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8024–8029. doi: 10.1073/pnas.1230660100
- Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D. X., Bittner-Eddy, P., et al. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2404–2409. doi: 10.1073/pnas.032485099
- Deslandes, L., Pileur, F., Liaubet, L., Camut, S., Can, C., Williams, K., et al. (1998). Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 659–667. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.7.659
- Djian-Caporalino, C., Palloix, A., Fazari, A., Marteu, N., Barbary, A., Abad, P., et al. (2014). Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. *BMC Plant Biol.* 14:53. doi: 10.1186/1471-2229-14-53
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., et al. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6:e19379. doi: 10.1371/journal.pone.0019379
- Fegan, M., and Prior, P. (2005). “How complex is the ‘*Ralstonia solanacearum* species complex?’,” in *Bacterial wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (Saint Paul, MN: APS Press), 449–461.
- Genin, S., and Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 67–89. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173000
- Gillings, M. R., and Fahy, P. (1994). “Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex,” in *Bacterial wilt: the Disease and Its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*, eds A. C. Hayward and G. L. Hartman (Wallingford: CAB INTERNATIONAL), 95–112.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H., et al. (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J.* 36, 353–365. doi: 10.1046/j.1365-3113X.2003.01877.x
- Gramazio, P., Blanca, J., Ziarsolo, P., Herraiz, F. J., Plazas, M., Prohens, J., et al. (2016). Transcriptome analysis and molecular marker discovery in *Solanum incanum* and *S. aethiopicum*, two close relatives of the common eggplant (*Solanum melongena*) with interest for breeding. *BMC Genomics* 17:1. doi: 10.1186/s12864-016-2631-4
- Granada, G. A., and Sequeira, L. (1983). A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 67, 1084–1088. doi: 10.1094/PD-67-1084
- Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., Reed, G. H., Pryor, R. J., Chen, J., and Wittwer, C. T. (2003). Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin. Chem.* 49, 396–406. doi: 10.1373/49.3.396
- Haley, C. S., and Knott, S. A. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity (Edinb)* 69, 315–324. doi: 10.1038/hdy.1992.131
- Hallauer, A. R., and Miranda, J. B. (1981). *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Hayter, A. J. (1986). The maximum familywise error rate of Fisher’s least significant difference test. *J. Am. Stat. Assoc.* 81, 1000–1004. doi: 10.1080/01621459.1986.10478364
- Hirakawa, H., Shirasawa, K., Miyatake, K., Nunome, T., Negoro, S., Ohshima, A., et al. (2014). Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world. *DNA Res.* 21, 649–660. doi: 10.1093/dnares/dsu027
- Huet, G. (2014). Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 5:715. doi: 10.3389/fpls.2014.00715
- Kaushik, P., Prohens, J., Vilanova, S., Gramazio, P., and Plazas, M. (2016). Phenotyping of eggplant wild relatives and interspecific hybrids with conventional and phenomics descriptors provides insight for their potential utilization in breeding. *Front. Plant Sci.* 7:677. doi: 10.3389/fpls.2016.00677
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693–695.
- Lahaye, T. (2004). Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci.* 9, 1–4. doi: 10.1016/j.tplants.2003.11.002
- Lander, E. S., and Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121, 185–199.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 10:1. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Lebeau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., et al. (2010). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology* 101, 154–165. doi: 10.1094/phyto-02-10-0048
- Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M. C., Wicker, E., Chirleu, F., Prior, P., et al. (2013). Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126, 143–158. doi: 10.1007/s00122-012-1969-5
- Levy, M., Edelbaum, O., and Sela, I. (2004). Tobacco mosaic virus regulates the expression of its own resistance gene N. *Plant Physiol.* 135, 2392–2397. doi: 10.1104/pp.104.044859.2392
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, H., Hearne, S., Banziger, M., Li, Z., and Wang, J. (2010). Statistical properties of QTL linkage mapping in biparental genetic populations. *Heredity* 105, 257–267. doi: 10.1038/hdy.2010.56
- Mangin, B., Thoquet, P., Olivier, J., and Grimsley, N. H. (1999). Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics* 151, 1165–1172.
- Manichaikul, A., Moon, J. Y., Sen, S., Yandell, B. S., and Broman, K. W. (2009). A model selection approach for the identification of quantitative trait loci in experimental crosses, allowing epistasis. *Genetics* 181, 1077–1086. doi: 10.1534/genetics.108.094565
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- Martinez, O., and Curnow, R. N. (1992). Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor. Appl. Genet.* 85, 480–488. doi: 10.1007/BF00222330
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernysky, A., et al. (2010). The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for

- analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Nahar, K., Matsumoto, I., Taguchi, F., Inagaki, Y., Yamamoto, M., Toyoda, K., et al. (2014). *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Mol. Plant Pathol.* 15, 297–303. doi: 10.1111/mpp.12079
- Narusaka, M., Shirasu, K., Noutoshi, Y., Kubo, Y., Shiraishi, T., Iwabuchi, M., et al. (2009). RRS1 and RPS4 provide a dual resistance- gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J.* 60, 218–226. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03949.x
- Nilsson, N. O., Hansen, M., Panagopoulos, A. H., Tuvevsson, S., Ehde, M., Christiansson, M., et al. (1999). QTL analysis of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. *Plant Breed.* 118, 327–334. doi: 10.1046/j.1439-0523.1999.00390.x
- Panthee, D. R., Gardner, R. G., Ibrahim, R., and Anderson, C. (2015). Molecular markers associated with Ph-3 gene conferring late blight resistance in tomato. *Am. J. Plant Sci.* 6, 2144–2150. doi: 10.4236/ajps.2015.613216
- Pensec, F., Lebeau, A., Daunay, M. C., Chiroleu, F., Guidot, A., and Wicker, E. (2015). Towards the identification of type III effectors associated with *Ralstonia solanacearum* virulence on tomato and eggplant. *Phytopathology* 105, 1529–1544. doi: 10.1094/PHYTO-06-15-0140-R
- Plazas, M., Vilanova, S., Gramazio, P., Rodríguez-Burruezo, A., Fita, A., Herraiz, F. J., et al. (2016). Interspecific hybridization between eggplant and wild relatives from different gene pools. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 141, 34–44.
- Poland, J., Endelman, J., Dawson, J., Rutkoski, J., Wu, S. Y., Manes, Y., et al. (2012). Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *Plant Genome* 5, 103–113. doi: 10.3835/Plantgenome2012.06.0006
- Premabati, C., Munshi, A. D., Behera, T. K., Choudhary, H., Gurung, B., and Saha, P. (2015). Cross compatibility in interspecific hybridization of eggplant, *Solanum melongena*, with its wild relatives. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 193, 353–358. doi: 10.1016/j.scienta.2015.07.024
- Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B., and Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:90. doi: 10.1186/s12864-016-2413-z
- R Core Team (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <http://www.R-project.org/>.
- Rebani, A. (1997). Comparison of methods for regression interval mapping in QTL analysis with non-normal traits. *Genet. Res.* 69, 69–74. doi: 10.1017/S0016672396002558
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3087–3103. doi: 10.1099/ijs.0.066712-0
- Sarah, G., Homa, F., Pointet, S., Contreras, S., Sabot, F., Nabholz, B., et al. (2016). A large set of 26 new reference transcriptomes dedicated to comparative population genomics in crops and wild relatives. *Mol. Ecol. Resour.* doi: 10.1111/1755-0998.12587 [Epub ahead of print].
- Sato, S., Tabata, S., Hirakawa, H., Asamizu, E., Shirasawa, K., Isobe, S., et al. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641. doi: 10.1038/nature11119
- Semagn, K., Babu, R., Hearne, S., and Olsen, M. (2014). Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 33, 1–14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
- Slater, G. S. C., and Birney, E. (2005). Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics* 6:31. doi: 10.1186/1471-2105-6-31
- Sohn, K. H., Segonzac, C., Rallapalli, G., Sarris, P. F., Woo, J. Y., Williams, S. J., et al. (2014). The nuclear immune receptor RPS4 is required for RRS1 SLH1-dependent constitutive defense activation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 10:e1004655. doi: 10.1371/journal.pgen.1004655
- Stange, M., Utz, H. F., Schrag, T. A., Melchinger, A. E., and Würschum, T. (2013). High-density genotyping: an overkill for QTL mapping? Lessons learned from a case study in maize and simulations. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2563–2574. doi: 10.1007/s00122-013-2155-0
- Stekhoven, D. J., and Bühlmann, P. (2012). MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-type data. *Bioinformatics* 28, 112–118. doi: 10.1093/bioinformatics/btr597
- Syfert, M. M., Castañeda-álvarez, N. P., Khoury, C. K., Särkinen, T., Sosa, C. C., Achicanoy, H. A., et al. (2016). Crop wild relatives of the brinjal eggplant (*Solanum melongena*): poorly represented in genebanks and many species at risk of extinction 1. *Am. J. Bot.* 103, 635–651. doi: 10.3732/ajb.1500539
- Tang, J., Vosman, B., Voorrips, R. E., van der Linden, C. G., and Leunissen, J. A. M. (2006). QualitySNP: a pipeline for detecting single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in EST data from diploid and polyploid species. *BMC Bioinformatics* 7:438. doi: 10.1186/1471-2105-7-438
- Toppino, L., Barchi, L., Valentino, D., Portis, E., Lanteri, S., and Rotino, G. L. (2016). “QTLs mapping for *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* resistance in eggplant (*Solanum melongena* L.)” in *Proceedings of the XVIth Eucarpia Capsicum and Eggplant Working Group Meeting*, eds K. Ertsey-Peregi, Z. Füstös, G. Palotás, and G. Csilléry (Budapest: Diamond Congress Ltd), 248–255.
- Treangen, T. J., and Salzberg, S. L. (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 13, 36–46. doi: 10.1038/nrg3117
- Tuinstra, M. R., Ejeta, G., and Goldsbrough, P. B. (1997). Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 95, 1005–1011. doi: 10.1007/s001220050654
- Van Ooijen, J. W. (2006). *JoinMap 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations*. Wageningen: Kyazma BV.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., and Oliver, R. P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27, 196–206. doi: 10.1094/MPMI-10-13-0313-IA
- Voorrips, R. E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93, 77–78. doi: 10.1093/jhered/93.1.77
- Wang, J. F., Ho, F. I., Truong, H. T. H., Huang, S. M., Balatero, C. H., Dittapongpich, V., et al. (2013). Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar “Hawaii 7996” to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190, 241–252. doi: 10.1007/s10681-012-0830-x
- Wang, J. F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., and Grimsley, N. H. (2000). Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 6–13. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.1.6
- Weese, T. L., and Bohs, L. (2010). Eggplant origins: out of Africa, into the Orient. *Taxon* 59, 49–56. doi: 10.2307/27757050
- Wicker, E., Lefeuvre, P., de Cambiaire, J.-C., Lemaire, C., Poussier, S., and Prior, P. (2012). Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J.* 6, 961–974. doi: 10.1038/ismej.2011.160
- Xi’ou, X., Bihao, C., Guannan, L., Jianjun, L., Qinghua, C., Jin, J., et al. (2014). Functional characterization of a putative bacterial wilt resistance gene (RE-bw) in eggplant. *Plant Mol. Biol. Report.* 33, 1058–1073. doi: 10.1007/s11105-014-0814-1
- Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., et al. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475, 189–195. doi: 10.1038/nature10158
- Yeri, S. B., Shirasawa, K., Pandey, M. K., Gowda, M. V. C., Sujay, V., Shrivasthi, M., et al. (2014). Development of NILs from heterogeneous inbred families for validating the rust resistance QTL in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Breed.* 133, 80–85. doi: 10.1111/pbr.12130
- Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z. X., Kono, I., et al. (1998). Expression of Xa1, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1663–1668. doi: 10.1073/pnas.95.4.1663
- Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136, 1457–1468.

- Zhang, C., Liu, L., Wang, X., Vossen, J., Li, G., Li, T., et al. (2014). The Ph-3 gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.* 127, 1353–1364. doi: 10.1007/s00122-014-2303-1
- Zhang, C., Liu, L., Zheng, Z., Sun, Y., Zhou, L., Yang, Y., et al. (2013). Fine mapping of the Ph-3 gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 126, 2643–2653. doi: 10.1007/s00122-013-2162-1
- Zhang, S., Yang, H., and Singh, L. (2003). Common features of segregation distortion in plants and animals. *Genetica* 117, 27–35. doi: 10.1023/A:1022308414864

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Salgon, Jourda, Sauvage, Daunay, Reynaud, Wicker and Dintinger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci

Sylvia Salgon^{1,2,3*}, Cyril Jourda¹, Christopher Sauvage⁴, Marie-Christine Daunay⁴, Bernard Reynaud^{1,3}, Emmanuel Wicker^{1,5}, Jacques Dintinger¹

* **Correspondence:** Sylvia Salgon: sylvia.salgon@gmail.com; Jacques Dintinger: jacques.dintinger@cirad.fr.

Supplementary Tables

Table S1. List of barcodes associated to each eggplant sample used for Genotyping by sequencing.

Samples	Plate	Barcode	Sample Type	Comments
blank	1	TTCCTGAA	Negative control	Empty ^a
blank	2	TTCCTGAA	Negative control	Empty
G003	1	GCTTA	RIL	-
G007	1	AACGCCT	RIL	-
G009	1	AGGC	RIL	-
G011	1	TCGTT	RIL	Discarded ^b
G014	1	TGGCTA	RIL	-
G017	1	TGCTGGA	RIL	-
G019	1	TGCA	RIL	-
G020	1	AGCCC	RIL	-
G021	1	CTTCCA	RIL	-
G023	1	AATATGC	RIL	-
G025	1	GATC	RIL	-
G026	1	ACCTAA	RIL	-
G028	1	ACGTGTT	RIL	-
G029	1	AACCGAGA	RIL	-
G030	1	ACTA	RIL	-
G033	1	GTATT	RIL	-
G034	1	GAGATA	RIL	-
G036	1	ACGACTAC	RIL	-
G038	1	TCAC	RIL	-
G041	1	ATATGT	RIL	-
G042	1	ATTAATT	RIL	-
G043	1	ACAGGGAA	RIL	-
G044	1	CAGA	RIL	-
G047	1	CTGTA	RIL	-
G048	1	ATGCCT	RIL	-

Table S1. Continued

Samples	Plate	Barcode	Sample Type	Comments
G052	1	GGTGT	RIL	-
G056	1	AGGAT	RIL	-
G058	1	ATCGTA	RIL	-
G059	1	ATTGGAT	RIL	-
G063	1	ACGTGGTA	RIL	-
G065	1	AACT	RIL	-
G066	1	ACCGT	RIL	-
G067	1	TATTTTT	RIL	-
G068	1	TAGCATGC	RIL	-
G071	1	ATTGA	RIL	-
G072	1	CATCGT	RIL	-
G074	1	CATAAGT	RIL	-
G075	1	CCATGGGT	RIL	-
G079	1	GCGT	RIL	-
G083	1	GTAA	RIL	-
G084	1	CTTGCTT	RIL	-
G085	1	AGTGGA	RIL	-
G086	1	CATCT	RIL	-
G087	1	CGCGGT	RIL	-
G089	1	CGCTGAT	RIL	-
G090	1	CGCGGAGA	RIL	-
G091	1	TGCGA	RIL	-
G092	1	GGTTGT	RIL	-
G093	1	ATGAAAC	RIL	-
G094	1	TAGGCCAT	RIL	-
G095	1	CCTAC	RIL	-
G096	1	CTATTA	RIL	-
G097	1	CGGTAGA	RIL	-
G098	1	CGTGTGGT	RIL	-
G099	1	CGAT	RIL	-
G100	1	CCAGCT	RIL	-
G104	1	AAAAGTT	RIL	-
G106	1	TGCAAGGA	RIL	-
G107	1	GAGGA	RIL	-
G108	1	GCCAGT	RIL	-
G109	1	CTACGGA	RIL	-
G110	1	GCTGTGGA	RIL	-
G111	1	CGCTT	RIL	-
G113	1	TTCAGA	RIL	-
G114	1	GAATTCA	RIL	-
G117	1	TGGTACGT	RIL	-
G118	1	GGAAC	RIL	-

Table S1. Continued

Samples	Plate	Barcode	Sample Type	Comments
G119	1	GGAAGA	RIL	-
G121	1	GCGGAAT	RIL	-
G122	1	GGATTGGT	RIL	-
G123	1	TCACC	RIL	-
G124	1	TAGGAA	RIL	-
G127	1	GAACTTC	RIL	-
G128	1	TCTCAGTC	RIL	-
G129	1	GTCAA	RIL	-
G130	1	GTACTT	RIL	-
G131	1	TAGCGGA	RIL	-
G132	1	GTGAGGGT	RIL	-
G135	1	CTAGC	RIL	-
G136	1	GCTCTA	RIL	-
G137	1	GGACCTA	RIL	-
G138	1	CCGGATAT	RIL	-
G139	1	TAATA	RIL	-
G140	1	GTTGAA	RIL	-
G142	1	TCGAAGA	RIL	-
G144	1	TATCGGGA	RIL	-
G145	1	ACAAA	RIL	Discarded
G146	1	CCACAA	RIL	-
G147	1	GTCGATT	RIL	Discarded
G148	1	CGCCTTAT	RIL	-
G150	1	TACAT	RIL	Discarded
G151	1	TAACGA	RIL	-
G152	1	TCTGTGA	RIL	-
G153	2	CTCC	RIL	-
G154	2	TTCTC	RIL	-
G156	2	GCTTA	RIL	-
G157	2	AACGCCT	RIL	-
G158	2	AGGC	RIL	-
G161	2	TCGTT	RIL	Discarded
G163	2	TGGCTA	RIL	-
G164	2	TGCTGGA	RIL	-
G168	2	TGCA	RIL	-
G169	2	AGCCC	RIL	-
G170	2	CTTCCA	RIL	-
G185	2	AATATGC	RIL	-
G202	2	GATC	RIL	-
G205	2	ACCTAA	RIL	-
G216	2	ACGTGTT	RIL	-
G218	2	AACCGAGA	RIL	-

Table S1. Continued

Samples	Plate	Barcode	Sample Type	Comments
G224	2	ACTA	RIL	-
G239	2	GTATT	RIL	-
G244	2	GAGATA	RIL	-
G248	2	ACGACTAC	RIL	-
G250	2	TCAC	RIL	-
G252	2	ATATGT	RIL	-
G255	2	ATTAATT	RIL	-
G256	2	ACAGGGAA	RIL	-
G257	2	CAGA	RIL	-
G259	2	CTGTA	RIL	-
G261	2	ATGCCT	RIL	-
G263	2	GGTGT	RIL	-
G266	2	AGGAT	RIL	-
G268	2	ATCGTA	RIL	-
G269	2	ATTGGAT	RIL	-
G270	2	ACGTGGTA	RIL	Discarded
G271	2	AACT	RIL	-
G273	2	ACCGT	RIL	-
G275	2	TATTTTT	RIL	-
G276	2	TAGCATGC	RIL	-
G277	2	ATTGA	RIL	-
G279	2	CATCGT	RIL	-
G281	2	CATAAGT	RIL	-
G284	2	CCATGGGT	RIL	-
G288	2	GCGT	RIL	-
G289	2	GTAA	RIL	-
G291	2	CTTGCTT	RIL	-
G293	2	AGTGGA	RIL	-
G294	2	CATCT	RIL	-
G295	2	CGCGGT	RIL	-
G297	2	CGCTGAT	RIL	-
G299	2	CGCGGAGA	RIL	-
G300	2	TGCGA	RIL	-
G301	2	GGTTGT	RIL	-
G302	2	ATGAAAC	RIL	-
G303	2	TAGGCCAT	RIL	-
G304	2	CCTAC	RIL	-
G305	2	CTATTA	RIL	-
G306	2	CGGTAGA	RIL	-
G307	2	CGTGTGGT	RIL	-
G308	2	CGAT	RIL	-
G311	2	CCAGCT	RIL	-

Table S1. Continued

Samples	Plate	Barcode	Sample Type	Comments
G312	2	AAAAGTT	RIL	-
G313	2	TGCAAGGA	RIL	-
G314	2	GAGGA	RIL	-
G315	2	GCCAGT	RIL	-
G317	2	CTACGGA	RIL	-
G318	2	GCTGTGGA	RIL	-
G319	2	CGCTT	RIL	-
G321	2	TTCAGA	RIL	-
G325	2	GAATTCA	RIL	-
G326	2	TGGTACGT	RIL	-
G327	2	GGAAC	RIL	-
G328	2	GGAAGA	RIL	-
G329	2	GCGGAAT	RIL	-
G330	2	GGATTGGT	RIL	-
G331	2	TCACC	RIL	-
G332	2	TAGGAA	RIL	-
G335	2	GAACTTC	RIL	-
G337	2	TCTCAGTC	RIL	-
G338	2	GTCAA	RIL	-
G340	2	GTACTT	RIL	-
G341	2	TAGCGGA	RIL	-
G342	2	GTGAGGGT	RIL	-
G343	2	CTAGC	RIL	-
G344	2	GCTCTA	RIL	-
G345	2	GGACCTA	RIL	-
G346	2	CCGGATAT	RIL	-
G347	2	TAATA	RIL	-
G348	2	GTTGAA	RIL	Discarded
G350	2	TCGAAGA	RIL	-
G351	2	TATCGGGA	RIL	-
G353	2	ACAAA	RIL	-
G355	2	CCACAA	RIL	-
G356	2	GTCGATT	RIL	-
G357	2	CGCCTTAT	RIL	-
G358	2	TACAT	RIL	Discarded
G359	2	TAACGA	RIL	-
G360	2	TCTGTGA	RIL	-
MM738	1	CTCC	P1	-
AG91-25	1	TTCTC	P2	-

^a Water used as negative control. Less than 1,000 reads were obtained after the demultiplexing step.

^b These RILs were excluded from the analyses presented in this paper because of insufficient number of reads or presence of contaminations.

Table S2. Mean of Temperature (T°C) and Relative Humidity (RH%) (with standard errors) measured during phenotyping assays conducted on the eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population.

Assay name	Period of assay	Night		Day	
		T (°C)	RH (%)	T (°C)	RH (%)
TO10.Reunion	March-May 2015	21 (2)	87 (8)	32 (7)	57 (18)
TO10.Indonesia	2010	Na*	Na	Na	Na
CFBP2957-season 1	May-June 2014	18 (2)	81 (8)	29 (7)	56 (17)
CFBP2957-season 2	October-November 2014	21 (2)	86 (7)	35 (6)	49 (14)
CFBP3059-season 1	May-June 2012	18 (3)	79 (7)	23 (4)	67 (10)
CFBP3059-season 2	April-May 2013	19 (2)	90 (7)	28 (5)	66 (16)
CMR34-season 1	October-December 2012	21 (2)	87 (11)	33 (4)	58 (14)
CMR34-season 2	August-October 2013	17 (2)	95 (7)	27 (5)	56 (20)

*Not available

Table S3. Excel file with complete eggplant [MM738 × AG91-25] RIL population genetic map and significant hits on eggplant, tomato and potato genomes.

Due to its very large format, this file is uniquely available online at <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00828/full>.

Table S4. QTL detected for resistance to 3 strains of *R. solanacearum* species complex based on the composite interval mapping method and the Haley-Knott regression model in the [MM738 × AG91-25] RIL population. QTL analysis for the Waudpc variable was conducted on individual seasons of PSS4, CFBP2957, CFBP3059 and CMR34 strains.

Strain	Seasons	LG ^a	Chr. ^b	QTL ^c	Location ^d (cM)	nearest marker	95% CI ^e (cM)	LOD	R ^{2f}	Total R ^{2g}	add effect ^h
PSS4	1	2	E02	EBWR2	70.6	COF324b	65.0-71.0	13.5	30.7	30.7	-7.2***
	2	2	E02	EBWR2	70.0	ecm009	61.0-79.0	4.1	10.5	10.5	-3.2***
CFBP2957	1	2	E02	EBWR2	66.0	ecm009	62.0-79.0	8.7	15.3	38.8	-6.1***
		14	E05	EBWR14	3.0	CDX125a	2.0-6.3	14.5	27.4		-7.3***
	2	2	E02	EBWR2	72.0	COI393a	64.0-74.0	16.0	28.6	43.2	-9.6***
		14	E05	EBWR14	3.0	CDX125a	1.0-13.2	10.2	17.0		-7.3***
CFBP3059	1	14	E05	EBWR14	7.8	n32451	5.0-10.2	13.8	31.8	31.8	-7.3***
	2	2	E02	EBWR2	66.0	ecm009	62.0-71.0	9.4	14.3	50.6	-9.1***
		14	E05	EBWR14	12.0	n98289	8.4-13.0	21.9	39.7		-13.6***

^a Linkage group.

^b Chromosome corresponding to linkage group.

^c Name of the QTL: eggplant bacterial wilt resistance (EBWR) followed by the linkage group number.

^d Position of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM).

^e Bayesian confidence interval.

^f R²: Estimates of the proportion of phenotypic variance (percentage) explained by the QTL detected.

^g Estimate of the total proportion of phenotypic variance explained by the additive model.

^h Additive effect: Positive values mean that the allele comes from the MM738 parent, while negative values mean that the allele comes from the AG91-25 parent.

Table S5. Means comparison for the Waudpc variable. Eggplant RILs were grouped according to the alleles of susceptibility (“A”) and resistance (“B”) to bacterial wilt at *EBWR2* locus, *EBWR14* locus and on both *EBWR2* and *EBWR14* loci.

Trial	<i>EBWR2</i> ^a		<i>EBWR14</i> ^b		<i>EBWR2/EBWR14</i>			
	AA ^c	BB ^c	AA	BB	AA/AA	AA/BB	BB/AA	BB/BB
PSS4								
Sample size	76	83	-	-	-	-	-	-
Waudpc	63.2 (7.2) a ^d	52.7 (7.9) b	-	-	-	-	-	-
TO10.Indonesia								
Sample size	78	87	-	-	-	-	-	-
Waudpc	47.4 (9.0) a	31.4 (10.2) b	-	-	-	-	-	-
TO10.Reunion								
Sample size	79	90	-	-	-	-	-	-
Waudpc	80.7 (6.1) a	74.6 (8.8) b	-	-	-	-	-	-
CFBP2957								
Sample size	79	90	83	93	33	46	45	42
Waudpc	30.6 (12.7) a	16.9 (10.7) b	30.0 (13.2) a	18.0 (11.2) b	40.3 (11.0) a	23.7 (8.8) b	22.7 (9.6) b	10.4 (8.2) c
CFBP3059								
Sample size	66	81	74	81	28	38	41	38
Waudpc	32.4 (14.9) a	22.6 (13.1) b	37.6 (12.1) a	18.3 (10.0) b	46.4 (8.9) a	22.1 (8.5) b	31.8 (10.8) c	13.3 (7.7) d

^a *EBWR2* locus is represented by the ecm009 marker.^b *EBWR14* locus is represented by the n32451 marker.^c Genotype; AA is homozygous for the P1 (MM738) susceptible allele; BB is homozygous for the P2 (AG91-25) resistant allele.^d Mean value, standard deviation in brackets and group assigned by the LSD test.

Table S6. List of SNPs between eggplant MM738 susceptible and AG91-25 resistant parental lines found in the candidate R gene transcripts at the *EBWR9* QTL conferring resistance to 3 phylotype-I strains of *R. solanacearum* species complex and their effects on predicted protein.

Transcript ID	SNP position ^a	MM738 genotype	AG91-25 genotype	SNP quality ^b	SNP effect on protein ^c
singlet__11792	148 (CDS)	A/A	G/G	121.91	NS (K ↔ E)
	158 (CDS)	A/A	G/G	158.72	NS (H ↔ R)
	229 (CDS)	C/C	G/G	394.42	NS (H ↔ D)
	245 (CDS)	A/A	T/T	426.42	NS (K ↔ M)
	285 (CDS)	C/C	T/T	241.49	S
	316 (CDS)	C/C	G/G	69.45	NS (Q ↔ E)
singlet__6456	174 (3' UTR)	C/C	T/T	31.81	-
	185 (3' UTR)	C/C	A/A	324.42	-
	193 (3' UTR)	G/G	A/A	414.45	-
	347 (CDS)	C/C	T/T	2762.42	NS (R ↔ Q)
	374 (CDS)	C/C	T/T	2138.42	NS (G ↔ D)
	520 (CDS)	G/G	C/C	1352.42	NS (N ↔ E)
	522 (CDS)	T/T	C/C	1378.42	-
	714 (CDS)	G/G	T/T	222.52	NS (Q ↔ K)
	719 (CDS)	G/G	T/T	174.62	NS (A ↔ D)
	726 (CDS)	C/C	A/A	176.62	NS (V ↔ L)
	730 (CDS)	C/C	A/A	187.62	NS (K ↔ N)
	825 (5' UTR)	T/T	A/T	163.19	-
singlet__40855	183 (5' UTR)	C/C	A/A	215.62	-
	257 (5' UTR)	A/A	G/G	265.47	-
	273 (5' UTR)	A/A	T/T	229.52	-
	372 (5' UTR)	A/A	G/G	709.42	-
	421 (5' UTR)	A/A	G/G	609.42	-
	503 (5' UTR)	T/T	G/G	419.42	-
	544 (5' UTR)	A/A	T/T	498.42	-
	768 (CDS)	C/C	T/T	125.17	NS (S ↔ F)
	947 (CDS)	T/T	G/G	158.81	NS (F ↔ V)
	1019 (CDS)	A/A	C/C	320.44	NS (N ↔ H)
	1090 (CDS)	T/T	C/C	315.44	S
	1114 (CDS)	T/T	C/C	206.62	S
	1366 (CDS)	A/A	G/G	278.47	S
	1453 (CDS)	A/A	G/G	391.42	S
	1465 (CDS)	T/T	C/C	367.43	S
	1725 (CDS)	G/G	A/A	324.44	NS (S ↔ N)
	1824 (CDS)	T/T	C/C	426.42	NS (I ↔ T)
	1916 (CDS)	A/A	G/G	244.52	NS (I ↔ V)
	1945 (CDS)	G/G	A/A	204.62	S
	2112 (CDS)	C/C	T/T	601.42	NS (S ↔ F)
	2161 (CDS)	T/T	C/C	350.43	S
	2279 (CDS)	T/T	A/A	329.44	NS (Y ↔ N)
	2290 (CDS)	A/A	C/C	285.47	S
	2791 (CDS)	C/C	A/A	308.44	S
	2841 (CDS)	T/T	C/C	323.44	NS (L ↔ P)
	2870 (CDS)	G/G	T/T	389.42	-
	2872 (CDS)	T/T	C/C	366.43	NS (G ↔ C)

Table S6. Continued

Transcript ID	SNP position ^a	MM738 genotype	AG91-25 genotype	SNP quality ^b	SNP effect on protein ^c
singlet__40855	2969 (CDS)	A/A	G/G	532.42	NS (T ↔ A)
	3179 (CDS)	T/T	C/C	548.42	NS (C ↔ R)
	3496 (CDS)	T/T	A/A	662.42	S
	3649 (CDS)	C/C	T/T	579.42	S
	3661 (CDS)	G/G	A/A	645.42	S
	3755 (CDS)	G/G	A/A	259.47	NS (D ↔ N)
	3982 (3' UTR)	G/G	T/T	323.44	-
singlet__57090	30 (CDS)	A/A	A/T	35.86	NS (N ↔ Y)
	127 (CDS)	T/T	T/C	260.19	S
	183 (CDS)	T/C	T/T	261.19	NS (S ↔ F)
	214 (CDS)	C/C	C/T	133.19	S
	271 (CDS)	A/C	C/C	397.28	NS (L ↔ F)
	361 (CDS)	T/T	T/C	228.21	S
singlet__10906	33 (CDS)	T/T	T/C	33.44	S
	48 (CDS)	A/A	A/G	74.86	S
	79 (CDS)	C/C	C/T	184.37	S
	141 (CDS)	C/A	A/T	425.19	S
	162 (CDS)	C/T	C/C	116.19	S
	179 (CDS)	G/G	A/G	79.19	NS (G ↔ E)
	225 (CDS)	C/C	C/T	237.19	S
	272 (CDS)	A/A	G/G	340.44	NS (H ↔ R)
	298 (CDS)	T/T	T/A	227.19	NS (W ↔ R)
	330 (CDS)	G/G	G/C	186.19	NS (E ↔ D)
	337 (CDS)	C/C	C/T	36.19	S
	340 (CDS)	A/G	A/A	45.44	NS (V ↔ I)
	363 (CDS)	G/G	A/G	95.19	S
	367 (CDS)	G/G	A/G	126.19	NS (E ↔ K)
	390 (CDS)	A/A	G/A	34.87	NS (I ↔ M)
	435 (CDS)	G/G	A/G	64.19	S
singlet__34133	187 (CDS)	G/G	A/A	203.62	S
	225 (CDS)	C/C	T/T	196.62	NS (A ↔ T)
singlet__13069	264 (CDS)	C/C	A/A	198.62	S
	302 (CDS)	A/A	G/G	51.85	NS (E ↔ G)
	332 (CDS)	C/C	T/T	51.85	NS (A ↔ V)
	522 (CDS)	G/G	A/A	246.47	S
	580 (CDS)	T/T	G/G	153.81	NS (S ↔ A)
	610 (CDS)	A/A	G/G	79.81	NS (I ↔ V)
	768 (CDS)	C/C	T/T	453.42	S
	1059 (CDS)	C/C	T/T	87.81	S

^a SNP position on the transcript in bp and transcript region correspondence in parenthesis. UTR = UnTranslated Region; CDS = Coding DNA Sequence.

^b Phred-scaled quality score for the SNP calling. High quality scores indicate high confidence calls.

^c Effect on the SNP on the predicted protein: S = Synonymous substitution; NS = NonSynonymous substitution. When the substitution is NS, the amino acid (one letter code) change is indicated in parenthesis.

Supplementary Figures

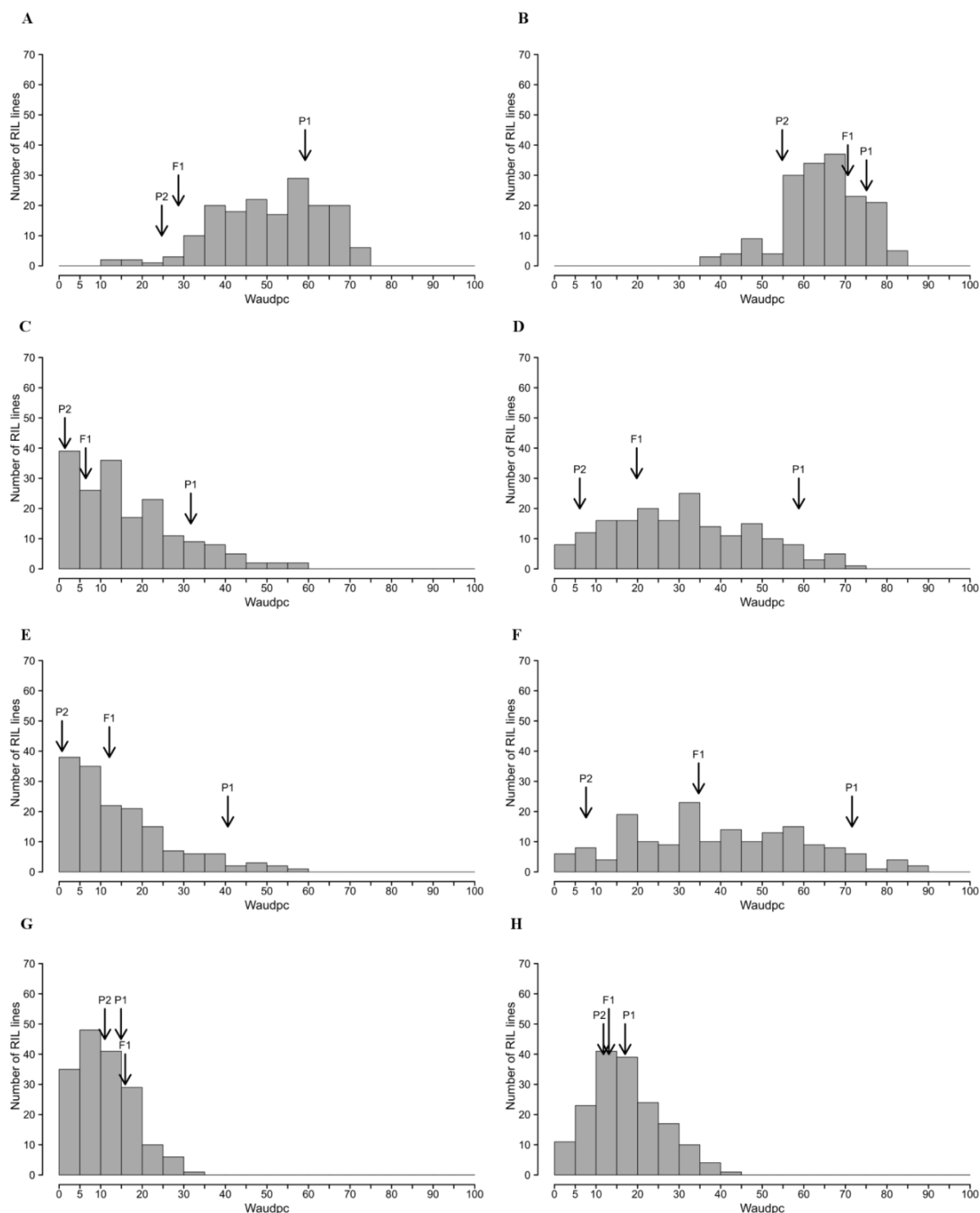


Figure S1. Frequency distribution of the Waudpc variable in the eggplant [MM738×AG91-25] RIL population obtained in individual seasons. Results are presented for: PSS4-season 1 (A); PSS4-season 2 (B); CFBP2957-season 1 (C); CFBP2957-season 2 (D); CFBP3059-season 1 (E); CFBP3059-season 2 (F); CMR34-season 1 (G) and CMR34-season 2 (H). Arrows indicate the means of parental accessions MM738 (P1) and AG91-25 (P2) and of the F1 generation.

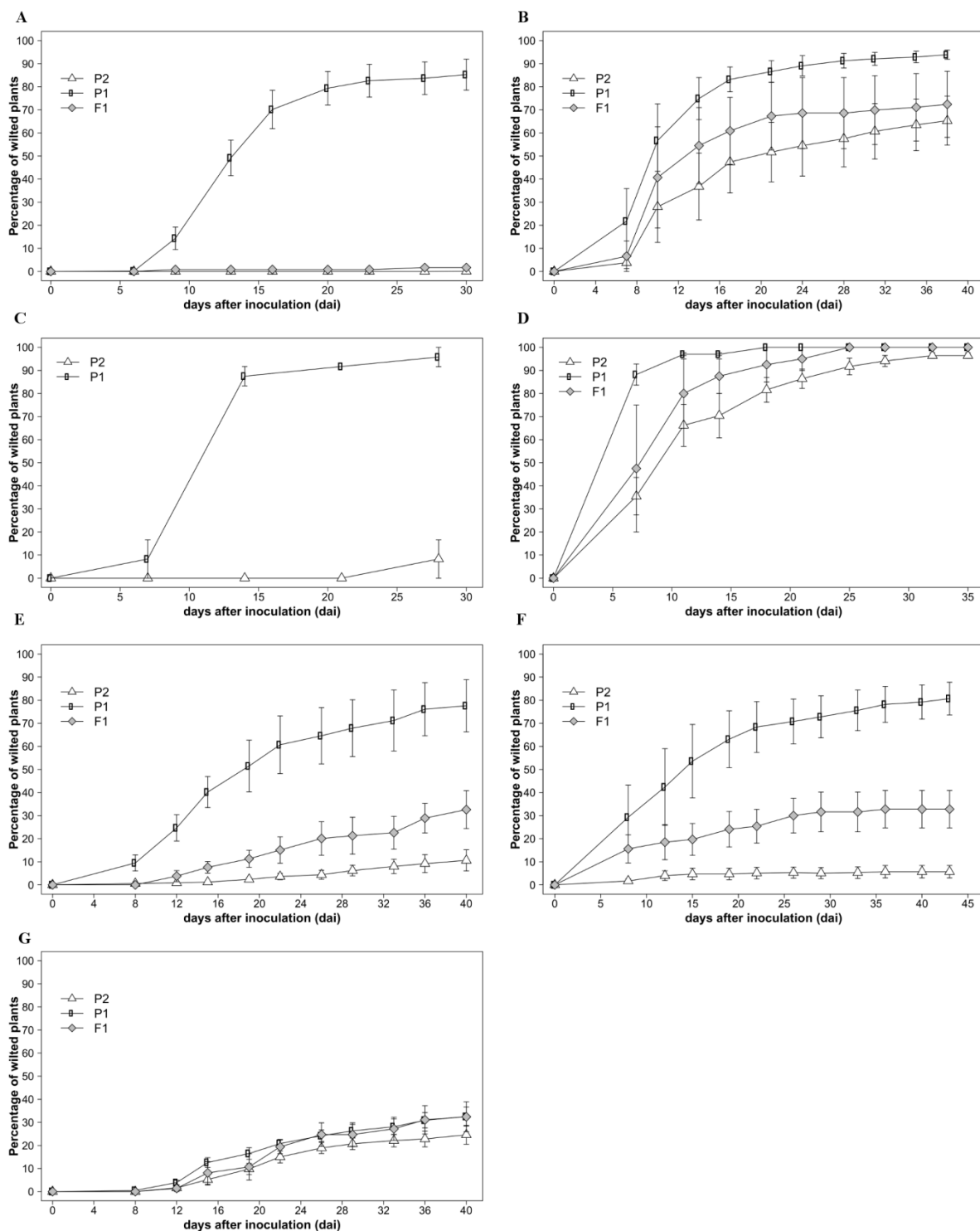


Figure S2. Bacterial wilt disease incidence progression curves for the eggplant parental lines MM738 (P1) and AG91-25 (P2) and for F1 progeny. Results are presented for the combined data of GMI1000, PSS366 and CMR134 (A); for the combined seasons of PSS4 (B); for TO10.Indonesia (C) and TO10.Reunion (D); for the combined seasons of CFBP2957 (E), CFBP3059 (F), CMR34 (G). Data for F1 progeny were not available for TO10.Indonesia.

Conclusions du chapitre

Une carte génétique dense comprenant 1035 marqueurs, dont 867 nouveaux SNPs issus de la technique GBS, a été produite. Nous avons détecté trois QTLs de résistance à partir des analyses de cartographie génétique conduites sur les données de phénotypage de la résistance vis-à-vis de huit souches du RSSC. Parmi ces trois QTLs, *EBWR9* est détecté vis-à-vis des trois souches du phylotype I, GMI1000, PSS366 et CMR134. Ce QTL correspond à *ERs1* et il est situé sur le chromosome 9 de l'aubergine. *EBWR9* n'est détecté ni avec les souches des phylotypes IIA, IIB et III, ni avec les souches virulentes PSS4 et TO10 de phylotype I. Cela indique une possible spécificité d'*EBWR9* vis-à-vis de souches du phylotype I. Des souches de ce même phylotype sont néanmoins capables de contourner *EBWR9*. Deux autres QTLs, *EBWR2* et *EBWR14* ont été détectés respectivement sur les chromosomes 2 et 5. *EBWR2* a été qualifié de généraliste car détecté vis-à-vis des souches PSS4 et TO10 du phylotype I, de la souche CFBP2957 du phylotype IIA et de la souche CFBP3059 du phylotype III. *EBWR14* a été détecté vis-à-vis des souches CFBP2957 (IIA) et CFBP3059 (III). Une recherche de gènes candidat de type R a été réalisée dans la portion chromosomique correspondant à *EBWR9*. Cinq gènes de type R présentant des allèles différents entre les lignées parentales sont présents dans la zone et peuvent donc constituer de potentiels candidats.

Les résultats de ce chapitre mettent en évidence l'intérêt de l'aubergine AG91-25 pour l'amélioration génétique de la résistance au BW. Cependant, ces résultats soulignent aussi l'absence de facteurs de résistance efficaces permettant de contrôler les souches virulentes PSS4 et TO10. Dans la partie suivante de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux aubergines MM152 (aussi nommé Ceylan ou E3) et EG203 (aussi nommé Surya ou E4) qui ont montré un niveau de résistance élevée à ces souches virulentes en conditions contrôlées. Ces aubergines ont été utilisées pour créer deux populations DH dont la résistance aux souches virulentes de *R. pseudosolanacearum* (souche PSS4 et R3598) a été cartographiée. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

**Chapitre 3 – Recherche de QTLs de
résistance vis-à-vis des souches de
Ralstonia pseudosolanacearum
contournant *ERs1***

Préambule à l'article

Les résultats de l'étude de la résistance présente chez AG91-25, qui font l'objet du chapitre précédent, montrent qu'il existe à l'intérieur de chaque phylotype des souches pouvant contourner le QTL majeur *EBWR9*; c'est le cas notamment des souches d'origine asiatique PSS4 et TO10 (phylotype I). Au vu de la répartition mondiale du phylotype I et de sa prédominance dans les principales zones de production de l'aubergine en Asie, la recherche de sources de résistance vis-à-vis des souches virulentes de ce phylotype reste un enjeu majeur. Un QTL de résistance (*EBWR2*) a été détecté vis-à-vis de ces souches. *EBWR2* agit en ralentissant la progression de maladie, sans pour autant diminuer l'incidence finale. La recherche de facteurs de résistance à effet plus fort, permettant de contrôler efficacement ce type de souches, est donc un impératif. Malgré la prévalence des souches de phylotype I dans les zones de culture des Solanacées en Afrique (Mahbou-Somo-Toukam 2010; N'Guessan et al. 2012), des souches du phylotype III sont fréquemment isolées et représentent donc aussi une menace pour la culture d'aubergine. Dans le cadre d'une collaboration avec l'entreprise semencière Technisem, des échantillonnages ont été faits sur le site de M'Fou près de Yaoundé au Cameroun. La souche majoritairement présente sur le site (RUN3598 ou R3598) appartient au phylotype III-sequevar 29 (Emmanuel Wicker, communication personnelle). Des essais de phénotypage sur la population RIL MM738 × AG91-25, ont été réalisés durant le stage de Master 2 de Morgane Raynal. Les résultats obtenus, malgré un faible niveau d'infestation observé sur le parent sensible MM738, indiquent une absence de QTL de résistance vis-à-vis de cette souche (Morgane Raynal, communication personnelle).

Les objectifs de ce chapitre de thèse étaient donc :

- (i) De cibler des accessions d'aubergines intéressantes pour le contrôle des souches PSS4 et R3598
- (ii) De produire des populations DH à partir du croisement des accessions les plus prometteuses avec le parent sensible MM738 (parent sensible de la population de RILs MM738 x AG91-25)
- (iii) De cartographier dans ces descendance des QTLs de résistance permettant de contrôler ces souches.

Les objectifs (i) et (ii) ont été réalisés en partie avant le début de cette thèse et seront présentés brièvement ci-dessous. L'objectif (iii) fait l'objet d'un projet d'article scientifique qui sera soumis dans la revue internationale Euphytica. Une partie des résultats obtenus dans le cadre de cette étude n'a pas pu être intégrée à l'article en raison d'une fiabilité incertaine de la détection des QTLs de résistance. Ces résultats seront présentés succinctement dans la partie 3.2.

Travaux préliminaires

Afin de déterminer les sources de résistance les plus intéressantes pour contrôler les souches virulentes sur AG91-25 (PSS4 du phylotype I et R3598 du phylotype III), nous avons phénotypé une partie de la core-collection d'aubergines définie par Lebeau et al. (2010) (Tableau 7). Les tests avec la souche PSS4 ont été menés à la Réunion en conditions contrôlées (NS2) et comportent trois répétitions. Les plants ont été inoculés et notés selon le protocole défini dans Lebeau et al. (2010). Les tests avec la souche R3598 se sont déroulés à Yaoundé sur une parcelle naturellement infestée dans laquelle la souche en question a été identifiée. De façon à renforcer le niveau d'infestation, les plants ont préalablement été inoculés avec R3598 avant transplantation dans cette même parcelle. Ces essais, qui comportent aussi trois répétitions, ont été réalisés dans le cadre du stage de master 2 de Morgane Raynal (avril-septembre 2015).

Tableau 7: Description du matériel végétal utilisé

Code	Accession	Nom alternatif	Espèce	Source
E1	MM853	Dingras multiple purple	<i>S.melongena</i>	INRA
E2	MM643	SM6	<i>S.melongena</i>	INRA
E3	MM152	Ceylan, SM164	<i>S.melongena</i>	INRA
E4	EG203	Surya	<i>S.melongena</i>	AVRDC
E8	MM738		<i>S.melongena</i>	INRA
E9	S56B	Terong Bulat Hijau	<i>S.melongena</i>	AVRDC
E10	MM136	Florida Market	<i>S.melongena</i>	INRA

Les résultats finaux sur les trois répétitions de l'essai en conditions contrôlées avec la souche PSS4 ont été comparés avec ceux préalablement obtenus par Lebeau et al. (2010) (Tableau 8). Les accessions ont été classées par groupe phénotypique de niveau de résistance en utilisant la méthode des plus proches voisins (méthode knn, package cluster de R) qui

prend en compte les variables incidence maximale ($W_{\max}$) et index de colonisation (CI) (Lebeau et al. 2010) . Les 6 groupes phénotypiques définis sont les suivants: 1 = hautement résistant ; 2 = résistant ; 3.1 = partiellement résistant ; 3.2 = tolérant avec infection latente ; 4 = sensible ; 5 = hautement sensible.

Tableau 8 : Moyennes des variables $W_{\max}$ et CI obtenues à partir des analyses sur les répétitions individuelles et combinées (comb), et attribution des groupes phénotypiques correspondant.

Accessions	Répétitions	$W_{\max}$	CI	Phénotype
E1	1	46,7	66,7	4
	2	33,3	40	2
	3	26,7	26,7	2
	comb	35,6 ± 5,9	44,4 ± 11,8	3.1
	Lebeau et al.	10	23,3	2
E10	1	86,7	86,7	5
	2	73,3	73,3	4
	3	86,7	86,7	5
	comb	82,2 ± 4,4	82,2 ± 4,4	4
	Lebeau et al.	96,7	96,7	5
E2	1	80	80	4
	2	40	40	3.1
	3	80	80	4
	comb	66,7 ± 13,3	66,7 ± 13,3	4
	Lebeau et al.	53,3	56,7	4
E3	1	6,7	20	2
	2	0	0	1
	3	0	7,1	1
	comb	2,2 (2,2)	9 (5,9)	1
	Lebeau et al.	23,3	36,7	2
E4	1	42,9	42,9	3.1
	2	20	20	2
	3	20	26,7	2
	comb	27,6 (7,6)	29,8 (6,8)	2
	Lebeau et al.	13,3	16,7	2
E8	1	93,3	93,3	5
	2	73,3	73,3	4
	3	86,7	86,7	5
	comb	84,4 (5,9)	84,4 (5,9)	5
	Lebeau et al.	100	100	5
E9	1	26,7	26,7	2
	2	6,7	13,3	1
	3	0	6,7	1
	comb	11,1 ± 8,0	15,6 ± 5,9	2
	Lebeau et al.	26,7	26,7	2

L'accension E10, considérée comme témoin de sensibilité, est effectivement classée sensible (répétition 2) et hautement sensible (répétitions 1 et 3) avec la souche PSS4, confirmant le bon niveau d'infestation de chacune des répétitions. L'accension E8 confirme également son haut niveau de sensibilité vis-à-vis de PSS4. Les accessions E3 et E9 montrent le meilleur niveau de résistance sur les trois répétitions. Les accessions E1 et E4 montrent aussi un haut niveau de résistance dans les répétitions 2 et 3 mais ont des taux de flétrissement élevés lors de la 1^{ère} répétition. Enfin, l'accension E2, classée de tolérante à sensible selon les répétitions, ne semble pas la plus intéressante pour contrôler des souches de type PSS4 (Tableau 8). Les résultats finaux sur les trois répétitions conduites au Cameroun sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Moyennes de la variable $W_{\max}$ obtenues à partir des analyses sur les répétitions individuelles et combinée (comb).

Accessions	Répétitions	$W_{\max}$
E1	1	10,0
	2	65,0
	3	75,0
	comb	50,0 $\pm$ 35,0
E10	1	100,0
	2	95,0
	3	100,0
	comb	98,3 $\pm$ 2,9
E2	1	30,0
	2	100,0
	3	70,0
	comb	66,7 $\pm$ 35,1
E3	1	10,0
	2	75,0
	3	60,0
	comb	48,3 $\pm$ 34,0
E4	1	0,0
	2	0,0
	3	0,0
	comb	0,0 $\pm$ 0,0
E8	1	80,0
	2	85,0
	3	90,0
	comb	85,0 $\pm$ 5,0
E9	1	10,0
	2	50,0
	3	55,0
	comb	38,3 $\pm$ 24,7

Les groupes phénotypiques n'ont pas pu être définis avec la souche R3598 car les infections latentes n'ont pas pu être déterminées (variable CI non disponible). Les accessions E10 et E8, considérées comme témoin de sensibilité, sont effectivement les aubergines les plus sensibles vis-à-vis de la souche R3598, confirmant ainsi le bon niveau d'infestation de chacune des répétitions (Tableau 9). Parmi les accessions testées, E4 a montré le meilleur niveau de résistance avec un Wmax de 0 % sur chacune des trois répétitions. Les accessions E1, E2, E3 et E9 ont montré des niveaux de résistance intermédiaires. Par ailleurs, le niveau de résistance de ces accessions était très variable suivant la répétition. Parmi ces accessions testées, seule E4 semble donc prometteuse pour contrôler efficacement la souche R3598. De plus, les travaux menés sur les populations de Côte d'Ivoire (N'Guessan et al., 2012) et de Guyane (Deberdt et al., 2014) confirment le bon niveau de résistance de l'accession E4 vis-à-vis de souches du phylotype I virulentes sur E6. E4 a donc été choisie en priorité pour produire une troisième population d'haploïdes doublés.

Les accessions E3, E4 et E9 semblent être les sources les plus intéressantes pour contrôler les souches de *Ralstonia pseudosolanacearum* très virulentes et agressives sur E6 (type PSS4 et R3598). Ces accessions ont donc été choisies pour produire les populations DH E3 × E8, E4 × E8 et E9 × E8. Les trois populations ont été produites en collaboration entre l'INRA Avignon (MC Daunay) et l'entreprise privée Vegenov. La population E4 × E8, composée de 135 lignées DH, a été phénotypée avec la souche PSS4 dans les tunnels du CIRAD à la Réunion et avec la souche R3598 dans les tunnels de Technisem au Cameroun. La population E3 × E8, composée de 160 lignées DH, a été phénotypée avec la même souche PSS4 en chambres climatiques dans le cadre du stage de master 2 d'Edith Garot (avril-septembre 2016). Les deux populations ont été génotypées par la même technique GBS déjà employée sur la première population E8 × E6, mais en augmentant 7 fois la profondeur de séquençage afin d'avoir des marqueurs plus fiables. La population E9 × E8 sera disponible qu'à partir de fin 2017 et n'a donc pas pu être testée dans le cadre de ces travaux de thèse.

3.1 ARTICLE: Partial resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* strains is provided by multiple minor QTLs in the eggplant EG203 accession

S. Salgon, M. Raynal, S. Lebon, J. M. Baptiste, C. Jourda, M. C. Daunay and J. Dintinger

S. Salgon

Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

Université de la Réunion, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

ARMEFLHOR, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

M. Raynal

NOVA GENETIC, F-49160 Longué-Jumelles, France

S. Lebon, J. M. Baptiste, C. Jourda, J. Dintinger

Cirad, UMR PVBMT, F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

M. C. Daunay

INRA, UR1052 GAFL, F-84143 Montfavet, France

*Corresponding author: Sylvia Salgon

Email: Sylvia.salgon@gmail.com

Tel: +262 62 49 92 42

Fax: +262 62 49 92 93

Abstract

Eggplant cultivation is limited by numerous diseases, including the devastating bacterial wilt (BW) caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). Within the RSSC, *Ralstonia pseudosolanacearum* (including phylotypes I and III) causes severe damage to Solanaceae crops. Therefore, breeding cultivars that are resistant to *R. pseudosolanacearum* strains is a major goal for eggplant improvement. The susceptible MM738 and the resistant EG203 (Surya) lines were crossed to create an intraspecific eggplant population. This population was challenged with two strains belonging to phylotypes I (PSS4) and III (R3598). These strains bypass the published *EBWR9* BW-resistance QTL originating from line AG91-25. A genetic map of the population was constructed and QTL mapping was conducted on 123 doubled haploid lines. Eleven and three QTLs were detected for resistance to PSS4 and R3598, respectively. They were strongly influenced by the environmental conditions. The most stable QTLs were found on chromosomes 3 and 6. The alignment of sequences bearing SNPs on published Solanaceae genomes allowed comparison of newly detected QTLs with the previously published QTLs. Given their estimated physical position, the newly detected QTLs could be syntenic with resistance QTLs in tomato. In particular, the QTLs' position on chromosome 6 overlaps with the major broad-spectrum tomato resistance QTL *Bwr-6*. Breeder-friendly markers could be developed from sequences bearing mapped SNPs and then used for marker-assisted selection. The present study is a first step towards understanding the complex polygenic system, which provides a high level of BW-resistance in the EG203 line.

Key words: *Solanum melongena*; doubled haploid population; bacterial wilt; QTL mapping; polygenic resistance; EG203.

3.1.1 Introduction

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is a major crop in tropical and subtropical regions. It belongs to the very large family of Solanaceae, which includes crops cultivated all over the world, such as tomato (*Solanum lycopersicum*), potato (*Solanum tuberosum*) or pepper (*Capsicum annuum*). Whereas the majority of Solanaceae are endemic to the Americas, eggplant and its wild relatives originate from the old world. DNA sequence data analyses suggest that eggplant originates from Africa and spread throughout the Middle East to Asia (Weese and Bohs 2010). While Asia is the world's largest producer (47 million tons in 2014; <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>), eggplant is also an important crop for farmers in Africa and Mediterranean countries (Daunay 2008). In addition to its gustative qualities, eggplant is rich in phenolic compounds with antioxidant properties, vitamins and some minerals (Cao et al. 1996; Stommel and Whitaker 2003; Prohens et al. 2007; Plazas et al. 2013; Niño-Medina et al. 2014), which means that it is very beneficial for human health. However, its production is limited by diseases, including bacterial wilt (BW), one of the most serious and widespread diseases in the tropics.

BW-disease is caused by a soil-borne bacteria belonging to the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). It affects more than 250 plant species belonging to 54 plant families (Hayward 1991; Peeters et al. 2013b). The RSSC has been divided into four monophyletic groups called phylotypes, which have each been connected to a potential geographical origin: phylotype I to Asia, phylotypes II (subdivided in IIA and IIB) to the Americas, phylotype III to Africa and phylotype IV to Indonesia (Fegan and Prior 2005). Recent studies proposed a new taxonomic division of the RSSC into three genomic species (Safni et al. 2014; Prior et al. 2016). In this new classification, phylotypes I and III belong to the same species, known as *R. pseudosolanacearum*, phylotype II remains *R. solanacearum*, but phylotype IV is named *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*. In the absence of a host, the bacterium can survive in moist soils or in water for several years (Coutinho 2005). In the presence of susceptible hosts, the bacterium enters the root, colonizes the xylem vessels and rapidly spreads to the upper parts of the plant. When the bacterium multiplies, it produces exopolysaccharides that disrupt water flux, causing the typical wilting symptoms. Wilting can occur within a few days. The most susceptible plants die, releasing a large quantity of inoculum into the soil. In many cases, the bacterium may colonize plants that show little or no symptoms of wilt. Little research has been done to examine the mechanisms of latent infection or tolerance. However, the

phenomenon is important for BW epidemiology (Genin and Denny 2012). Indeed, given its high soil persistence and its multiplication within asymptomatic hosts, the pathogen is extremely difficult to eradicate from the field.

Management strategies to control BW-disease, such as rotation of host and non-host crops, have produced significant results. However, they appear ineffective when dealing with strains that have a wide host range (Saddler 2005). Biological control with bacterial phages was also tested and promising results were obtained in controlled conditions (Yamada et al. 2007; Fujiwara et al. 2011; Addy et al. 2012). However, these results have not been validated in the field. Ultimately, the most effective and durable strategy for controlling BW-disease is to breed resistant cultivars. As a result, in recent decades research activities have focused on breeding resistant cultivars. Sources of BW-resistance exist in Solanaceae and have been the subject of in-depth studies in tomato. Within the tomato germplasm, the cultivar Hawaii 7996 is recognized as the most stable source of resistance to BW-disease (Boshou 2005). It was used as the resistant parent of the Hawaii7996 × Wva700 interspecific population in mapping studies that led to the detection of several minor and major resistance QTLs (Thoquet et al. 1996a; Thoquet et al. 1996b; Mangin et al. 1999; Wang et al. 2000; Carmeille et al. 2006; Wang et al. 2013). The major QTLs *Bwr-6* and *Bwr-12* have been detected on chromosomes (chr) 6 and 12, respectively. *Bwr-6* appears to have an effect on a broad-spectrum range of strains, whereas *Bwr-12* has only been detected with phylotype I strains. Other minor QTLs were detected on chr 2, 3, 4, 7, 8, 10, and 11, suggesting the presence of a polygenic system in Hawaii 7996. A high level of resistance was also encountered in pepper germplasm. However, latent infection was more frequently observed in this species than in tomato and eggplant (Lebeau et al. 2010). QTL analysis was conducted on a segregating population and several resistance QTLs were detected on chr 2, 4, 6, 9, 10 and 11 with both additive and epistatic effects. This suggests that the control of resistance in the PM687 *Capsicum annum* resistant parent is complex (Mahbou-Somo-Toukam 2010). In a different pepper population with the resistant parent LS2341, only one major QTL, *Bw1*, was detected on chr 8 (Mimura et al. 2009; Mimura et al. 2012). In eggplant, extensive work has been conducted on the resistant breeding line AG91-25, which is supposed to combine factors of resistance from both *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* species (Ano et al. 1991). A very high level of resistance against some strains of RSSC was observed in this line in climatic chamber conditions (Lebeau et al. 2010) and was later confirmed in greenhouse trials. One major QTL, initially named *ERs1* (Lebeau et al. 2013), appears to have total control over several strains of

phylotype I. *ERs1* was later renamed *EBWR9* due to its position on chr 9 (Salgon et al. submitted). *EBWR9* appears to have specific control of phylotype I strains only. Two other QTLs, *EBWR2* and *EBWR5*, detected on chr 2 and 5, were found to control strains of phylotypes I, IIA and III and phylotypes IIA and III, respectively (Salgon et al. submitted for publication). *EBWR2* was the single QTL detected with the highly virulent strains PSS4 and TO10 (phylotype I). *EBWR2* is more active in the first stage of the infection. It delays disease progression, although it is clearly unable to provide sufficient disease control. Thus, researching additional sources of resistance is necessary for breeding cultivars resistant to this type of strain.

In this perspective, the *Solanum melongena* line EG203 is of particular interest. Indeed, this line was demonstrated to be highly resistant to seven out of 12 strains, including three phylotypes of RSSC (Core-Rs), moderately resistant to four strains and moderately susceptible to one strain (Lebeau et al. 2010). EG203 was also found resistant to a collection of phylotype I strains from Côte d'Ivoire (N'Guessan et al. 2012). Consequently, the objectives of this study were to:

- (i) Genotype a new doubled haploid (DH) population from a cross between a susceptible line and EG203 and construct a dense genetic map anchored on the tomato genome.
- (ii) Map BW-resistance QTLs.
- (iii) Compare the position of the newly detected QTLs with previously reported QTLs in other eggplant populations and solanaceous crops using their orthologous genomes.

The study focuses on resistance to the species *R. pseudosolanacearum* (phylotype I and III) because it seems to cause the most harm in major eggplant producing regions (Ivey et al. 2007; Jeong et al. 2007; Xu et al. 2009; Xue et al. 2011; N'Guessan et al. 2012).

3.1.2 Materials and Methods

3.1.2.1 Plant material and DNA extraction

A DH population of 132 lines was developed using anther culture of F₁ plants from the cross EG203 x MM738. The parent MM738 (E8) is an *S. melongena* line that is highly susceptible to BW. This line was supplied by INRA (Avignon, France) and was also used to

produce the recombinant inbred line population MM738 (E8) × AG91-25 (E6) (Lebeau et al. 2013). The parent EG203 (E4), or Surya, is an *S. melongena* line resistant to a broad range of RSSC strains (Lebeau et al. 2010), in particular to strains pathogenic to AG91-25. It was supplied by AVRDC (Taiwan). Genomic DNA was extracted from dried leaves using the Qiagen DNeasy plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was quantified using a Qubit 2.0 fluorometer (Life Technology) and DNA concentrations were normalized to 50 ng/μl. The quality and homogeneity of DNA were checked using agarose gel electrophoresis.

3.1.2.2 Library construction and sequencing

The 132 DH lines and the two parent lines' DNAs were used for genotyping by sequencing (GBS) using three 96-plex plates. Each plate contained a DNA duplicate of 44 DH lines and both parents. DNAs were digested with the restriction enzyme ApeKI and ligated with barcode adapters according to the protocol developed by Elshire et al. (2011). The adapters comprised a set of one common adapter and 96 unique barcode sequences detailed in Online Resource 1. Each library was sequenced on three lanes of Illumina HiSeq3000 sequencer with DNA-seq single read protocol using the Toulouse Get-plage platform (France).

3.1.2.3 Sequence analysis and identification of SNPs

Low quality reads, reads with uncalled bases and reads with Illumina adapter sequences were removed using cutadapt software (Martin 2011). Remaining reads were checked using the FastQC tool (Andrews 2010). Then, each sequence was attributed to its corresponding individual using unique barcode adapters with the barcode splitter tool (<https://sourceforge.net/projects/gbsbarcode/>). Demultiplexed sequences were trimmed to 140 bp to normalize the length between individuals. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified using the *denovo* pipeline in the STACKS software version 1.28 (Catchen et al. 2011). A list of the SNPs present in at least 40 % of individuals was generated using sequence alignments with the population module. SNPs with an allele frequency of below 5 % in the DH lines were discarded because these very rare variants probably result from genotyping errors. SNPs with a heterozygosity rate > 5 % in the DH lines were also discarded because they probably result from erroneous loci. As DH lines are supposed to be fixed (in

the homozygous state), all lines with a heterozygosity rate $> 10\%$ were discarded. Heterozygous positions in the population were coded as missing data and then imputed using the missForest package (Stekhoven and Bühlmann 2012) in the R software version 3.3.1 (<https://www.r-project.org/>).

3.1.2.4 Genetic map construction

A genetic map was constructed using filtered SNPs with JoinMap® 4.1 software (Van Ooijen 2006). The similarity between each pair of markers was computed. For each pair with similarity = 1, one marker was removed (unaligned markers or markers with the highest rate of missing data) to speed up analysis. The remaining SNPs were grouped with the independence Logarithm of odds (LOD) score option. Two linkage groups were merged if they contained markers with a reciprocal strongest cross link (SCL) value at $\text{LOD} > 3$. Probable mis-grouped markers (with a recombination frequency > 0.6) were discarded. Markers were then ordered with the regression mapping algorithm using the default parameter in JoinMap and the Kosambi function to compute genetic distances. Markers with mean chi-square estimation > 2 and genotype probabilities ($-\text{Log}_{10}(P)$) > 0.10 may contain genotyping errors and do not fit the map very well. Thus, these markers were discarded and linkage groups were re-ordered. The estimated genome length (L) of each linkage group was computed according to the method 4 described by Chakravarti et al. (1991): $L = (m + 1)/(m - 1)$, where m is the number of markers per linkage group. Then, the map coverage was estimated as $c = 1 - e^{-2dn/L}$, where d is the average marker interval, n is the number of markers and L the estimated genome length (Fishman et al. 2001). The loci sequences bearing SNPs were aligned on the eggplant (*Solanum melongena*) genome (SME_r2.5.1; Hirakawa et al., 2014), the tomato (*Solanum lycopersicum*) genome (SL2.50; Sato et al., 2012) and the potato (*Solanum tuberosum*) genome (PGSC_DM_v4.03; Xu et al., 2011) using the Blastn program in the NCBI's BLAST+ v 2.2.28 software (Camacho et al. 2009) with a cut-off value of 1×10^{-20} for the eggplant genome and 1×10^{-15} for the tomato and potato genomes. A map was drawn using MapChart 2.2 (Voorrips 2002).

3.1.2.5 Bacterial strains and inoculum preparation

Two strains, PSS4 and RUN3598 (R3598), belonging to the *Ralstonia pseudosolanacearum* species were used in this study. The PSS4 strain is a phylotype I

sequevar 15 (I-15) from Taiwan, which bypasses major QTL *EBWR9* (Salgon et al. submitted for publication), and the R3598 strain is a phylotype III sequevar 29 (III-29) from Cameroon, which was found to be virulent on the AG91-25 line in the field (unpublished data). The strains were grown on 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride medium (Kelman 1954) for 24h at 28°C for the inoculum preparation. The actively growing bacteria were harvested and diluted in Tris buffer (Trizma 0.01 M pH 7.2: Sigma, St Louis, USA) to obtain a final concentration of 1×10^8 colony-forming unit (CFU) per mL, which was measured using spectrophotometry ($OD_{600nm} = 0.1$).

3.1.2.6 Greenhouse trials and phenotyping

Phenotyping trials were conducted in two greenhouses at the experimental station at the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) in Saint-Pierre, Reunion Island (140 m elevation, 21°S, 55.3°E) and in one greenhouse split in two blocks at the experimental station run by the Technisem Company in Yaoundé, Cameroon (690 m elevation, 3.7°N, 11.6°E). Trials in Reunion Island were conducted during two seasons in the two greenhouses (representing four repetitions). In Reunion Island, the trial in season 1 was conducted in November 2016 with a mean Temperature (T) = 27 ± 8 °C and mean Relative Humidity (RH) = 73 ± 23 % and the trial in season 2 was conducted in May 2016 with T = 25 ± 7 °C and RH = 82 ± 21 %. Trials in Cameroon were conducted in two seasons in the two blocks, representing four repetitions. In Cameroon, the trial in season 1 was conducted in March-April 2016 with T = 32 ± 10 °C and RH = 66 ± 28 % and the trial in season 2 was conducted in May-June 2016 with T = 28 ± 7 °C and RH = 74 ± 23 %. For both locations, each repetition contained 100 plants of the E8 (MM738) and E4 (EG203) parental lines, 20 plants of the $F_1(E4 \times E8)$, 100 plants of $F_2(E4 \times E8)$, 100 plants of each backcross (BC_1E8 and BC_1E4) and 5 plants of each 123 DH lines. Twenty plants of each eggplant control accession, MM152 (E3), AG91-25 (E6), S56B (E9) and MM136 (E10) were used to evaluate the strains' aggressiveness and virulence. Three-week old plantlets were transplanted in the greenhouse according to a randomized complete block design. After two weeks of acclimatization in the greenhouse, the plants' roots were scarified with a knife just before inoculation in order to ensure satisfactory infestation. Each plant was inoculated with 100-200 mL at 10^6 CFU per mL through the drip irrigation system in Reunion Island. In Cameroon, inoculation was conducted manually with 30 mL at 4×10^6 CFU per mL. Disease symptoms were evaluated twice a week. The trials lasted 33 days in

Reunion Island and 40 days in Cameroon. A disease scoring scale from 0 to 4 was used, as defined in Lebeau et al. (2013). A plant was considered to have wilted if the score was above 0. At the end of each trial, the presence of latent infection (colonization) was tested, as described in Lebeau et al. (2013).

3.1.2.7 Statistical analysis of traits

All the descriptive statistics were carried out using the R software. The score (SCO), which is the mean of the disease scoring rate (scale from 0 to 4), the percentage of wilted plants (W) and the percentage of colonized plants (CI) were computed for each of the lines and progenies. The lines and progenies were attributed to one of the six phenotypic groups (P_g) using a hierarchical clustering method, as defined in Lebeau et al. (2010): 1 = highly resistant, 2 = moderately resistant, 3.1 = partially resistant, 3.2 = latent infection, 4 = moderately susceptible, 5 = highly susceptible. The area under the disease progress curve (AUDPC) was computed for the score (SCO_a) and wilting percentage (W_a) as follows: $\sum_{i=1}^{n-1} \frac{X_i + X_{i+1}}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \times \frac{1}{t_n - t_1}$, where X_i is the SCO or W value at the i^{th} date, t_i was the time at the i^{th} observation and n the total number of observations. The Pearson coefficient of correlation was computed between maximal SCO (SCO_{max}), maximal W (W_{max}), CI, SCO_a and W_a variables. Analysis of variance (anova) was conducted on the SCO_{max} , the W_a and the CI variable using the lme4 package (Bates et al. 2014). The CI was analyzed as a binomial variable (plants were scored as colonized or non-colonized) with a generalized linear model (glm), whereas the SCO_{max} and W_a were analyzed with a linear model (lm). Anova was conducted on variables computed for individual seasons, as well as across the seasons (comb). The following models were used: $y_{ij} = \mu + G_i + R_j + \varepsilon_{ij}$ and $y_{ijk} = \mu + G_i + R_j + S_k + (G \times S)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$ for individual seasons and across the seasons, respectively. Y is the observed value for the given variable, μ is the mean value, G , S , R , $G \times S$ are the genotype, season, repetition nested in season, interaction between genotype and season effects, respectively, and ε is the random error. The chi-square test was used to test the significance of effects. Broad-sense heritabilities (h^2) and their Bayesian confidence interval were estimated with the MCMCglmm package (Hadfield 2010) with a number of Markov chain Monte Carlo (MCMC) iteration fixed to 500,000. The SCO_{max} , SCO_a and W_a were analyzed with a distribution assumed as “Gaussian” and the W_{max} and CI were analyzed with a distribution assumed as “ordinal”. For individual seasons and across the seasons,

respectively, h^2 was calculated as follows: $h^2 = \frac{V_G}{V_G + \frac{V_e}{j}}$ and $h^2 = \frac{V_G}{V_G + \frac{V_{G \times S}}{k} + \frac{V_e}{j \times k}}$ where V_G is the genotypic variance, $V_{G \times S}$ is the variance of genotype season interaction, V_e is the environment variance, j is the number of repetitions in a season ($j = 2$) and k is the number of seasons ($k = 2$). For analysis of binary variables, an additional source of variance of 1 due to the probit link was added to the formulae: $h^2 = \frac{V_G}{V_G + \frac{V_e}{j} + 1}$ and $h^2 = \frac{V_G}{V_G + \frac{V_{G \times S}}{k} + \frac{V_e}{j \times k} + 1}$. The best linear unbiased predictors (BLUPs) were extracted from the same models (described above) with G and $G \times S$ as the random effect and S and R as the fixed effect. BLUPs were extracted only for the SCO_a and W_a because they were the only variables with continued and Gaussian distribution.

3.1.2.8 QTL analysis

QTL analysis was performed using the R/qtl package version 1.39 (<http://www.rqtl.org/>; Broman et al. 2003). The SCO_{max} , the BLUP of W_a and the CI traits were analyzed with simple interval mapping (SIM, Lander and Botstein, 1989) with a 1 cM step. Variables with near-normal distribution were analyzed with the normal model and the Haley & Knott (hk) regression (Haley and Knott 1992). Variables with skewed distribution were analyzed with the non-parametric model implemented in the “scanone” function of R/qtl. The LOD threshold for declaring significant QTLs was determined using a permutation test with 1,000 repetitions for a significance level of $P \leq 0.05$ (Churchill and Doerge 1994). Variables were analyzed using multiple QTL mapping (MQM) with the automated stepwise model selection implemented in the “stepwiseqtl” function (Manichaikul et al. 2009). Then, 2D permutation tests of 1,000 repetitions were run using the hk regression with the “scantwo” function. The function gives the penalties to be used in the stepwise analysis. Models with a maximum of 8 QTLs with both additive and epistatic effects were tested in the MQM analysis. Variables with near-Gaussian distribution were analyzed with a normal model. Variables with severe deviations from normality were analyzed with a binary model. In this way, the SCO_{max} was coded as “0” when the value was = 0 and “1” when the value was > 0 and renamed SCO_b . The W_a was also coded in the same way as SCO_{max} . However, as the two binary variables were 100 % correlated, only one of them (SCO_b) was used for analysis. The CI were coded as “0” when the value was = 0 and “1” elsewhere and renamed CI_b or coded as “0” when the value was < 10 and “1” elsewhere and renamed CI_{10b} . For both SIM and MQM analysis, the

positions of the detected QTLs were refined using the “refineqtl” function and variance components were estimated with the “fitqtl” function. For each QTL, the 95 % Bayesian credible intervals were calculated using the “bayesint” function. Digenic epistatic interactions between QTL pairs were examined by constructing plots of means with the “effectplot” function of R/qtl. The digenic interactions were further analyzed by comparing the mean variables for “AA” (E8) and “BB” (E4) genotypes at each pair of QTL (represented by its closest marker), using Fisher’s least-significant-difference test (LSD) (Hayter 1986). The QTLs detected were named the ERPR “linkage group” (ERPR for Eggplant *Ralstonia Pseudosolanacearum* Resistance). When several QTLs were detected on the same LG at different positions, a letter was added to their QTL name for identification purposes.

3.1.3 Results

3.1.3.1 A dense new anchored genetic map for eggplant

Sequencing of GBS libraries generated a total of 3.4×10^9 150 bp reads. The fastQC analysis conducted on cleaned reads revealed the absence of remaining Illumina adapters. After the cleaning and the demultiplexing step, 56 % of the initial reads were discarded, 20×10^6 and 23×10^6 reads were attributed to the E8 and E4 parent, respectively. The DH lines contained a mean of 9.9×10^6 reads with a minimum of 1.8×10^6 and a maximum of 19.6×10^6 (for more details, see Online Resource 1). From these reads, 1,370 SNPs genotyped for 123 DH lines were analyzed using JoinMap. The markers formed 13 linkage groups (LG) at independence LOD from 4 to 6. Two LG were merged because they had reciprocal SCL values at LOD > 3. The resulting 12 LG have a total of 1,170 SNPs. Among the 1,170 loci sequences bearing SNPs, 1,154 (98.6 %) are aligned on eggplant’s contigs, 505 (43.2 %) are aligned on the potato genome, 456 (39 %) are aligned on the tomato genome and 325 (28 %) are aligned on the pepper genome. Thanks to these anchor markers, the 12 LG could be tracked back to the 12 eggplant chromosomes (E01 to E12), defined by Hirakawa et al. (2014) and anchored on the tomato genome (Fig. 1). The LG lengths range from 91.39 to 167.34 cM and harbor 53 to 141 SNPs. The map has a high density with an average of one SNP every 1.25 cM. Chromosomes E08, E09, E11 and E12 have large gaps (> 10 cM). E09 has the largest gap with a distance of 34.90 cM between two adjacent SNPs. The new genetic map has 7.44 % of distorted SNPs ($P < 0.05$) and E10 has the highest number of distorted SNPs (29 %). Among the 33,873 eggplant contigs belonging to 56 eggplant/tomato syntenic blocks (sb), 863 contigs covering 55 sb are anchored in our map. The map is estimated to cover 86 %

of the genome. Statistics of the map are provided in Online Resource 2 and genotypic data are detailed in Online Resource 3.

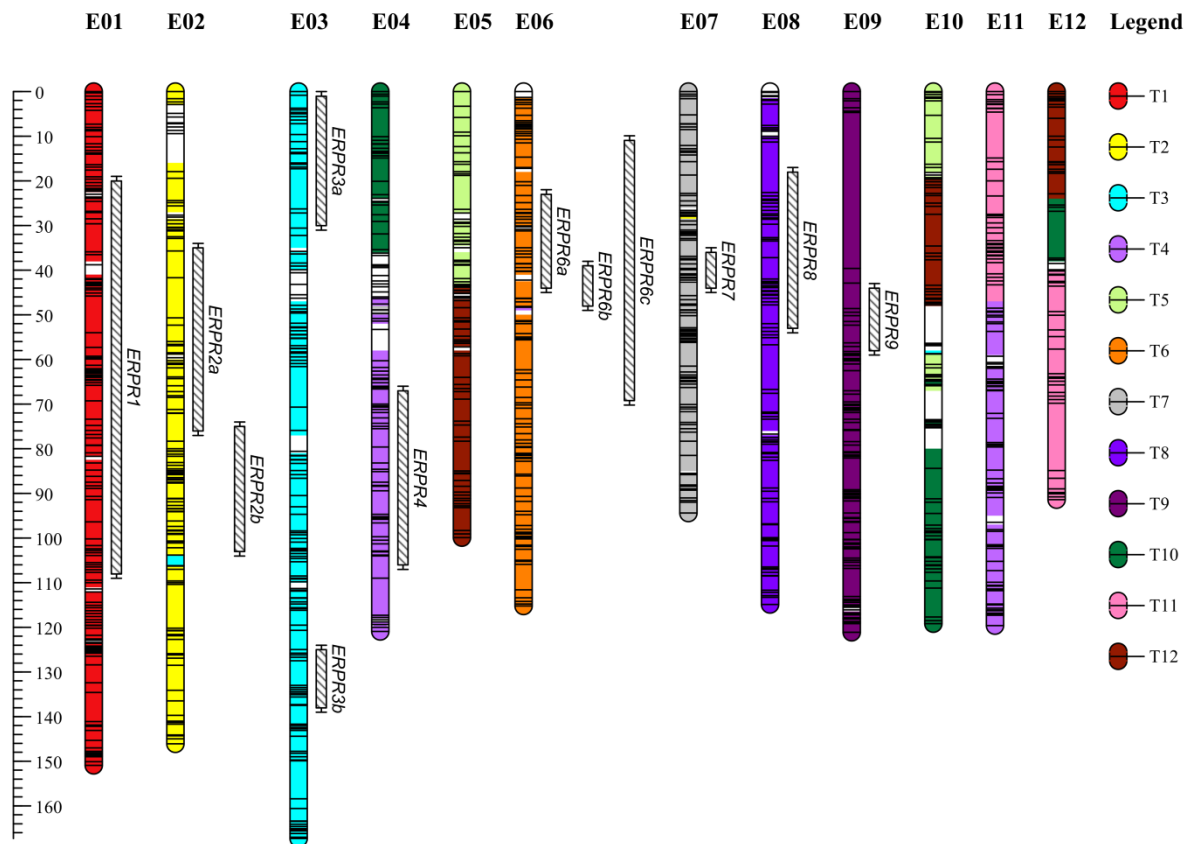


Fig. 1: Genetic map of EG203 x MM738 DH population anchored on eggplant and tomato chromosomes. The figure shows the 12 LG/chromosomes from E01 to E12 and their corresponding tomato chromosomes, as indicated by color code on the right of the figure. Markers' positions are symbolized as horizontal lines on the LG bars, but markers' names were not included to facilitate visibility on the map. The list and positions of all markers can be found in Online Resource 3. The QTLs detected and their confidence intervals are represented on the right of their respective chromosome by black hatched bars. The QTL names are on the right of each QTL bar.

3.1.3.2 Segregation of resistance in the DH population

The SCO_{max} and W_{max} variables were highly correlated in individual seasons and across the seasons in both the Reunion Island and Cameroon trials (Pearson correlation coefficient from 0.93 to 0.99, Online Resources 4 and 5). In the same way, the SCO_a and W_a variables were highly correlated (Pearson correlation coefficient from 0.98 to 0.99). On the basis of these high correlations, our study only presents analyses for the SCO_{max} , W_a and CI variables.

Frequency distributions for W_a and CI variables are indicated in Online Resource 6 (individual seasons) and Fig. 2 (data combined across seasons). Distributions for the SCO_{max} are very similar to distributions of W_a and are not presented.

With PSS4 (I-15) tested in Reunion, the frequency distributions of BLUPs of W_a and CI were continuous and approximately fitted to a Gaussian curve (Fig. 2a, Fig. 2b). The BLUPs of W_a was skewed toward the resistant parent (E4) with the F_1 position intermediate between E8 and E4 (Fig. 2a), whereas CI was skewed toward the susceptible parent (E8) with F_1 positioned close to the E8 parent (Fig. 2b). The E8 parent was highly susceptible in both seasons, whereas E4 was highly resistant in season 1 and moderately resistant in season 2 (Table 1, Online Resources 6a,b,c,d). The backcross with susceptible parent E8 (BC_1E8) was highly susceptible, whereas the backcross with the resistant parent E4 (BC_1E4) was moderately resistant. The F_1 , F_2 , and DH progenies were moderately susceptible in both seasons. Among the controls, E9 was the most resistant, whereas E10 was the most susceptible. The susceptibility of E6 (AG91-25) to PSS4 strain, observed by Lebeau et al. (2013), was confirmed in both seasons. Anova revealed a highly significant genotypic (G) effect ($P < 0.001$) for the three variables in both individual and combined seasons (Table 2). The repetition (R) effect was not significant for SCO_{max} and W_a , but was significant for CI ($P < 0.01$ and $P < 0.001$ in individual and combined seasons, respectively). The season (S) effect was highly significant for all three variables ($P < 0.001$). The interaction between genotype and season effects ($G \times S$) was significant ($P < 0.05$ for CI and $P < 0.01$ for SCO_{max} and BLUPs of W_a). The h^2 ranged from 0.34 to 0.70 for season 1, from 0.36 to 0.58 for season 2 and from 0.50 to 0.71 for combined seasons (Table 2).

With R3598 (III-29) tested in Cameroon, the frequency distributions did not fit a Gaussian curve (Fig. 2c, Fig 2d). The BLUPs of W_a was highly skewed toward resistance (Fig. 2c) with parents E8 and E4 positioned very close to each other. CI was also skewed toward resistance, but the parents were located near the extremes (Fig. 2d). According to the phenotypic groups (P_g) generated by fuzzy analysis (Table 1), E8 was tolerant ($P_g = 3.2$, latent infection) in season 1 and moderately susceptible in season 2, whereas E4 ($P_g = 1$) was highly resistant in both seasons. F_1 was also highly resistant in both seasons ($P_g = 1$), suggesting a dominant inheritance of resistance. F_2 was moderately resistant in season 1 ($P_g = 2$) and tolerant in season 2 ($P_g = 3.2$). BC_1E8 was tolerant ($P_g = 3.2$), whereas BC_1E4 ($P_g = 1$) was highly

resistant in both seasons. In the controls, E9 was the most resistant ($P_g = 1$ for both seasons) and E10 was the most susceptible, although its phenotypic group is tolerant ($P_g = 3.2$).

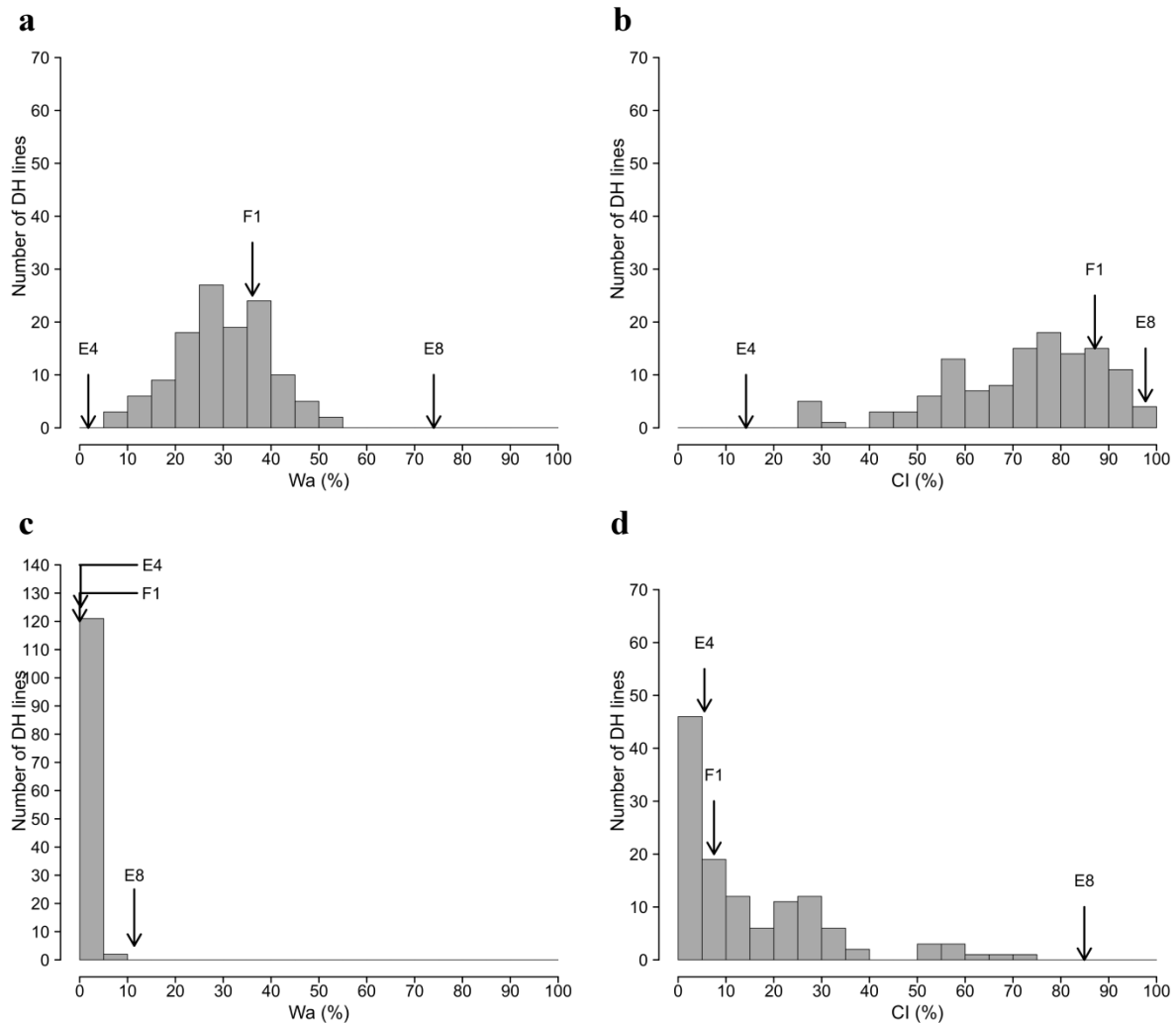


Fig. 2: Frequency distributions of W_a and CI variables in the EG203 x MM738 DH population inoculated with strains PSS4 (Reunion assay) and R3598 (Cameroon assay). Data are combined across seasons. The frequency distribution of W_a and CI variables are presented, respectively, in (a), (b) for strain PSS4 and (c), (d) for strain R3598; arrows indicate the means of susceptible parent E8 (MM738), resistant parent E4 (EG203) and their F_1 ($E4 \times E8$). The W_a variable was obtained from the best linear unbiased predictor (BLUP) model for strain PSS4.

Table 1: Mean and standard deviation (in parenthesis) for parental lines, progenies of cross EG203 (E4) x MM738 (E8) and control lines, challenged with PSS4 and R3598 *R. pseudosolanacearum* strains.

Strain	Season	Var ^a	Parents		Progenies of E8×E4					Control lines			
			E8	E4	F ₁	F ₂	BC ₁ E8	BC ₁ E4	DH	E3	E6	E9	E10
PSS4	1	SCO _{max}	3.7 (0.1)	0.0 (0.0)	2.2 (0.4)	2.2 (0.1)	3.6 (0.1)	0.6 (0.0)	1.8 (0.1)	0.3 (0.0)	2.2 (1.0)	0.0 (0.0)	3.7 (0.1)
		W _a	71.5 (2.1)	0.4 (0.4)	35.2 (4.8)	38.1 (2.0)	63.7 (1.2)	12.7 (1.8)	34.3 (1.0)	7.4 (0.5)	39.3 (18.9)	0.0 (0.0)	67.6 (1.7)
		CI	95.3 (2.7)	4.1 (2.0)	87.1 (7.1)	75.6 (1.9)	94.0 (3.0)	38.2 (7.3)	73.7 (1.2)	15.4 (0.4)	90.0 (0.0)	17.2 (12.2)	92.5 (2.5)
		P _g	5	1	4	4	5	2	4	2	4	1	5
	2	SCO _{max}	4.0 (0.0)	0.2 (0.1)	2.3 (0.4)	2.6 (0.2)	3.5 (0.1)	0.5 (0.2)	2.7 (0.1)	0.6 (0.4)	3.4 (0.4)	0.2 (0.2)	3.3 (0.3)
		W _a	76.6 (0.7)	3.3 (1.2)	37.0 (8.6)	46.0 (5.3)	62.2 (2.9)	8.5 (2.0)	41.4 (1.4)	13.6 (9.6)	60.3 (12.5)	2.4 (2.4)	57.8 (9.2)
		CI	100.0 (0.0)	24.4 (8.2)	87.1 (2.9)	76.4 (6.3)	93.4 (3.6)	29.9 (9.7)	82.0 (1.4)	49.1 (14.1)	95.0 (5.0)	37.2 (7.2)	89.4 (0.6)
		P _g	5	2	4	4	5	2	4	2	5	2	5
	Comb	SCO _{max}	3.8 (0.1)	0.1 (0.1)	2.2 (0.2)	2.4 (0.2)	3.5 (0.1)	0.6 (0.1)	2.2 (0.1)	0.5 (0.2)	2.8 (0.6)	0.1 (0.1)	3.5 (0.2)
		W _a	74.0 (1.7)	1.8 (1.0)	36.1 (4.1)	42.0 (3.2)	62.9 (1.4)	10.6 (1.6)	34.3 (1.0)	10.5 (4.3)	49.8 (11.1)	1.2 (1.2)	62.7 (4.7)
		CI	97.7 (1.7)	14.2 (6.8)	87.1 (3.1)	76.0 (2.7)	93.7 (1.9)	34.0 (5.5)	73.7 (1.2)	32.2 (11.3)	92.5 (2.5)	27.2 (8.2)	91.0 (1.4)
		P _g	5	1	4	4	5	2	4	2	4	2	5
R3598	1	SCO _{max}	1.3 (0.6)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.6 (0.3)	0.0 (0.0)	0.1 (0.0)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.6 (0.6)
		W _a	11.4 (6.2)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.4 (0.4)	4.9 (2.7)	0.0 (0.0)	0.5 (0.1)	2.4 (2.4)	0.2 (0.2)	0.0 (0.0)	3.9 (3.9)
		CI	77.8 (15.8)	2.0 (2.0)	5.0 (5.0)	21.0 (3.0)	61.0 (5.0)	4.0 (1.0)	16.3 (1.1)	2.6 (2.6)	40.0 (0.0)	0.0 (0.0)	74.7 (14.7)
		P _g	3.2	1	1	2	3.2	1	1	1	2	1	3.2
	2	SCO _{max}	1.6 (0.4)	0.1 (0)	0.0 (0.0)	0.4 (0.2)	0.4 (0.1)	0.0 (0.0)	0.1 (0.0)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.1 (0.1)	0.4 (0.3)
		W _a	11.5 (3.1)	0.2 (0.2)	0.0 (0.0)	2.4 (1.2)	2.5 (0.7)	0.0 (0.0)	0.4 (0.1)	0.9 (0.9)	0.1 (0.1)	0.7 (0.7)	3.3 (2.2)
		CI	92.0 (6.0)	9.0 (3.0)	10.0 (0.0)	61.0 (8.0)	81.0 (8.0)	6.0 (1.0)	12.1 (1.3)	27.5 (7.5)	20.0 (5.0)	10.0 (0.0)	72.5 (12.5)
		P _g	4	1	1	3.2	3.2	1	1	2	2	1	3.2
	Comb	SCO _{max}	1.5 (0.3)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.2 (0.1)	0.5 (0.2)	0.0 (0.0)	0.1 (0.0)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.5 (0.3)
		W _a	11.4 (2.8)	0.1 (0.1)	0.0 (0.0)	1.4 (0.8)	3.7 (1.3)	0.0 (0.0)	0.5 (0.1)	1.6 (1.1)	0.2 (0.1)	0.3 (0.3)	3.6 (1.8)
		CI	84.9 (8.0)	5.5 (2.5)	7.5 (2.5)	41.0 (12.1)	71.0 (6.9)	5.0 (0.8)	16.3 (1.1)	15.1 (7.9)	30.0 (6.1)	5.0 (2.9)	73.6 (7.9)
		P _g	4	1	1	2	3.2	1	1	1	2	1	3.2

^a Variables presented include the maximal score (SCO_{max}), area under disease progress curve for incidence (W_a), expressed as a percentage and colonization index (CI), expressed as a %. The phenotypic groups (P_g) were estimated using fuzzy analysis clustering as described in Lebeau et al. (2010).

As SCO_{max} and W_a could not be approximated by a Gaussian model, anova was only conducted on the binary CI variable (0 for non-colonized and 1 for colonized). The genotype effect for CI was highly significant in both individual and combined seasons ($P < 0.001$, Table 2). In combined seasons, Genotype, Season, Repetition and $G \times S$ effects were all significant with h^2 ranging from 0.39 to 0.56 (Table 2).

Table 2: Sources of phenotypic variation (Anova analysis) and estimates of heritabilities (broad sense) for SCO_{max} , W_a and CI of EG203 x MM738 DH population.

Strain	Season	Var ^a	Sources of variations ^b				h^2 [Interval] ^c
			G	S	R	$G \times S$	
PSS4	1	SCO_{max}	***	-	ns	-	0.68 [0.56-0.79]
		W_a	***	-	ns	-	0.70 [0.59-0.80]
		CI	***	-	**	-	0.34 [0.23-0.45]
	2	SCO_{max}	***	-	ns	-	0.57 [0.41-0.72]
		W_a	***	-	ns	-	0.58 [0.42-0.72]
		CI	***	-	**	-	0.36 [0.23-0.49]
	Comb	SCO_{max}	***	***	ns	**	0.71 [0.59-0.80]
		W_a	***	***	ns	**	0.70 [0.57-0.80]
		CI	***	***	***	*	0.50 [0.40-0.60]
R3598	1	SCO_{max}	-	-	-	-	-
		W_a	-	-	-	-	-
		CI	***	-	ns	-	0.53 [0.36-0.68]
	2	SCO_{max}	-	-	-	-	-
		W_a	-	-	-	-	-
		CI	***	-	**	-	0.56 [0.41-0.69]
	Comb	SCO_{max}	-	-	-	-	-
		W_a	-	-	-	-	-
		CI	***	***	*	**	0.39 [0.26-0.53]

^a The variables presented include the maximal score (SCO_{max}), the area under disease progress curve for wilting incidence (W_a), expressed as a percentage and the colonization index (CI), expressed as a %.

^b Effects included in anova: Genotype effect (G), season effect (S), repetition effect (R) and interaction between genotype and season ($G \times S$). A linear model was used on SCO_{max} and a linear mixed model was used on W_a , assuming a normal distribution with strain PSS4. A generalized linear model was used for CI, assuming a binomial distribution with both strains. In the mixed model, the S and R effects were considered as fixed, whereas the G and $G \times S$ effects were considered random.

^c Broad-sense heritabilities and their 95 % Bayesian confidence interval were estimated.

*, **, ***: Significant at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

- Not estimated.

3.1.3.3 A polygenic system of resistance involved in the control of PSS4 and R3598 strains

Given the different patterns of distribution in the Reunion (strain PSS4) and Cameroon (R3598) trials, different analytical models were used to detect the QTLs involved in the resistance to each strain.

For PSS4 (I-15) data, SCO_{max} , BLUP W_a and CI variables were first analyzed using SIM with a normal model. According to the season and the variable, six QTLs of resistance to PSS4 were identified (Online Resource 7). These QTLs explained from 9.3 to 19.2 % of the phenotypic variance (R^2). Significant epistatic interactions were found between the QTLs detected. Models including the QTLs' additive and epistatic effects explain up to 35.7 % of the total phenotypic variance. The QTLs detected were season-dependent. However, when decreasing the LOD threshold ($P < 0.1$), common QTLs were found between seasons (data not shown). These results suggest that there is a polygenic system of resistance that is highly influenced by environmental conditions. The existence of a polygenic system was confirmed by using a multiple QTL mapping (stepwise analysis), for which a total of 11 QTLs were detected (Table 3).

In season 1, a single QTL (*ERPR3a*) was detected with SCO_{max} and BLUP of W_a , whereas seven QTLs, including *ERPR3a* (*ERPR1*, *ERPR2a*, *ERPR3b*, *ERPR4*, *ERPR6a* and *ERPR7*), detected with CI explained from 4.8 % (*ERPR1*) to 17 % (*ERPR3b*) of the phenotypic variance. A significant epistatic interaction between *ERPR4* and *ERPR6a* was detected and accounted for 4 % of the phenotypic variance. The models that include all detected QTLs explained 13.2 (SCO_{max}), 11.9 (W_a) and 65.4 % (CI) of the total phenotypic variance.

In the second season, four QTLs (named *ERPR2b*, *ERPR4*, *ERPR6b* and *ERPR8*) were detected with both SCO_{max} and BLUP of W_a , whereas a single QTL (*ERPR1*) was detected with CI (Table 3). These QTLs explained from 8 % (*ERPR4*) to 25.3 % (*ERPR6b*) of the phenotypic variance. The models explained 45.7, 40.4 and 10.9 % of the total phenotypic variance, respectively for SCO_{max} , W_a and CI.

In combined seasons, five QTLs (*ERPR2b*, *ERPR3a*, *ERPR4*, *ERPR6b* and *ERPR8*), four QTLs (*ERPR2b*, *ERPR4*, *ERPR6b* and *ERPR8*), and six QTLs (*ERPR1*, *ERPR2b*, *ERPR3a*, *ERPR3b*, *ERPR4* and *ERPR6a*) were detected with the SCO_{max} , W_a , and CI, respectively (Table 3, Fig. 1). The QTLs detected explained from 6.4 % (*ERPR3a*) to 21.7 % (*ERPR6b*) of

the total phenotypic variance. The models that included all the QTLs detected were able to explain 54.0, 44.9 and 56.9 % of the total variance.

For data generated with the R3598 (III-29) strain, the SCO_{max} , W_a and CI variables were also analyzed first using SIM with a non-parametric model (Online Resource 8). One QTL (*ERPR3a*) was detected for SCO_{max} , W_a and CI in the first season and only for CI in combined seasons. Another QTL (*ERPR9*) was only detected in the second season for SCO_{max} and CI.

Table 3: QTLs of resistance to PSS4 and R3598 strains, detected by multiple QTL mapping (stepwise model) for the EG203 x MM738 DH population, on individual seasons and across the seasons (Comb).

Strains	Season	Var ^a	Chr ^b	QTL ^c	Pos ^d	Nearest marker	Interval ^e	LOD	R ^{2f}	Add effect ^g	Total R ^{2h}
PSS4	1	SCO_{max}	E03	<i>ERPR3a</i>	16.0	s296164	3.0-29.0	3.8	13.2	-0.38***	13.2
		W_a	E03	<i>ERPR3a</i>	16.0	s296164	2.0-27.2	3.4	11.9	-9.11***	11.9
		CI	E01	<i>ERPR1</i>	76.8	s219212	47.0-88.3	3.5	4.8	-4.96***	65.4
			E02	<i>ERPR2a</i>	40.0	s135116	34.0-77.0	4.1	5.7	-5.55***	
			E03	<i>ERPR3a</i>	4.1	s227496	0.0-13.0	7.3	10.8	-7.69***	
			E03	<i>ERPR3b</i>	126.7	s231411	125.8-140.0	10.7	17.0	-9.49***	
			E04	<i>ERPR4</i>	101.3	s46892	99.0-102.0	8.5	13.0	-7.23***	
			E06	<i>ERPR6a</i>	23.0	s902	22.0-33.0	10.2	16.0	-7.32***	
			E07	<i>ERPR7</i>	41.6	s272460	35.0-45.0	6.4	9.4	-6.87***	
			Epistasis	<i>ERPR4:ERPR6a</i>				2.9	4.0	-4.65***	
	2	SCO_{max}	E02	<i>ERPR2b</i>	98.4	s51429	94.0-104.0	5.5	12.3	-0.33***	45.7
			E04	<i>ERPR4</i>	79.0	s400	68.0-92.0	5.0	11.2	-0.32***	
			E06	<i>ERPR6b</i>	40.0	s431	38.0-43.0	9.9	25.3	-0.48***	
			E08	<i>ERPR8</i>	23.4	s105566	18.0-28.6	5.0	11.5	-0.31***	
		W_a	E02	<i>ERPR2b</i>	98.4	s51429	94.0-103.0	5.7	13.8	-3.86***	40.4
			E04	<i>ERPR4</i>	88.4	s208766	74.0-105.0	4.2	8.0	-2.93***	
			E06	<i>ERPR6b</i>	41.0	s147256	38.6-49.0	7.5	16.8	-4.41***	
			E08	<i>ERPR8</i>	23.4	s105566	18.0-54.0	4.7	11.0	-3.50***	
		CI	E01	<i>ERPR1</i>	38.8	s231295	19.0-109.0	3.1	10.9	-5.83***	10.9
	Comb	SCO_{max}	E02	<i>ERPR2b</i>	98.4	s51429	82.0-102.2	6.2	12.1	-0.30***	54.0
			E03	<i>ERPR3a</i>	21.0	s168838	2.0-31.0	3.5	6.4	-0.23***	
			E04	<i>ERPR4</i>	71.3	s53085	66.0-97.0	5.5	10.5	-0.29***	
			E06	<i>ERPR6b</i>	40.0	s431	39.0-42.2	10.3	21.7	-0.43***	
			E08	<i>ERPR8</i>	23.4	s105566	18.0-28.6	5.5	10.4	-0.28***	
		W_a	E02	<i>ERPR2b</i>	98.4	s51429	79.0-102.2	5.0	11.4	-3.29***	44.9
			E04	<i>ERPR4</i>	97.0	s311121	68.0-107.0	4.8	10.9	-3.26***	
			E06	<i>ERPR6b</i>	40.3	s147256	39.0-43.0	7.7	18.5	-4.28***	
			E08	<i>ERPR8</i>	23.4	s105566	17.0-50.0	4.6	10.4	-3.17***	
		CI	E01	<i>ERPR1</i>	68.0	s168619	43.3-84.2	4.5	7.9	-4.98***	56.9
			E02	<i>ERPR2b</i>	87.7	s131841	74.0-99.2	5.0	8.9	-5.13***	
			E03	<i>ERPR3a</i>	4.1	s227496	2.0-27.0	4.5	7.8	-4.98***	
			E03	<i>ERPR3b</i>	127.5	s231125	124.0-130.0	7.1	13.1	-6.37***	
			E04	<i>ERPR4</i>	71.0	s53085	66.6-79.6	6.6	12.0	-6.22***	
			E06	<i>ERPR6a</i>	39.4	s56388	26.0-45.0	6.5	11.9	-6.19***	

Table 3: Continued

Strains	Season	Var ^a	Chr ^b	QTL ^c	Pos ^d	Nearest marker	Interval ^e	LOD	R ^{2f}	Add effect ^g	Total R ^{2h}
R3598	1	SCO _b	E03	<i>ERPR3a</i>	4.7	s231544	0.0-28.0	3.2	11.4	-1.09***	11.4
		CI _{10b}	E03	<i>ERPR3a</i>	5.0	s197676	2.0-7.2	9.4	29.7	-1.34***	29.7
		CI _b	E03	<i>ERPR3a</i>	5.0	s197676	3.0-7.2	7.3	21.4	-1.39***	31.3
	2		E06	<i>ERPR6c</i>	46.0	s681	39.0-65.0	4.3	12.0	-1.06***	
		SCO _b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		CI _{10b}	E09	<i>ERPR9</i>	51.5	s75856	42.9-59.1	4.4	15.0	-0.95***	15.0
		CI _b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Comb	SCO.b	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
		CI10.b	E03	<i>ERPR3a</i>	4.1	s227496	0.0-7.0	8.0	25.8	-1.20***	25.8
		CI.b	E03	<i>ERPR3a</i>	5.0	s197676	0.0-14.0	4.0	12.6	-1.04***	21.6
			E06	<i>ERPR6c</i>	46.0	s681	9.9-70.2	3.3	10.3	-0.91***	

^a The variables used are the maximal score (SCO_{max}), the Blup of area under disease progress curve for wilting percentage (Wa) and the colonization index (CI).

^b Linkage groups named according to their chromosome correspondence.

^c Name of the QTL: Eggplant *Ralstonia Pseudosolanacearum* Resistance (ERPR) followed by the chromosome number. When several QTLs are detected on the same chromosome, a letter follows the QTL name for identification purposes.

^d Position of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM).

^e 95% Bayesian confidence interval (cM).

^f Estimates of the percentage of phenotypic variance explained by the QTL detected.

^g Additive effect: a positive value indicates that resistance comes from the E8 (MM738) allele. A negative value indicates that resistance comes from the E4 (EG203) allele.

^h Estimate of the total percentage of phenotypic variance explained by the additive model.

ns: QTLs not detected above the LOD threshold.

The variables were then coded as binary and the resulting SCO_b, CI_{10b} and CI_b variables were used for the stepwise analysis (Table 3). In the first season, one QTL (*ERPR3a*) was detected for SCO_b and CI_{10b}, which explains 11.4 and 29.7 % of the total variance, respectively. Two QTLs (*ERPR3a*, *ERPR6c*) were detected for CI_b, explaining 21.4 and 12.0 % of phenotypic variance individually and 31.3 % combined. *ERPR3a* and *ERPR6c* were also detected for the combined season for the CI_b variable, which explains 12.6 and 10.3 % of phenotypic variance, respectively. *ERPR3a*, the only QTL detected for CI_{10b}, explained 25.8 % of phenotypic variance for the combined seasons. Only one QTL was detected in season 2. This QTL, *ERPR9*, was specifically detected for CI_{10b} and explained 15.0 % of phenotypic variance.

Taken together, these results suggest that there are several QTLs, which control resistance to PSS4 with minor to medium effects, and only a few QTLs, which control resistance to R3598. Resistance to both strains is controlled by a common QTL (*ERPR3a*), as well as by three QTLs (*ERPR6a*, *b*, *c*), which are almost co-localized. Results indicate the strong influence of the seasons on the expression of resistance. The negative additive effects found for all the QTLs detected (Table 3) indicate that resistance is exclusively controlled by E4 (EG203) alleles. As expected, no QTLs of resistance originate from E8, the highly susceptible MM738 parent.

3.1.3.4 Epistatic effects influence resistance to PSS4 strain

In order to identify putative digenic interactions, which are not detected by the stepwise analysis, interaction plots (effectplots) between each pair of QTLs detected were constructed for SCO_{max} for combined seasons. The graphs in Online Resource 9 suggest digenic interactions between *ERPR2b/ERPR6b* (9c), *ERPR2b/ERPR8* (9d), *ERPR3a/ERPR6b* (9f), *ERPR3a/ERPR8* (9g), *ERPR4/ERPR6b* (9h) and *ERPR4/ERPR8* (9i). The LSD test confirmed the *ERPR2b/ERPR6b*, *ERPR2b/ERPR8*, *ERPR3a/ERPR6b*, *ERPR3a/ERPR8* and *ERPR4/ERPR8* interactions (Table 4). In the case of the *ERPR2b/ERPR6b* and *ERPR3a/ERPR6b* pairs of loci, only DH lines homozygous for the resistant alleles at both loci (BB/BB) have a significantly reduced disease score ($P < 0.05$). There is no significant difference between the three other groups of DH lines (genotypes AA/AA, AA/BB or BB/AA). In the *ERPR2b/ERPR8*, *ERPR3a/ERPR8* and *ERPR4/ERPR8* pairs of loci, DH lines with genotypes AA/BB, BB/AA, BB/BB have similar disease scores, which are significantly lower ($P < 0.05$) than lines homozygous for the susceptible alleles (AA:AA). Thus, both “more than additive” and “less than additive” types of interactions appear between pairs of QTLs in the DH population:

- “More than additive” interactions (BB alleles of the resistant parent have a greater effect in QTL duo combination, than individually) were observed for *ERPR2b/ERPR6b* and *ERPR3a/ERPR6b* pairs of loci.
- “Less than additive” interactions (alleles have a lesser effect in combination, than individually) were observed for *ERPR2b/ERPR8*, *ERPR3a/ERPR8* and *ERPR4/ERPR8* pairs of loci.

Table 4: Digenic interactions for pairs of loci *ERPR2b/ERPR6b*, *ERPR2b/ERPR8*, *ERPR3a/ERPR6b*, *ERPR3a/ERPR8*, *ERPR4/ERPR6b* and *ERPR4/ERPR8*. Mean of $SCO_{max} \pm$ standard deviation is indicated for each pair of loci. The groups defined by the LSD-test are indicated in bold, just after means and standard deviations. The number of DH lines per genotype class is indicated in parenthesis. “A”: E8 (MM738) allele and “B”: E4 (EG203) allele.

Pair of loci	Genotypes at the first and second loci			
	AA/AA	AA/BB	BB/AA	BB/BB
<i>ERPR2b/ERPR6b</i>	2.72 ± 0.67 a (34)	2.24 ± 0.83 a (32)	2.31 ± 0.65 a (35)	1.40 ± 0.83 b (22)
<i>ERPR2b/ERPR8</i>	2.72 ± 0.78 a (37)	2.19 ± 0.69 b (29)	2.09 ± 0.89 b (29)	1.83 ± 0.79 b (28)
<i>ERPR3a/ERPR6b</i>	2.60 ± 0.68 a (37)	2.39 ± 0.96 a (21)	2.41 ± 0.67 a (33)	1.57 ± 0.76 b (32)
<i>ERPR3a/ERPR8</i>	2.82 ± 0.68 a (29)	2.23 ± 0.80 b (29)	2.15 ± 0.91 b (37)	1.79 ± 0.65 b (28)
<i>ERPR4/ERPR6b</i>	2.80 ± 0.65 a (26)	2.22 ± 0.84 ab (32)	2.34 ± 0.64 b (44)	1.39 ± 0.83 c (21)
<i>ERPR4/ERPR8</i>	2.73 ± 0.78 a (33)	2.15 ± 0.73 b (25)	2.15 ± 0.88 b (33)	1.90 ± 0.77 b (32)

3.1.4 Discussion

3.1.4.1 SNPs from GBS made it possible to construct a dense new intraspecific genetic map

Although GBS produces several thousand polymorphic SNPs, only 1,170 SNPs were included in the final map. We removed a large number of SNPs because they clustered on the genetic map and were, thus, non-informative. The size of our population (123 lines) is a major limitation for mapping additional markers. In addition, DH populations originate from a single meiosis (RIL populations arise from several meioses), thereby promoting the clustering of markers due to insufficient recombination events. Despite these limitations, our map displays a high marker coverage (1 marker every 1.25 cM), covering 55 of the 56 eggplant/tomato synteny blocks (sb) and 86 % of the genome, according to the Fishman et al. (2001) method. However, as reported in other studies, genome coverage can also be estimated by simply dividing the LG length by the estimated genome length (Li and He 2014; Qiu et al. 2016). Using this calculation, our map should cover 98 % of the eggplant genome. We were able to align 40 % of the SNP sequences on the tomato genome, 43 % on the potato genome and 28 % on the pepper genome. The marker order in our map is mostly concordant with the physical order of eggplant contigs. However, sb 47 appears in the same order in the tomato

genome and in our map (chr 11), whereas an inversion was reported in previous work (Wu et al. 2009; Hirakawa et al. 2014). According to these authors, sb 48 should be placed after sb 47. However, in our map, as sb 48 is placed before sb 47, the ordering of our markers along chromosome E11 may be erroneous. Our map has very large gaps (over 30 cM on chr 9), which is problematic for QTL mapping studies. Indeed gaps sometimes create “ghost QTLs”, i.e. virtual QTLs detected between two adjacent markers separated by an important genetic distance (Martinez and Curnow 1992; Broman and Speed 1999). The major gap in our map occurs on chr 9 between the sb 34 and the sb 35. Another large gap of 37.5 cM in the same chromosomal region was already observed in the map for the MM738×AG91-25 RILs population (Salgon et al., submitted for publishing). The second population originates from the same maternal parent (E8 = MM738). For both genetic maps, this chromosomal section, which has a physical length of about 2 Mb, includes the break point between the inversed sb34 and sb35. Thus, the large gap could be caused by the structural variation (inversion) present in this chromosomal section. However, comparative studies between solanaceous crops showed that the order of genes in the upper part of eggplant chr 9 is consistent with pepper and inversed in potato and tomato. Thus, it is likely that the ancestral genome of these crops had the same arrangement as pepper and eggplant. The inversion probably occurred in the potato/tomato lineage (Wu et al. 2009). The hypothesis of a structural rearrangement in the upper part of eggplant chr 9 requires further investigation. As no QTL was found in this region, the large gap found on chr 9 should not be a limitation in our study on the resistance of E4 (EG203).

3.1.4.2 Several QTLs are involved in the control of *R. pseudosolanacearum* PSS4 and R3598 strains and are possibly syntenic with proven tomato BW-resistance QTLs

A total of eleven resistance QTLs were detected on eggplant chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 and 9 (Fig. 1). Three QTLs (*ERPR6a*, *ERPR6b* and *ERPR6c*) were detected on chr 6. The first two were detected with PSS4 (I-15) strain, whereas the third was only detected with R3598 (III-29). We distinguished them on the basis of the significant difference in their confidence intervals for SCO_{max} , W_a and CI. However, their confidence intervals overlap, which means that differentiating between the three QTLs, is debatable, particularly because the confidence interval of *ERPR6c* overlaps with the confidence intervals of both *ERPR6a* and *ERPR6b* (Fig. 1). Thus, it may be better to consider these three QTLs as the same *ERPR6*

QTL, which controls both PSS4 and R3598 strains. If we consider a unique QTL on chr 6, our results point out the presence of (i) seven QTLs specific to PSS4 strain (*ERPR1*, *ERPR2a*, *ERPR2b*, *ERPR3b*, *ERPR4*, *ERPR7* and *ERPR8*), (ii) one QTL specific to R3598 (*ERPR9*, although very hypothetical, as only detected in season 2), and (iii) two QTLs controlling both strains (*ERPR3a* and *ERPR6*). Thus, the latter could be broad spectrum QTLs, which is of particular interest for breeding cultivars resistant to strains (classified as *R. pseudosolanacearum*) pathogenic on the major gene *ERs1/EBWR9* (Lebeau et al. 2013; Salgon et al. submitted for publication). However, the low frequency of symptoms observed in DH lines with strain R3598 suggests that infestation was insufficient. In addition, *ERPR3a* and *ERPR6* should be confirmed with greater inoculum pressure. Since R3598 was sampled in Cameroon at an altitude of 690 meters, this strain could be more adapted to cooler conditions and the high temperature observed in our greenhouse assays (up to 48 °C in the greenhouse, while the outside temperature did not exceed 34°C) could have been unfavorable to pathogen multiplication. An alternative trial to confirm the existence of *ERPR3a* and *ERPR6* could involve phenotyping the EG203 x MM738 DH population in a naturally infested field.

Thanks to the anchored markers on the eggplant and tomato genomes, physical positions of QTLs were estimated and compared with the BW-resistance QTLs in tomato that have already been published. The corresponding physical intervals of *ERPR1* (0.1-92.1 Mb), *ERPR7* (3.7-58.0 Mb), *ERPR8* (0.6-58.2 Mb) and *ERPR9* (4.3-33.5 Mb) are very large. Thus, reliable comparisons with published QTLs are not possible. We distinguished two QTLs on eggplant chromosome 2 (*ERPR2a*, *ERPR2b*), which seemed to be specific to the PSS4 strain, and with intervals of 37.6-43.9 Mb and 43.5-53.1Mb, respectively. It is interesting to note that both intervals overlap with the position of the recently identified eggplant *EBWR2* QTL (38.3-46.9 Mb) (Table 5, Salgon et al. submitted for publication). The *ERPR3a* QTL was detected for both strains with a confidence interval of 0 to 31 cM. We did not locate QTL reported previously within its estimated physical position (0.2 to 8.2 Mb). The second QTL on chr 3, *ERPR3b*, specific to strain PSS4, positioned between 124 and 139 cM, corresponds to a narrow physical area of 2.6 Mb between 65.2 and 67.8 Mb. Again it is interesting to note that this area overlaps with the physical interval of tomato *Bwr-3*, a QTL detected in Hawaii 7996 (Table 5). *ERPR4*, detected on chr 4 between 66 and 107 cM, with a corresponding physical interval located between 59.8 and 65.4 Mb, could also match the position of a tomato QTL at the bottom of chr 4, which was also detected in Hawaii 7996 at the bottom of chr 4 (*bwr-4*).

However, the position of *bwr-4* is not sufficiently precise to establish a syntenic relationship with *ERPR4*.

ERPR6 (if we consider *ERPR6a*, *ERPR6b* and *ERPR6c* as the same QTL), the second QTL conferring resistance to PSS4 and R3598 strains, is possibly syntenic to the tomato broad-spectrum *Bwr-6* QTL (Table 5). However, its position on the tomato maps also remains uncertain. Only one broad QTL peak was found on chr 6 in the tomato cultivars Hawaii7996 and L285 (Danesh et al. 1993; Thoquet et al. 1996a; Thoquet et al. 1996b). However, a later temporal QTL analysis suggested that two different QTLs were present and acted at different stages of infection (Mangin et al. 1999). Carmeille et al. (2006) considered that QTLs on chr 6 were co-localized in different studies and, therefore, renamed them as a single *Bwr-6* QTL. This QTL was fine-mapped by Wang et al. (2013) and its location also differed according to the phenotype dataset. However, Wang et al. (2013) concluded that all QTLs correspond to *Bwr-6* as the QTL map position shifted depending on the environmental factors in each phenotype evaluation. In addition to synteny with *Bwr-6*, *ERPR6* presents the same characteristics as the tomato QTL. It is highly influenced by the phenotypic dataset and its positions also vary on the short arm of chr 6. Trials with PSS4 and R3598 strains should be repeated in different locations in order to confirm the presence or absence of different QTLs on chr 6.

3.1.4.3 Breeding cultivars resistant to *R. pseudosolanacearum* strains, virulent on the major gene *ERs1/EBWR9*

For decades, breeding BW-resistant cultivars has been limited because of the lack of knowledge of the pathogen's genetic diversity and the absence of identified resistance QTLs or genes. However, since the publication of the concept of bacteria phylotypes, the idea of specific or non-specific relationships between phylotypes or strains and resistance QTLs has emerged. Interestingly, both major specific genetic factors (*Bwr-12* in tomato, *EBWR9* and *RE-bw* in eggplant) and broad-spectrum QTLs have been proven to be involved in BW-resistance. Thus, both quantitative and qualitative resistance occurs in Solanaceae and can be used to create broad-spectrum and durable resistance in cultivars.

Table 5: Bacterial Wilt resistance QTLs detected in the DH population EG203 x MM738 for which a correspondence with published BW-resistance QTLs was found.

Summary of QTLs detected with PSS4 and R3598 strains				BW-resistance QTLs in Solanaceae crops					
Name	Interval (cM)	Position ^a	Strain	Name ^b	Species	cultivar	Position ^a	Strains ^c	Studies ^d
<i>ERPR2a</i>	34-77	37.6-43.9	PSS4	<i>EBWR2</i>	Eggplant	AG91-25	38.3-46.9	PSS4, TO10, CFPB2957,	8
<i>ERPR2b</i>	74-104	43.5-53.1	PSS4					CFBP3059	
<i>ERPR3b</i>	124-139	65.2-67.8	PSS4	<i>Bwr-3</i>	Tomato	Hawaii 7996	61.2-70.8	GMI8217, JT516, Tm151	2,6,7
<i>ERPR6a</i>	22-45	0.0-37.8	PSS4	<i>Bwr-6</i>	Tomato	Hawaii 7996, L285	36.9-38.8	PSS4, PSS186, Tm151,	1,2,3,4,5,6,7
<i>ERPR6b</i>	38-49	25.7-38.9	PSS4					JT519, UW364, JT516,	
<i>ERPR6c</i>	39-65	25.7-41.9	R3598					GMI8217	

^a Position on tomato genome in Mb.

^b Published QTL name. *EBWR2* for Eggplant bacterial wilt resistance on chr 2 and *Bwr* following chr number for bacterial wilt resistance.

^c Strains used in the previous studies: PSS4, TO10, Pss186, Tm151, JT519 and UW364 belong to phylotype I; CFBP2957, JT516 and GMI8217 belong to phylotype II; CFBP3059 belong to phylotype III.

^d Reference: (1) Danesh et al. 1993; (2) Thoquet et al. 1996a; (3) Thoquet et al. 1996b; (4) Mangin et al. 1999; (5) Wang et al. 2000; (6) Carmeille et al. 2006; (7) Wang et al. 2013 and (8) Salgon et al, submitted for publication.

In this way, the SNPs produced by GBS will help to create new resistant cultivars. The sequences containing the SNPs can be converted into breeder-friendly markers with Kompetitive Allele Specific PCR (KASP; Semagn et al., 2014) or high resolution melting PCR (HRM; Gundry et al., 2003) and used in MAS. However, the number of QTLs involved, as well as the large confidence intervals, will complicate the process of simultaneously introducing several QTLs into a single cultivar. Furthermore, QTL analysis reveals putative epistatic interactions between QTLs that we explored via effect plots between pairs of loci (Online Resource 9). This analysis supports the presence of digenic interactions. *ERPR8* seems to be involved in “less than additive” interactions with *ERPR2b*, *ERPR3a* and *ERPR4* (Table 4). This type of interaction can occur when several loci control the same function. On the contrary, *ERPR6b* seems to be involved in a “more than additive” interaction with *ERPR2b* and *ERPR3a*. This type of interaction generally occurs when several genes encode for enzymes, which are involved in the same molecular pathway (Holland 2001). Hence, digenic interactions should be taken into account when pyramiding QTLs because they may have an adverse effect on the success of detection, introgression and the characterization of genes underlying the QTLs (Causse et al. 2007). However, our results suggest that *ERPR8* could be introgressed without *ERPR2b*, *ERPR3a* and *ERPR4*, and still significantly increase the level of resistance. On the other hand, *ERPR6b* should be introgressed with both *ERPR2b* and *ERPR3a* in order to benefit from their “more than additive” effects. Thus, the breeding effort should focus on the introgression of *ERPR2b*, *ERPR3a* and *ERPR6b* QTLs, which have a synergistic interaction. The DH lines, which are homozygous for the resistant allele at these three loci, display a W_a mean of 16.4 % and a CI mean of 47.7 %, (seasons combined). In comparison, the respective values of their counterparts, which are homozygous for the susceptible alleles, are higher (35.6 % and 84.1 %; data not shown). Thus, the three QTLs combined could reduce disease progression and the colonization of the xylem vessels by almost half. Their introgression, together with *EBWR9*, *EBWR2* and *EBWR14* from the line AG91-25 (Salgon et al., submitted for publication), should be considered for the creation of a broad-spectrum resistant cultivar. *ERPR2b* and *EBWR2* are generally considered as one and the same gene because they co-localize (Table 5), which simplifies breed improvement. However, before introgressing QTLs into commercial cultivars, the epistatic interactions should be confirmed with a broader DH population or using different genetic material. The limited size of our DH population may have generated statistical artifacts.

Another important gene of resistance is found in the E-31 inbred line (Xi'ou et al. 2014). This gene *RE-bw* is cloned and confers total resistance to a strain wearing the PopP2 type-III

effector. The efficiency spectrum of *RE-bw* has not yet been explored. Therefore, further investigations are necessary before it can be used in combination with our BW-resistance QTLs, which have been characterized on the basis of strains.

3.1.4.4 Looking for complementary source of resistance in eggplant germplasm

The *R. pseudosolanacearum* (phylotype I and III) includes strains that are particularly aggressive and virulent on solanaceous crops (Lebeau et al. 2010; N'Guessan et al. 2012). Phylotype I has the highest evolutionary potential (Wicker et al. 2012). This suggests that the resistance conferred by a single major resistance gene, such as *ERs1*, which is effective against strains of this phylotype (Lebeau et al., 2013; Salgon et al., submitted for publication) is likely to be broken down by the pathogen within a short period. Therefore, in order to breed durable and broad-spectrum resistant cultivars, major and complementary QTLs should be identified and then introduced into the same cultivar simultaneously. In this way, the lines E3 (MM152) and E9 (S56B), which exhibit high levels of resistance, are complementary sources of resistance to both PSS4 and R3598 (Table 1). INRA has recently developed populations of DH lines from the crosses MM152 x MM738 and S56B x MM738. These will be used for a more in-depth examination of BW-resistance factors in future. The eggplant species complex, which includes the three crops, *S. melongena*, *S. macrocarpon* and *S. aethiopicum* and their wild relatives (such as *S. linnaeanum*, *S. torvum*, *S. incanum*), represents a tremendous reservoir of genetic diversity (Syfert et al. 2016). This diversity should be explored with a view to finding additional BW-resistance QTLs and genes.

3.1.5 Acknowledgments

We would like to thank Marie Terville and Séverine Rivière (CIRAD, Reunion, France) for their help with the DNA extraction and microbiology experiments. We would also like to thank Ramatoulaye Sidibe, Jean Koudji Lim, Sandrine Naa and Nathalie Tsague (Technisem, Yaoundé, Cameroon) for their help in the phenotyping trials conducted in Cameroon. We are grateful to the Vegenov Company for providing the DH population and to David Savio (INRA, Montfavet, France) for seed production and seed supply. We would like to thank Emmanuel Wicker (CIRAD, Montpellier, France) for classifying the R3598 strain and for his advice on the microbiology experiments; Bernard Reynaud for his constructive criticism of

the manuscript; the SouthGreen Bioinformatics Platform (<http://www.southgreen.fr/>) for their computational resources and the Plant Protection Platform (3P, IBISA), where phenotyping assays were conducted; Pierre Mournet (CIRAD, Montpellier, France) for the production of GBS libraries and the Get-plage platform (Toulouse, France) for Illumina sequencing. This research was financially supported by the Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) and by the French National Institute for Agricultural Research (INRA), the Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning through the “RESAUBER” project (CASDAR C-2013-09) and the Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) through the CIFRE PhD. (Grant No. 2013/1477 for S. Salgon). This work was also funded by the European Regional Development Fund (ERDF), the Conseil Régional de la Réunion and the Conseil Général de la Réunion.

3.1.6 Onlines Resources

Online Resource 1: List of DNA samples used for GBS. Their associated barcode sequences and the number of reads after demultiplexing and cleaning steps are indicated.

Individuals	Type	Sequencing lane	Barcodes	Number of reads	Comments
MM738	E8	1	TTGTT/TTGACGT	3,462,252	
EG203	E4	1	TTCAGA/TTGCAGGA	6,632,870	
S001	DH	1	AACT/GGCTGA	8,497,078	
S002	DH	1	CCTA/CAAGTT	4,203,095	
S003	DH	1	TTAC/TGTTCA	6,003,998	
S004	DH	1	AGGC/TTGCAGA	6,826,164	
S005	DH	1	GCAT/AACAGGT	5,038,625	
S006	DH	1	TAGA/CCACTGA	7,136,508	
S007	DH	1	GTCA/CTTGAGT	7,694,123	
S008	DH	1	GATC/TGCTGGA	5,614,369	
S010	DH	1	CTGT/GAGCAGT	5,986,442	
S011	DH	1	AGAGA/ACAACGT	2,005,225	
S012	DH	1	CGCGT/CTGGTGA	1,778,691	
S013	DH	1	TCTGA/GCTTGGA	3,909,145	
S014	DH	1	AACAT/TGACAGT	3,120,711	
S015	DH	1	CCACA/AACGTGA	3,351,868	
S016	DH	1	GATGT/CATTGGT	2,687,729	
S017	DH	1	CGTAA/GGCCTGA	5,029,519	
S018	DH	1	ACATT/ACTAAGA	4,419,904	
S019	DH	1	TTCCA/TTAGCTT	8,540,098	
S020	DH	1	GTGGA/CGGTGAA	4,673,236	
S021	DH	1	AGTCT/GAATCGT	3,395,762	
S022	DH	1	CACTA/ACCAGTA	7,270,665	
S023	DH	1	TGAAT/TTGCTAT	5,312,278	
S024	DH	1	GCGAT/GGTGAGC	4,810,672	
S025	DH	1	AAGCA/AACAATGA	6,288,181	
S026	DH	1	CTAGC/CCACCGGT	2,632,355	
S027	DH	1	TCCTC/CTTGTAGT	3,439,552	
S028	DH	1	GTACT/TCGTGTGA	3,232,965	
S029	DH	1	GGTTC/GGAACGGT	4,262,172	
S030	DH	1	ACGGC/AATCAAGA	3,773,710	discarded
S031	DH	1	CACAGT/TTCGTTGA	5,536,563	
S032	DH	1	TCTGGA/CGGTGAGT	5,797,771	
S033	DH	1	AGACGT/GAATCGGA	5,574,131	
S034	DH	1	CATTGA/ACCATTGT	3,347,110	
S035	DH	1	GCAGGT/GCTGGAGT	4,716,677	
S036	DH	1	TGGCGA/AGACCTTA	5,118,805	
S037	DH	1	ATCGGT/CACAAGAT	3,388,453	
S038	DH	1	CAGTAT/TGTTGCGA	3,911,296	
S039	DH	1	CGTATA/CTGGTTAT	3,031,826	
S041	DH	1	GAGCGT/GAACAATA	3,017,599	
S042	DH	1	ACATGA/ACCACGCT	3,637,223	
S043	DH	1	TGCAAT/GTTGTCGA	8,570,216	
S044	DH	1	CTTGAA/TCGTGATT	4,245,058	
S045	DH	1	GACATA/AGACTTAT	4,464,119	
S046	DH	1	ACTAGT/CACTCCGA	6,748,737	
blank	water	1	GTACAA/ACGGTT/TTGAAGCT GGTGGCAA	2,344	

Online Resource 1: Continued

Individuals	Type	Sequencing lane	Barcodes	Number of reads	Comments
MM738	E8	2	GCAGGT/GCTGGAGT	10,532,051	
EG203	E4	2	CGCGT/CTGGTGA	7,793,210	
S047	DH	2	AACT/GGCTGA	13,789,177	
S048	DH	2	CCTA/CAAGTT	13,834,948	
S049	DH	2	TTAC/TGTTCA	11,133,247	
S050	DH	2	AGGC/TTGCAGA	9,924,802	
S051	DH	2	GCAT/AACAGGT	11,456,666	
S052	DH	2	TAGA/CCACTGA	10,694,160	discarded
S053	DH	2	GTCA/CTTGAGT	17,547,472	discarded
S054	DH	2	GATC/TGCTGGA	10,387,132	
S055	DH	2	CTGT/GAGCAGT	9,846,556	
S056	DH	2	AGAGA/ACAACGT	8,501,194	
S057	DH	2	TCTGA/GCTTGGA	10,032,536	
S058	DH	2	AACAT/TGACAGT	7,823,310	
S059	DH	2	CCACA/AACGTGA	9,845,834	
S060	DH	2	TTGTT/TTGACGT	12,652,931	
S061	DH	2	GATGT/CATTGGT	10,721,515	
S062	DH	2	CGTAA/GGCCTGA	13,784,824	
S063	DH	2	ACATT/ACTAAGA	15,498,404	
S064	DH	2	TTCCA/TTAGCTT	19,421,485	
S065	DH	2	GTGGA/CGGTGAA	15,415,339	
S066	DH	2	AGTCT/GAATCGT	12,782,101	
S067	DH	2	CACTA/ACCAGTA	19,502,579	
S068	DH	2	TGAAT/TTGCTAT	15,809,648	
S069	DH	2	GCGAT/GGTGAGC	14,272,550	
S070	DH	2	AAGCA/AACAATGA	13,409,675	
S071	DH	2	CTAGC/CCACCGGT	6,346,932	
S072	DH	2	TCCTC/CTTGTAAGT	11,771,704	
S073	DH	2	GTACT/TCGTGTGA	10,207,550	
S074	DH	2	GGTTC/GGAACGGT	13,080,967	
S075	DH	2	ACGGC/AATCAAGA	18,410,703	
S076	DH	2	CACAGT/TTGCTTGA	12,020,621	
S077	DH	2	TCTGGA/CGGTGAGT	19,137,029	
S078	DH	2	AGACGT/GAATCGGA	17,542,719	
S079	DH	2	CATTGA/ACCATTGT	17,961,161	
S080	DH	2	TTCAGA/TTGCAGGA	18,069,543	
S081	DH	2	TGGCGA/AGACCTTA	16,883,692	
S083	DH	2	ATCGGT/CACAAGAT	14,448,301	
S084	DH	2	CAGTAT/TGTTGCGA	15,793,865	
S085	DH	2	CGTATA/CTGGTTAT	13,429,486	
S086	DH	2	GAGCGT/GTTGTCGA	17,187,924	
S087	DH	2	ACATGA/TCGTGATT	11,366,228	
S088	DH	2	TGCAAT/AGACTTAT	11,032,107	
S089	DH	2	CTTGAA/CACTCCGA	15,615,216	
S090	DH	2	GACATA/TTGAAGCT	17,983,771	discarded
S091	DH	2	ACTAGT/GGTGGCAA	15,994,180	
Blank	water	2	GTACAA/ACGGTT/GAACAATA ACCACGCT	12,238	

Online Resource 1: Continued

Individuals	Type	Sequencing lane	Barcodes	Number of reads	Comments
MM738	E8	3	GTACT/TCGTGTGA	6,034,126	
EG203	E4	3	TTCCA/TTAGCTT	8,568,806	
S093	DH	3	AACT/GGCTGA	18,965,064	
S094	DH	3	CCTA/CAAGTT	12,585,405	
S095	DH	3	TTAC/TGTTCA	14,228,325	
S096	DH	3	AGGC/TTGCAGA	14,226,544	
S097	DH	3	GCAT/AACAGGT	12,919,922	
S098	DH	3	TAGA/CCACTGA	11,952,642	
S099	DH	3	GTCA/CTTGAGT	10,399,336	discarded
S100	DH	3	GATC/TGCTGGA	13,575,317	
S101	DH	3	CTGT/GAGCAGT	8,560,256	
S102	DH	3	AGAGA/ACAACGT	4,565,124	
S103	DH	3	CGCGT/CTGGTGA	8,160,185	
S104	DH	3	TCTGA/GCTTGGA	9,527,121	
S105	DH	3	AACAT/TGACAGT	8,177,073	
S106	DH	3	CCACA/AACGTGA	9,272,738	discarded
S107	DH	3	TTGTT/TTGACGT	7,188,519	
S108	DH	3	GATGT/CATTGGT	4,861,281	
S109	DH	3	CGTAA/GGCCTGA	12,411,774	
S110	DH	3	ACATT/ACTAAGA	11,997,503	
S112	DH	3	GTGGA/CGGTGAA	13,438,920	
S113	DH	3	AGTCT/GAATCGT	10,681,632	discarded
S115	DH	3	CACTA/ACCAGTA	11,856,418	discarded
S116	DH	3	TGAAT/TTGCTAT	10,864,011	discarded
S117	DH	3	GCGAT/GGTGAGC	9,592,038	
S118	DH	3	AAGCA/AACAATGA	14,275,060	
S119	DH	3	CTAGC/CCACCGGT	5,746,406	
S120	DH	3	TCCTC/CTTGTAGT	7,946,874	
S121	DH	3	GGTTC/GGAACGGT	10,724,441	
S122	DH	3	ACGGC/AATCAAGA	10,198,397	
S123	DH	3	CACAGT/TTCGTTGA	12,139,396	
S124	DH	3	TCTGGA/CGGTGAGT	16,931,721	
S125	DH	3	AGACGT/GAATCGGA	16,533,100	
S126	DH	3	CATTGA/ACCATTGT	12,048,671	
S127	DH	3	TTCAGA/TTGCAGGA	19,618,234	
S128	DH	3	GCAGGT/GCTGGAGT	9,732,280	
S129	DH	3	TGGCGA/AGACCTTA	12,414,933	
S132	DH	3	ATCGGT/CACAAGAT	11,479,474	
S134	DH	3	CAGTAT/TGTTGCGA	12,038,141	
S135	DH	3	CGTATA/CTGGTTAT	6,796,486	
S137	DH	3	GAGCGT/ACCACGCT	8,317,235	
S141	DH	3	ACATGA/GTTGTCGA	16,591,861	
S143	DH	3	TGCAAT/TCGTGATT	7,506,787	
S148	DH	3	CTTGAA/AGACTTAT	7,841,993	
S166	DH	3	GACATA/CACTCCGA	13,114,234	
S177	DH	3	ACTAGT/TTGAAGCT	10,799,633	
Blank	water	3	GTACAA/ACGGTT/GAACAATA GGTGGCAA	8,657	

Online Resource 2: Descriptive statistics of the newly developed EG203 x MM738 genetic map.

Linkage group (LG)	Number of SNPs	Average interval ^a (cM)	Maximum interval ^b (cM)	Length (cM)	% Skewed markers ^c	Estimated genome length (cM)	Genome Coverage (%)
E01	141	1.07	8.14	150.85	4.96	153.01	86.08
E02	114	1.28	9.75	146.13	3.51	148.72	85.95
E03	132	1.27	9.10	167.34	12.12	169.89	86.10
E04	91	1.33	8.32	120.90	1.10	123.59	85.89
E05	79	1.26	7.53	99.91	0.00	102.47	85.67
E06	107	1.08	6.60	115.23	10.28	117.40	86.04
E07	95	0.99	5.30	94.44	0.00	96.45	85.78
E08	88	1.31	11.32	114.93	12.50	117.57	85.93
E09	90	1.35	34.90	121.13	7.78	123.85	85.94
E10	83	1.44	9.13	119.24	28.92	122.15	85.87
E11	97	1.23	10.27	119.63	0.0	122.12	85.83
E12	53	1.72	15.11	91.39	11.32	94.91	85.35
Total	1170	1.25	34.90	1461.02	7.44	1492.13	85.92

^a Mean number of markers per cM.

^b Maximum interval without markers.

^c Percentage of markers, which deviate from the 1:1 expected segregation ratio in a DH population at P-value < 0.05.

Online Resource 3: Spreadsheet with the complete genetic map of MM738 × EG203 DH population and SNP sequences' significant hits on eggplant, tomato, pepper and potato genomes. Due to its very large format, this file will be uniquely available online when the paper will be published.

Online Resource 4: Pearson correlation coefficients among variables measured during two seasons and computed across seasons (Comb) in the DH population inoculated with strain R3598 (Cameroon assay).

Season		1					2					Comb				
	Var ^a	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a	W _a	CI	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a	W _a	CI	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a	W _a	CI
1	SCO _{max}	1.00														
	W _{max}	0.99	1.00													
	SCO _a	0.86	0.83	1.00												
	W _a	0.88	0.86	0.99	1.00											
	CI	0.61	0.62	0.57	0.59	1.00										
2	SCO _{max}	0.33	0.32	0.26	0.28	0.31	1.00									
	W _{max}	0.35	0.34	0.28	0.31	0.33	0.93	1.00								
	SCO _a	0.26	0.24	0.22	0.22	0.27	0.97	0.82	1.00							
	W _a	0.29	0.27	0.24	0.24	0.28	0.97	0.88	0.98	1.00						
	CI	0.50	0.49	0.39	0.40	0.50	0.71	0.68	0.66	0.69	1.00					
Comb	SCO _{max}	0.91	0.89	0.78	0.80	0.61	0.69	0.67	0.62	0.65	0.69	1.00				
	W _{max}	0.82	0.83	0.69	0.72	0.58	0.75	0.81	0.64	0.69	0.72	0.96	1.00			
	SCO _a	0.86	0.82	0.97	0.97	0.59	0.48	0.46	0.45	0.46	0.52	0.87	0.79	1.00		
	W _a	0.84	0.81	0.91	0.92	0.59	0.62	0.60	0.57	0.60	0.60	0.92	0.87	0.98	1.00	
	CI	0.65	0.65	0.57	0.58	0.89	0.57	0.56	0.51	0.53	0.84	0.75	0.74	0.64	0.69	1.00

^a Variables measured: the maximal score (SCO_{max}); the maximal wilting percentage (W_{max}); the area under disease progress curve for the score (SCO_a) and the wilting percentage (W_a); the colonization percentage (CI).

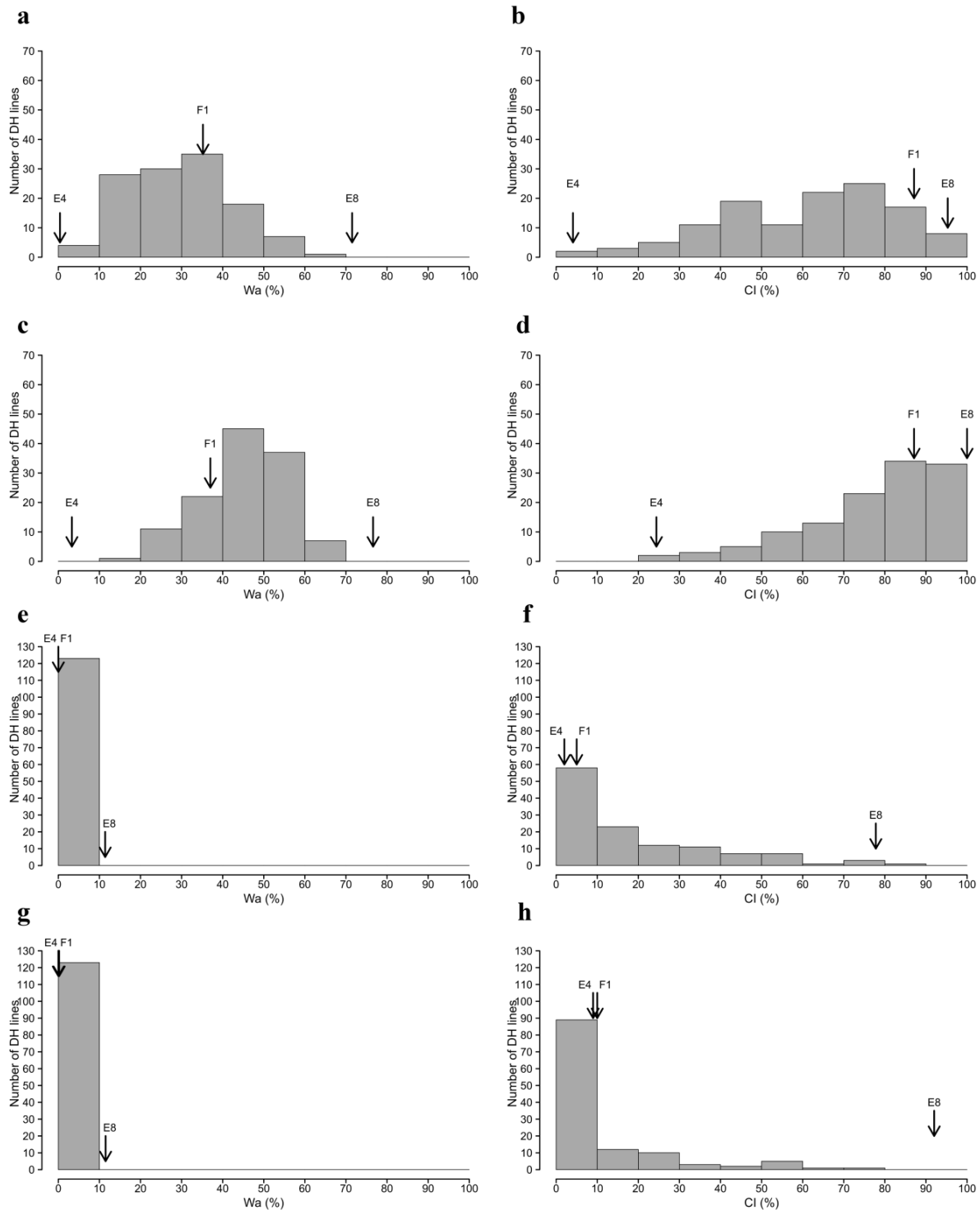
Online Resource 5: Pearson correlation coefficients among variables measured during two seasons and computed across seasons (Comb) in the DH population inoculated with strain PSS4 (Reunion assay).

Season		1					2					Comb				
	Var ^a	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a ^b	W _a ^b	CI	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a ^b	W _a ^b	CI	SCO _{max}	W _{max}	SCO _a ^b	W _a ^b	CI
1	SCO _{max}	1.00														
	W _{max}	0.98	1.00													
	SCO _a ^b	0.98	0.96	1.00												
	W _a ^b	0.98	0.97	0.99	1.00											
	CI	0.86	0.88	0.82	0.84	1.00										
2	SCO _{max}	0.50	0.49	0.47	0.47	0.55	1.00									
	W _{max}	0.50	0.49	0.47	0.47	0.54	0.99	1.00								
	SCO _a ^b	0.49	0.48	0.47	0.47	0.54	0.95	0.91	1.00							
	W _a ^b	0.49	0.48	0.47	0.48	0.54	0.95	0.93	0.99	1.00						
	CI	0.47	0.47	0.43	0.43	0.50	0.79	0.81	0.71	0.72	1.00					
Comb	SCO _{max}	0.88	0.87	0.86	0.86	0.82	0.85	0.84	0.81	0.82	0.72	1.00				
	W _{max}	0.88	0.88	0.85	0.86	0.83	0.83	0.84	0.78	0.79	0.73	0.99	1.00			
	SCO _a ^b	0.85	0.84	0.86	0.85	0.79	0.83	0.81	0.86	0.86	0.67	0.97	0.95	1.00		
	W _a ^b	0.86	0.85	0.85	0.86	0.81	0.83	0.81	0.85	0.86	0.67	0.97	0.96	0.99	1.00	
	CI	0.79	0.80	0.74	0.76	0.89	0.76	0.76	0.71	0.71	0.83	0.90	0.91	0.85	0.86	1.00

^a Variables measured: the maximal score (SCO_{max}); the maximal wilting percentage (W_{max}); the area under disease progress curve for the score (SCO_a) and the wilting percentage (W_a); the colonization percentage (CI).

^b Best linear unbiased predictor (Blup) of the SCO_a and W_a variables were computed for trials with PSS4 strain.

Online Resource 6: Frequency distributions of BLUP W_a and CI for EG203 x MM738 DH population inoculated with strains PSS4 and R3598 in individual seasons. Frequency distributions are presented for BLUP W_a (**a**) and CI (**b**) variables in season 1 and season 2 (**c**) and (**d**) for PSS4 strain (Reunion assay). For strain R3598 (Cameroon assay), frequency distributions are presented for W_a (**e**) and CI (**f**) variables in season 1, and W_a (**g**) and CI (**h**) in season 2. Arrows indicate the means of susceptible parent E8 (MM738), resistant parent E4 (EG203) and their F_1 ($E4 \times E8$).



Online Resource 7: QTLs of resistance to PSS4 strain (Reunion assay), detected by Simple Interval Mapping and Haley-Knott regression model, assuming a normal distribution in the EG203 x MM738 DH population. QTL analysis was carried out for individual seasons, as well as for combined seasons (Comb).

Season	Var ^a	Chr ^b	QTL ^c	Pos ^d	Nearest marker	Interval ^e	LOD	R ^{2f}	Add effect ^g	Total R ^{2h}
1	SCO _{max}	E03	<i>ERPR3a</i>	16.0	s296164	3.0-28.0	3.8	13.2	-0.38****	13.2
	W _a	E03	<i>ERPR3a</i>	16.0	s296164	0.0-167.3	3.0	9.3	-3.36***	
		E04	<i>ERPR4</i>	98.0	s311121	93.0-110.0	3.6	11.7	-3.97****	20.4
		Epistasis		<i>ERPR3a:ERPR4</i>			1.0	3.1	2.30*	
	CI	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
2	SCO _{max}	E06	<i>ERPR6b</i>	40.2	s431	6.0-52.0	3.6	12.5	-0.33****	12.5
	W _a	E02	<i>ERPR2b</i>	98.4	s51429	84.0-114.0	3.4	11.9	-3.56****	11.9
	CI	E01	<i>ERPR1</i>	38.8	s231295	19.0-108.0	3.1	10.9	-5.83****	10.9
Comb		E03	<i>ERPR3a</i>	16.0	s296164	3.7-167.3	4.4	11.5	-0.24****	
		E04	<i>ERPR4</i>	103.8	s298545	66.0-113.0	4.6	12.1	-0.23****	
		E06	<i>ERPR6b</i>	42.0	s11362	39.0-44.0	7.0	19.2	-0.22****	
	SCO _{max}			<i>ERPR3a:ERPR4</i>			1.4	3.6	-0.06*	35.7
				<i>ERPR3a:ERPR6b</i>			3.0	7.7	-0.18**	
		Epistasis		<i>ERPR4:ERPR6b</i>			1.4	3.5	0.02*	
				<i>ERPR3a:ERPR4:ERPR6b</i>			1.4	3.5	-0.17*	
		E02	<i>ERPR2b</i>	95.0	s116247	72.0-118.0	4.4	14.0	-3.07****	
	W _a	E04	<i>ERPR4</i>	91.0	s260898	85.0-113.0	3.5	10.9	-2.85****	22.1
		Epistasis		<i>ERPR2b:ERPR4</i>			1.1	3.2	-1.80*	
	CI	E03	<i>ERPR3b</i>	126.7	s231411	4.0-167.3	3.7	12.8	-6.16****	12.8

^a The variables used are maximal score (SCO_{max}), BLUP of area under disease curve progress for wilting percentage (W_a) and colonization percentage (CI).

^b Linkage groups named according to their chromosome correspondence.

^c Name of the QTL: Eggplant *Ralstonia pseudosolanacearum* Resistance (*ERPR*) followed by the chromosome number. When several QTLs are detected on the same chromosome, a letter is added to the QTL name for identification purposes.

^d Position of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM).

^e 95% Bayesian confidence interval (cM).

^f Estimates of the percentage of phenotypic variance explained by the QTL detected.

^g Additive effect: a positive value indicates that resistance comes from the E8 (MM738) allele, while a negative value indicates that resistance comes from the E4 (EG203) allele.

^h Estimate of the total percentage of phenotypic variance explained by the additive model.

ns: QTLs were not detected above the LOD threshold.

Online Resource 8: QTLs of resistance to R3598 strain (Cameroon assay), detected by simple interval mapping, and a non-parametric model for the EG203 x MM738 DH population. QTL analysis was carried out for individual seasons, as well as for combined seasons (Comb).

Season	Var ^a	Chr ^b	QTL ^c	Pos ^d	Nearest marker	Interval ^e	LOD
1	SCO _{max}	E03	<i>ERPR3a</i>	4.7	s231544	0.0-28.0	3.1
	W _a	E03	<i>ERPR3a</i>	4.7	s231544	0.0-28.0	3.2
	CI	E03	<i>ERPR3a</i>	5.0	s197676	2.0-6.4	9.7
2	SCO _{max}	E09	<i>ERPR9</i>	51.5	s75856	40.0-80.7	2.9
	W _a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	CI	E09	<i>ERPR9</i>	49.4	s298980	42.0-67.0	3.2
Comb	SCO _{max}	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	W _a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	CI	E03	<i>ERPR3a</i>	4.1	s227496	0.0-6.4	7.7

^a Variables used are the maximal score (SCO_{max}), the area under disease curve progress for wilting percentage (W_a) and the colonization percentage (CI).

^b Linkage groups are named according to their chromosome correspondence.

^c Name of the QTL: Eggplant *Ralstonia pseudosolanacearum* Resistance (*ERPR*) followed by the chromosome number. When several QTLs are detected on the same chromosome, they are identified by a different letter after the QTL name.

^d Position of the maximum logarithm of odds score (LOD) in centimorgans (cM).

^e 95 % Bayesian confidence interval (cM).

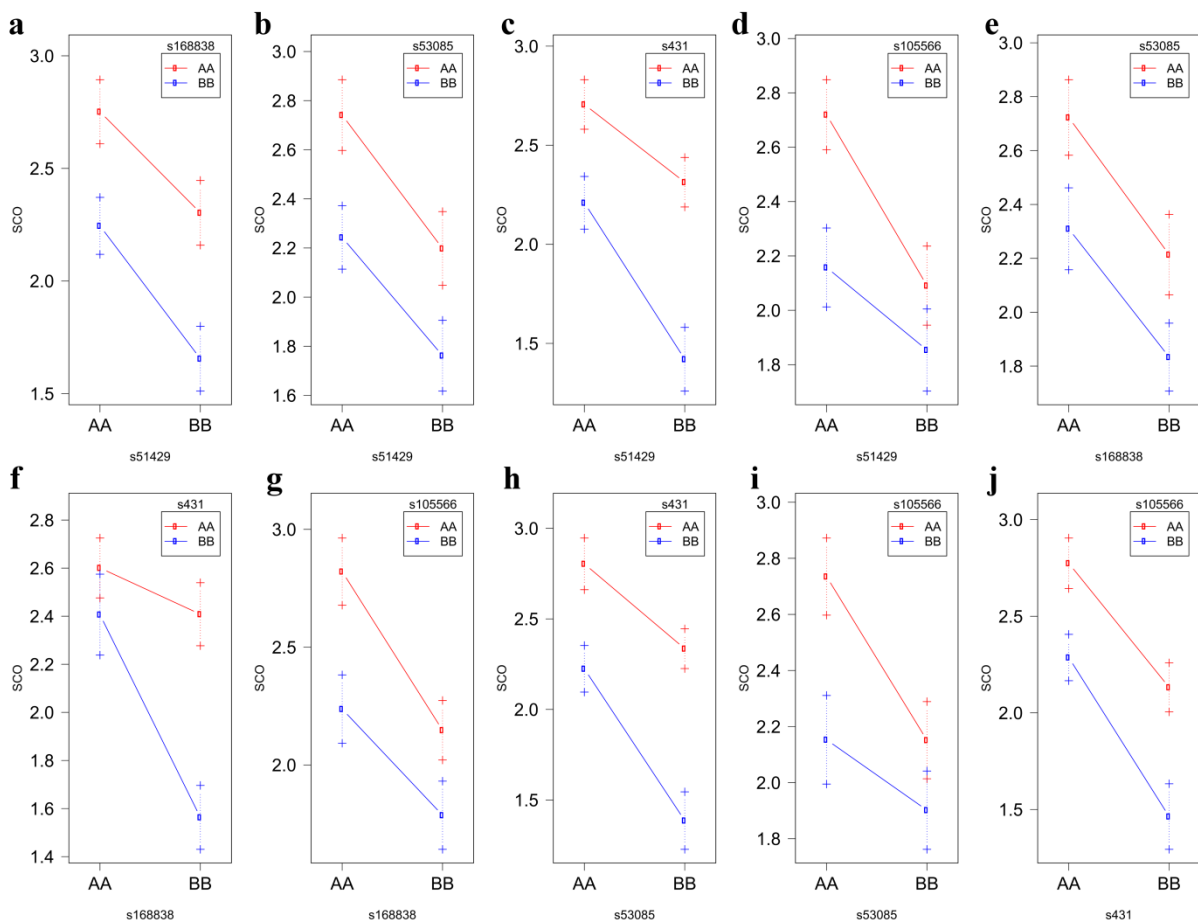
ns: QTLs were not detected above the LOD threshold.

Online Resource 9: Effectplots for epistatic interactions between pairs of QTL detected for SCO_{max} in combined seasons of PSS4 trials. Epistatic interactions are presented for closest markers at loci pairs: *ERPR2b/ERPR3a* (a); *ERPR2b/ERPR4* (b); *ERPR2b/ERPR6b* (c); *ERPR2b/ERPR8* (d); *ERPR3a/ERPR4* (e); *ERPR3a/ERPR6b* (f); *ERPR3a/ERPR8* (g); *ERPR4/ERPR6b* (h); *ERPR4/ERPR8* (i); *ERPR6b/ERPR8* (j).

AA: DH lines homozygous for E8 (MM738) alleles;

BB: DH lines homozygous for E4 (EG203) alleles.

Plotted points indicate SCO_{max} means $\pm$ standard error for allelic combinations at locus 1 (X axis) and locus 2 (represented by a color code written in the rectangle at the top left corner of each sub-figure).



3.2 Cartographie génétique de la résistance à la souche PSS4 dans une population DH issue de MM152 × MM738

3.2.1 Matériel et Méthodes

L'accession MM152 (E3), présentant un haut niveau de résistance à la souche PSS4, a été croisée avec le parent sensible MM738 (E8) pour la production de 225 lignées DH. Parmi les 225 DH, seules 160 ont pu être phénotypées en conditions contrôlées vis-à-vis de la souche PSS4, en raison du peu de place disponible dans les chambres climatiques (rotoplans). Les essais de phénotypage se sont déroulés dans quatre rotoplans (correspondant à quatre répétitions), comportant chacun 5 plants de chaque DH, 30 plants des parents E3 et E8, 20 plants des F₁ E3 × E8 et 20 plants de l'accession E6 (AG91-25) considérée comme sensible à la souche PSS4 (chapitre 2). Disposés selon un plan de randomisation totale, les plants ont été inoculés avec la souche PSS4 et les symptômes ont été suivis durant 35 jours selon le protocole décrit dans Lebeau et al. (2010). Le calcul des variables a été réalisé comme décrit dans la partie 3.1. Les variables score maximal (SCO_{max}), AUDPC de l'incidence (W_a) et index de colonisation (CI) ont été analysées avec un modèle linéaire simple comprenant les effets Génotype (G) et Répétition (R). Une anova a été réalisée afin d'estimer la significativité des effets et calculer les héritabilités au sens large selon la formule suivante : $h^2 = \frac{V_G}{V_G + \frac{V_e}{n}}$

avec V_G = variance génotypique, V_e = variance résiduelle et n = nombre de répétitions (4).

Les ADN des 160 lignées DH et des parents E3 et E8 ont été extraits selon la même méthode décrite dans la partie 3.1. Ils ont été répartis sur deux plaques de 96 puits comprenant chacune 80 DH et les ADNs parentaux répétés quatre fois. La production des banques GBS, le séquençage de ces banques, le traitement bio-informatique des données de séquençage et la construction de la carte génétique ont été réalisés comme décrit dans la partie 3.1. Les analyses QTLs ont été réalisées par MQM avec le module « stepwise » du package R/qtl sur les répétitions individuelles et sur les données combinées des quatre répétitions (Comb), en considérant un maximum de 8 QTLs avec effets additifs et épistatiques dans le modèle. Les QTLs de résistance sont nommés CRPR pour « Ceylan *Ralstonia Pseudosolanacearum* Resistance » suivi du numéro de chromosome.

3.2.2 Résultats préliminaires

3.2.2.1 Phénotypage de la population E3 × E8

Le parent E8 présente une forte sensibilité à la souche PSS4 avec un SCO_{max} de 2,6 et un CI de 78 % (Tableau 10). Le parent E3 présente par contre un niveau de résistance assez élevé avec un SCO_{max} de 0,6 et un CI de 28,3. La génération F₁ se situe entre les deux parents avec un SCO_{max} de 1,8 et un CI de 50,1 %. Ces essais confirment la sensibilité de l'accession E6 qui présente un SCO_{max} de 2,0 et un CI de 60,7 %. Les anova révèlent la présence d'un effet G significatif ($p < 5\%$) et d'un effet R très significatif ($p < 0,1\%$) pour les variables SCO_{max} et W_a (Tableau 10). Par contre, les deux effets sont très significatifs pour la variable CI ($p < 0,1\%$). L'héritabilité est faible pour les variables SCO_{max} ($h^2 = 0,27$) et le W_a ($h^2 = 0,26$), et un peu plus élevée pour le CI ($h^2 = 0,46$). Les variables W_a et CI présentent une distribution continue et proche d'une distribution gaussienne (Figure 22). Les parents E8 et E3 sont proches des extrémités de la courbe et des lignées présentant un phénotype transgressif sont présentes pour les deux variables.

Tableau 10: Moyennes et erreurs standard (entre parenthèses) obtenues sur les lignées parentales E8 (MM738) et E3 (MM152), sur la génération F₁, sur le témoin positif E6 (AG91-25) et sur la population DH, et estimation de la significativité des effets génotype (G) et répétition (R) et de l'héritabilité des variables (h^2).

Var ^a	P1	P2	F ₁	E6	Familles DH			
					moy	G	R	h^2
SCO_{max}	2,6 (0,4)	0,6 (0,2)	1,8 (0,1)	2,0 (0,3)	1,5 (0,0)	*	***	0,27
W_a (%)	46,4 (6,8)	12,7 (4,6)	32,2 (3,5)	34,5 (4,3)	28,0 (0,8)	*	***	0,26
CI (%)	78,0 (4,5)	28,3 (7,8)	50,1 (3,8)	60,7 (6,6)	45,2 (1,1)	***	***	0,46

^a Les variables présentées sont les score maximal (SCO_{max}), l'AUDPC de l'incidence (W_a) et l'index de colonisation (CI)

*, **, *** : Significativité des effets respectivement à 5 %, 1 % et 0,1 %

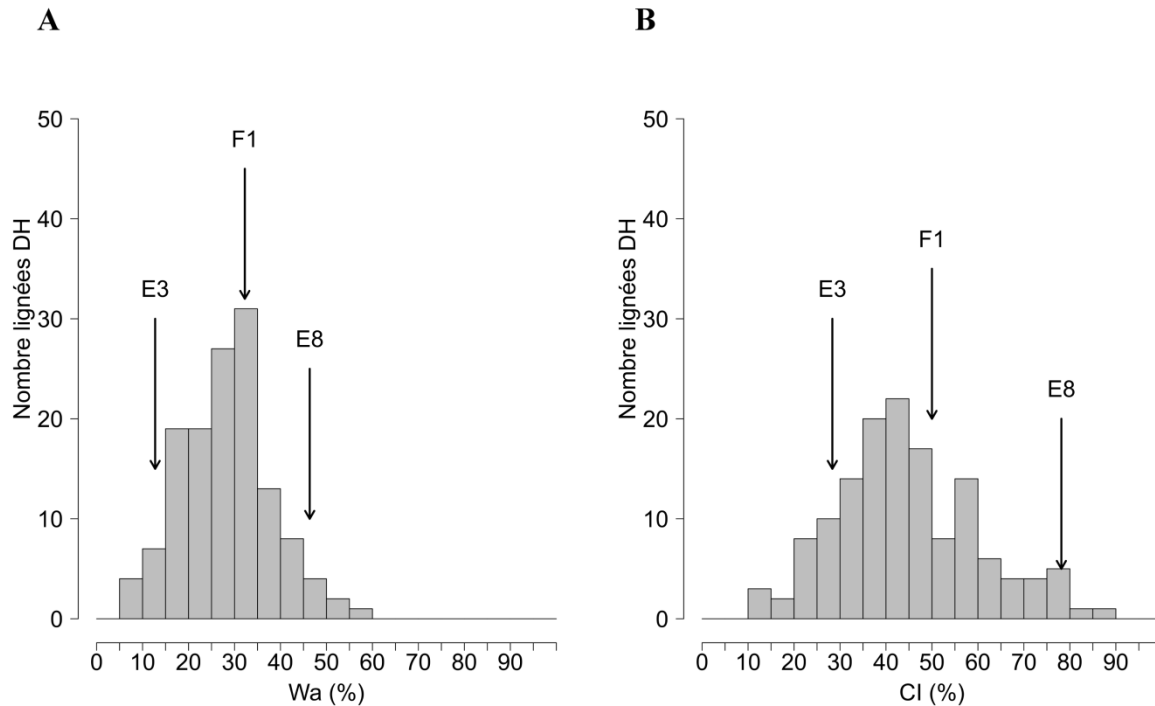


Figure 22: Fréquence de distribution des lignées DH de la population E3 $\times$ E8 pour les variables W_a (A) et CI (B) calculées sur les quatre répétitions. Les positions des parents E8, E3 et de la F1 sont représentées par des flèches.

3.2.2.2 Carte génétique de la population E3 $\times$ E8

A l'issu du traitement bio-informatique des données de séquençage des banques GBS, les résultats issus de 4 lignées DH et 21 lignées DH ont été éliminés respectivement à cause d'un niveau de couverture de séquençage insuffisant ou d'un niveau de 99,9 % de similarité génotypique avec d'autres lignées de la population. Les 135 lignées DH restantes et 992 SNPs ont finalement été utilisés pour la construction de la carte génétique. Ces 992 SNPs sont positionnés sur 12 groupes de liaison (LG) avec une longueur totale de la carte de 1441,8 cM (Figure 23). Grâce à l'ancrage de certains marqueurs sur le génome de l'aubergine et de la tomate, une correspondance entre les 12 LG et les 12 chromosomes de l'aubergine et de la tomate a pu être établie. Les LG contiennent entre 65 (E11) et 112 (E1) SNPs et ont une longueur comprise entre 87,7 (E12) et 170,2 (E1) cM. Sur les 992 séquences portant un SNP, 97,7% sont alignées sur les contigs de l'aubergine, 44,6 % sont alignées sur le génome de la pomme de terre, 39,9 % sont alignées sur le génome de la tomate et 27,9 % sont alignées sur le génome du piment. Les séquences alignées couvrent 55 des 56 blocs synténiques définis entre l'aubergine et la tomate (Hirakawa et al. 2014).

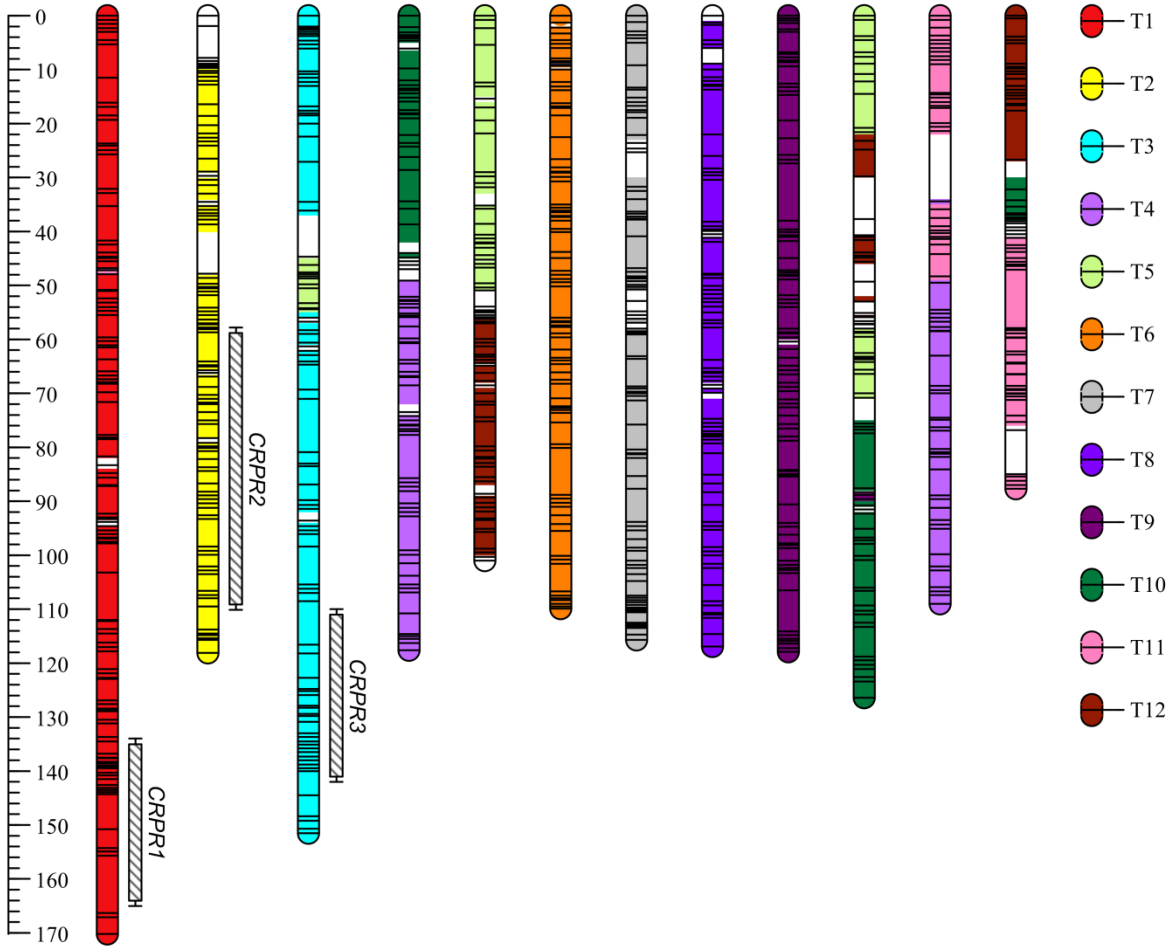


Figure 23: Carte génétique construite à partir de 992 SNPs et 135 lignées DH de la population DH E3 × E8. La position des SNPs est indiquée par un trait noir horizontal sur chaque groupe de liaison.

3.2.2.3 Analyses QTL

Les analyses QTL réalisées par la méthode MQM (fonction « stepwise » sous R/qtl) révèlent la présence de trois QTLs spécifiques sur les données obtenues dans la 4^{ème} répétition de l'essai (Tableau 11 et Figure 23). Le QTL *CRPR3* est détecté pour les variables W_a et CI sur le bras inférieur du chr 3. Ce QTL est aussi détecté sur les données combinées des 4 répétitions pour les deux mêmes variables et explique entre 10,2 et 15,3 % de la variance phénotypique. *CRPR1* et *CRPR2* sont eux détectés respectivement pour la variable W_a et CI, mais uniquement pour la 4^{ème} répétition. Aucun QTL n'a été détecté pour les répétitions 1, 2

et 3, analysées individuellement. Les effets additifs de tous les QTLs détectés sont négatifs, indiquant que les allèles de résistance proviendraient tous du parent résistant E3.

Tableau 11: Résultats d'une analyse QTL par la méthode MQM sur une population de 135 lignées DH issues du croisement E3 × E8.

Répétition	Var ^a	QTL ^b	Chr	Pos ^c	LOD ^d	Intervalle ^e	R ^{2f}	R _{tot} ^g	Add ^h
1	W _a (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
	CI (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
2	W _a (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
	CI (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
3	W _a (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
	CI (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
4	W _a (%)	CRPR2	E02	25,5	3,2	8,0-60,3	8,6	24,7	-5,6***
		CRPR3	E03	133,0	5,4	129,4-141,0	15,3		-7,6***
	CI (%)	CRPR1	E01	150,8	3,4	134,0-165,0	9,6	20,5	-7,5***
		CRPR3	E03	133,0	3,5	110,0-142,0	10,2		-7,8***
Comb	W _a (%)	CRPR3	E03	135,0	4,0	130,9-142,0	12,8	12,8	-3,6***
	CI (%)	CRPR3	E03	133,0	3,8	112,0-141,0	12,2	12,2	-5,4***

^a Les variables analysées sont l'AUDPC de l'incidence (W_a) et l'index de colonisation (CI)

^b Nom du QTL

^c position du QTL en cM

^d Logarithm of odd maximal

^e Intervalle de confidence à 95 % calculé par méthode bayésienne

^f Variance phénotypique expliquée par chaque QTL

^g Variance phénotypique totale expliquée par le modèle additif

^h effet additif

3.2.3 Discussion

A l'issu de ces travaux, nous avons généré une 3^{ème} carte génétique dense en marqueurs moléculaires que nous avons ancrée sur le génome de l'aubergine et sur celui des autres Solanacées. De nombreuses lignées DH ont été éliminées de la population à cause d'une très forte similarité de génotype avec d'autres. De ce fait la population utilisée pour les analyses

QTL est composée de seulement 135 DH. Dans cette étude, l'héritabilité des variables analysées est faible en particulier pour le SCO_{max} et le W_a ($h^2 \approx 0,25$). Le faible effectif de cette population limite la puissance de détection des QTLs à effet faible, a fortiori si l'héritabilité du trait analysé est faible (Gallais 2011). Par ailleurs la distribution continue et de type gaussien des variables suggère a priori la présence d'un système polygénique complexe, même si au final peu de QTLs ont pu être détectés dans cette étude. *CRPR3* est le seul QTL détecté sur les quatre répétitions combinées et il explique seulement entre 12 et 13 % de la variance phénotypique. En revanche, ce QTL n'est pas détecté sur les répétitions individuelles 1, 2 et 3, et sur ces trois répétitions combinées. La fiabilité des QTLs détectés dans cette étude est donc faible et leur présence devra être confirmée. Dans ce but, cette population est en cours de phénotypage avec la souche PSS4 dans les tunnels du CIRAD et des résultats sont attendus d'ici la fin du premier semestre 2017.

En raison du manque de fiabilité de ces données, la cartographie génétique de cette population n'a pas été intégrée à l'article de la partie 3.1 comme prévu initialement dans le projet de thèse. Cependant, la carte génétique dense construite à partir des 992 SNPs pourra servir dans de futurs projets de cartographie génétique de la résistance au BW, notamment sur une base multilocale. Pour l'instant, notre première étude suggère l'absence probable de gènes ou QTLs majeurs de résistance vis-à-vis de la souche PSS4 dans l'accession E3. D'autres sources de résistance devront donc être explorées pour espérer trouver des facteurs majeurs contrôlant ce type de souche virulente de phylotype I.

Conclusions du chapitre

Des QTLs de résistance ont été cartographiés dans les deux populations DH nouvellement créées vis-à-vis de souches virulentes contournant le gène majeur présent chez AG91-25. Nous avons détecté dans la population E4 × E8 un total de 11 QTLs de résistance à partir des analyses conduites sur les données de phénotypage obtenues avec les souches PSS4 (I) et R3598 (III). Parmi les QTLs détectés, *ERPR3a* et *ERPR6* sont détectés vis-à-vis des deux souches. Par ailleurs, *ERPR6* se situe sur un fragment chromosomique de l'aubergine qui est synténique de la région portant le QTL *bwr-6* chez la tomate. Le nombre de QTLs détectés dans la population E3 × E8, phénotypée uniquement avec la souche PSS4, est beaucoup plus faible. Seuls 3 QTLs (*CRPR1*, *CRPR2* et *CRPR3*) ont pu être détectés dans la répétition 4 uniquement. Les QTLs *CRPR2* et *CRPR3* co-localisent avec les QTLs *ERPR2b* et *ERPR3b* détectés dans la population E4 × E8. En raison de leur absence dans les trois autres répétitions, ces QTLs restent très hypothétiques. La validation de ces résultats nécessite des essais complémentaires en tunnels avec des plants dans des bonnes conditions de croissance. Afin de vérifier plus précisément si certains QTLs détectés dans les populations E8 × E6, E4 × E8 et E3 × E8 co-localisent, la construction d'une carte génétique consensus entre ces trois populations est envisagée. Les résultats obtenus sur les deux populations phénotypées avec la souche PSS4 suggèrent pour l'instant l'absence de QTLs de résistance majeurs vis-à-vis de cette souche très virulente. L'étude de l'accession S56B (E9) débouchera peut-être sur la découverte de nouveaux facteurs de résistance permettant de contrôler efficacement ce type de souches.

**Chapitre 4 – Transfert de la
résistance au flétrissement bactérien
dans deux cultivars d’aubergines
réunionnaises**

Préambule à l'article

Le flétrissement bactérien est un problème sanitaire majeur sur Solanacées à la Réunion, notamment sur tomate et aubergine. Les deux cultivars locaux d'aubergine « bringelle rond » (BR) et « bringelle saucisse » (BS) sont reconnus comme sensibles à la maladie avec pour conséquence l'utilisation d'un porte-greffe résistant provenant d'une aubergine sauvage (*S. Torvum*) qui est nécessaire pour la culture en plein champ. Cette méthode représente cependant un coût financier important pour les agriculteurs et l'amélioration de la résistance au BW des variétés locales BR et BS est une priorité. Pour répondre à cette demande, nous avons démarré le transfert de la résistance dans ces deux variétés. Les accessions E1 (MM853), E2 (MM643), E3 (MM152), et E6 (AG91-25, parent de la population RIL analysée dans le chapitre 2) ont montré des hauts niveaux de résistance vis-à-vis des souches de phylotype I (Lebeau et al. 2010). Ces accessions ont donc été choisies comme donneurs de résistance dans un schéma classique de transfert de la résistance par backcross successifs. Les backcross ont été effectués durant 6 cycles avec BS et BR comme parents receveurs. La souche GMI1000 a été utilisée, car jugée représentative des souches de phylotype I et contrôlée par *EBWR9* (anciennement nommé *ERs1*). En parallèle de la sélection sur phénotype, la présence de *EBWR9* et du QTL à large spectre *EBWR2* a été vérifiée, respectivement, grâce à un marqueur CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) et un marqueur SSR.

Introgression of bacterial wilt resistance in eggplant cultivars using phenotypic evaluation and molecular selection

Sylvia Salgon^{1,2,3}, Sylvain Lebon¹, Jean-Michel Baptiste¹, Thomas Deslandes³ and Jacques Dintinger¹

¹CIRAD, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion

²Université de la Réunion, UMR PVBMT, 97410 Saint-Pierre, La Réunion

³ARMEFLHOR, 97410 Saint-Pierre, La Réunion

ABSTRACT

Bacterial wilt is a devastated disease caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex. This bacterium affects important Solanaceae crops as eggplant. Solutions to fight this widespread disease are scarce and breeding resistant cultivars remains the most effective strategy. In this way, we developed a backcrossing scheme to improve the resistance level of two eggplant cultivars (named BR and BS) from Reunion Island. Four eggplant lines (E1, E2, E3, E6) resistant to a broad-range of strains in controlled conditions were used as resistant donors in the cross with BR and BS to produce eight F₁ generations. These generations were backcrossed during six cycles with the recurrent BR and BS parents. At each cycle, backcrosses lines were phenotyped by artificial inoculation of GMI1000 strain. After the third cycles of backcrossing marker-assisted-selection was also applied to lines issued from E6 resistant donor. In this way, two markers were used to check the presence of minor resistance QTL *EBWR2* and major resistance QTL *EBWR9* previously mapped in a population issued from E6. In the final cycle of backcrossing, we founded in each backcrosses highly resistant lines. Furthermore, we successfully verify that *EBWR2* and *EBWR9* have been introgressed. Finally, the produced BC₆F₁ seeds from selected resistant plants of BC₅F₁ are valuable material which will be used to produce resistant cultivar with the same agronomic characteristics than the local susceptible BR and BS cultivars.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, *Solanum melongena*, backcross, resistance, breeding

4.1 Introduction

Eggplant (*Solanum melongena* L.) is an important crop cultivated worldwide for its several nutritional and gustative qualities. It belongs to the solanaceae family which contains the very popular tomato, potato and pepper crops. Unlike the others crops of its family, which are native from the new world, eggplant originates from the old world. Eggplant was probably domesticated in Southeast Asia (Daunay and Janick, 2007; Bohs et al., 2016). Even if eggplant has later spread to the rest of the world, its production mainly concentrated in Asia (94% of global production, FAOSTAT 2013). It is considered as the King of vegetables in India and represents an essential food supply in the daily diet of Asiatic populations. “Bringelle rond” and “Bringelle saucisse” are two eggplant cultivars (*Solanum melongena* L.) created by CIRAD and commercialized in Reunion Island. They are very appreciated on the local market for their tasty fruit and a pretty good production. They are cultivated all year mainly in the lowlands areas. However, they are both susceptible to several pathogens such as the soil-borne bacteria *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC).

The RSSC is divided into monophyletic groups called phylotypes, which are correlated to their geographical origin: phylotype I is from Asia, phylotype II (subdivided in IIA and IIB) is from America, phylotype III is from Africa and phylotype IV is from Indonesia (Fegan and Prior 2005). Each phylotype can be further subdivided in clonal lineage called sequevar (Fegan and Prior 2005). Phylotypes I, II and III are present in different parts of Reunion Island with a large predominance of the phylotype I in eggplant production areas (Yahiaoui et al. 2016). The RSSC represents a major threat for eggplant production, sometimes leading to significant losses of yield. The bacterium enters in the plant roots and quickly spreads in the xylem vessels disturbing water transport and causing the typical wilting symptoms. The pathogen is very difficult to eradicate due to its very long persistence in field and its capacity to infect a large number of host weeds of several species (Hayward 1991). The presence of latent infection (absence of symptoms although the bacterium is developing inside the xylem of the plant) also increases the inoculum in the soil aggravating the problem. Efficient chemical control of the pathogen does not exist and prophylactic control is not effective enough. The best solution to control this pest remains the use of resistant cultivars. In Reunion Island, eggplant is usually cultivated in infected fields thanks to the rootstock “bringellier marron” (*Solanum Torvum*), a wild relative of eggplant that is resistant to bacterial and fungal

diseases (Gousset et al. 2005). However, using rootstock represents an important cost for farmers, particularly for an annual production of low cashability.

The introduction of BW resistance genes or quantitative trait loci (QTL) in the cultivars is an alternative to the costly use of these rootstocks. A common way to introduce resistance factors in susceptible lines is the plant breeding technique called backcrossing. For each backcross generation the more resistant plants are selected after artificial infections and crossed with the recurrent susceptible line. With the development of molecular markers and linkage maps, introduction of resistance factors has been fastened by the well-known marker-assisted selection (MAS) strategy (Lande and Thompson 1998; Collard et al. 2005). MAS can be applied for both resistance genes and QTLs. The MAS strategy is based on the availability of molecular markers closely linked with the resistance genes or QTLs. Linked markers are usually found after the construction of linkage map and the mapping of traits of interest. Sometimes the markers linked to the trait are not directly usable such as amplified fragment length polymorphism (AFLP) or restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers and need to be converted into breeder friendly markers. Simple sequence repeat (SSR) or Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) are common breeder friendly marker used in MAS. They are co-dominant, highly reproducible and do not require high-tech equipment.

Markers linked to BW resistance have been found in different crops. In tomato SSRs are linked to the major QTLs *Bwr-6* and *Bwr-12* respectively conferring resistance to both phylotype I and II, and phylotype I strains (Wang et al. 2013). In pepper SSR markers are also linked to *bw1*, a QTL conferring partial resistance to phylotype I (Mimura et al. 2009). In eggplant, 41 single nucleotide polymorphism (SNP) markers are linked to the major resistance QTL *EBWR9* (Salgon et al. submitted). *EBWR9* (previously called *ERs1*) was detected with strains GMI1000, PSS366 and CMR134 of phylotype I and led to incompatible interactions (Lebeau et al. 2013). Ten SNPs and one SSR markers were also linked to a minor resistance QTL *EBWR2* which partially controls strains of phylotype I, IIA and III. *EBWR9* and *EBWR2* were found in the *S. melongena* line AG91-25 which was created by Ano et al., (1991). Factors of resistance are also present in other *S. melongena* lines (Lebeau et al. 2010) but they have not yet been mapped and markers linked to them must be developed. Accordingly to these results, BW resistant genetic material is available and can be used to introgress resistance QTLs in commercial eggplant cultivars. In this study we decided to use the recurrent selection backcross scheme to introgress BW resistance from diverse eggplant lines

into the local “bringelle rond” and “bringelle saucisse” cultivars. At each backcross generation, selection of resistant genotypes was done under artificial inoculation. For the two last backcross generations, MAS was applied to facilitate the introgression of *EBWR9* and *EBWR2* QTLs that are present in the AG91-25 line in addition to phenotypic selection.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Inoculation procedure and symptoms evaluation

Phenotyping for BW resistance was performed against the GMI1000 phylotype I strain. We chose a strain of phylotype I because this phylotype is over-represented in Reunion Island. GMI1000 was considered as representative of phylotype I strains controlled by the *EBWR9* locus. Moreover, this strain has been used in several previous studies of BW resistance (Vailleau et al., 2007; Bernoux et al., 2008; Lebeau et al., 2013). GMI1000 strains were grown at 28°C on 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride medium (Kelman 1954). Bacterial suspension was prepared in Tris buffer (Trizma 0.01 M pH 7.2: Sigma, St Louis, USA) and adjusted to approximately 1×10^8 CFU per mL ($OD_{600nm} = 0.1$). Inoculum was delivered to the plantlets at 4-5 fully expanded leaf stage through the drip irrigation system. Right before, the plant root systems were wounded by knife to improve bacterium penetration in the plant. Symptoms evaluation was carried out once a week during five weeks according to the disease scale (0 to 4) defined in Lebeau et al. (2013). A plant was considered as wilted if its rating was superior to 0. For each evaluation date, the mean disease score (SCO) and the proportion of wilted plants (W) was calculated for each backcross families and controls.

At the end of the trial, symptomless plants, which were selected to be backcrossed with the recurrent parent, were then sampled to detect the presence/absence of latent infection. Latent infections and colonization index were determined as described in Lebeau et al. (2013).

4.2.2 Plant materials and crossing scheme

The accessions MM853 (coded E1), MM643 (coded E2), MM152 (coded E3), and AG91-25 (coded E6) were used as donors of resistance to BW. They are all *S. melongena* lines created by the “Institut National de la Recherche Agronomique” (INRA), Avignon, France. These accessions were previously characterized for resistance to BW in controlled conditions

and showed high level of resistance to strains of phylotype I (Lebeau et al. 2010). “Bringelle rond” (coded BR) and “Bringelle saucisse” (coded BS) were used as recipient varieties. BR and BS are *S. melongena* lines fixed from local populations by the “Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement” (CIRAD), Réunion.

First, both BR and BS cultivars were crossed with E1, E2, E3 and E6 to produce the 8 corresponding F₁. Then, 6 backcrosses with the respective recurrent parents were produced until the final BC₆F₁ generation. All backcross generations were grown in greenhouses of CIRAD (140 m elevation, 21°S, 55.3°E), while recurrent parents BR and BS were grown in greenhouses of the “Association Réunionnaise pour la Modernisation de l’Economie Fruitière, Légumière et HORTicole” (ARMEFLHOR ; 336 m elevation, 44.5°N, 1.5°E). At each backcross F₁ generation, ten resistant plants (selected as plants without wilting symptoms) were used as pollen donors to produce the next backcross. Backcrossing with the BR and BS recurrent parents usually took between 6 to 8 weeks, depending on the season. As the test of latent infection was lethal for the plant, it could only be done at the end of backcrossing. Thus, fruits issued from colonized parental backcrosses had to be eliminated a posteriori.

MAS was applied only on the BC₄F₁(BR×E6), BC₅F₁(BR×E6), BC₄F₁(BS×E6), and BC₅F₁(BS×E6) generations. Indeed, E6 being the only accession for which markers linked to resistance was available, thus MAS could only be applied on backcrosses with E6 accession. Generations BC₅F₁(BR×E6) and BC₅F₁(BS×E6) were selfed to produce BC₅F₂ generations, in order to select genotypes, in which resistance will be fixed as well as for evaluating them later for other agronomical traits of interest.

The backcross scheme is summarized in Fig. 1. Eggplant accession MM738 (E8) and tomato cultivar “Farmer” were used as susceptible controls all along the transfer of resistance. The recurrent parents BR and BS were added to the last step of the scheme to check BW resistance improvement in backcrossed lines.

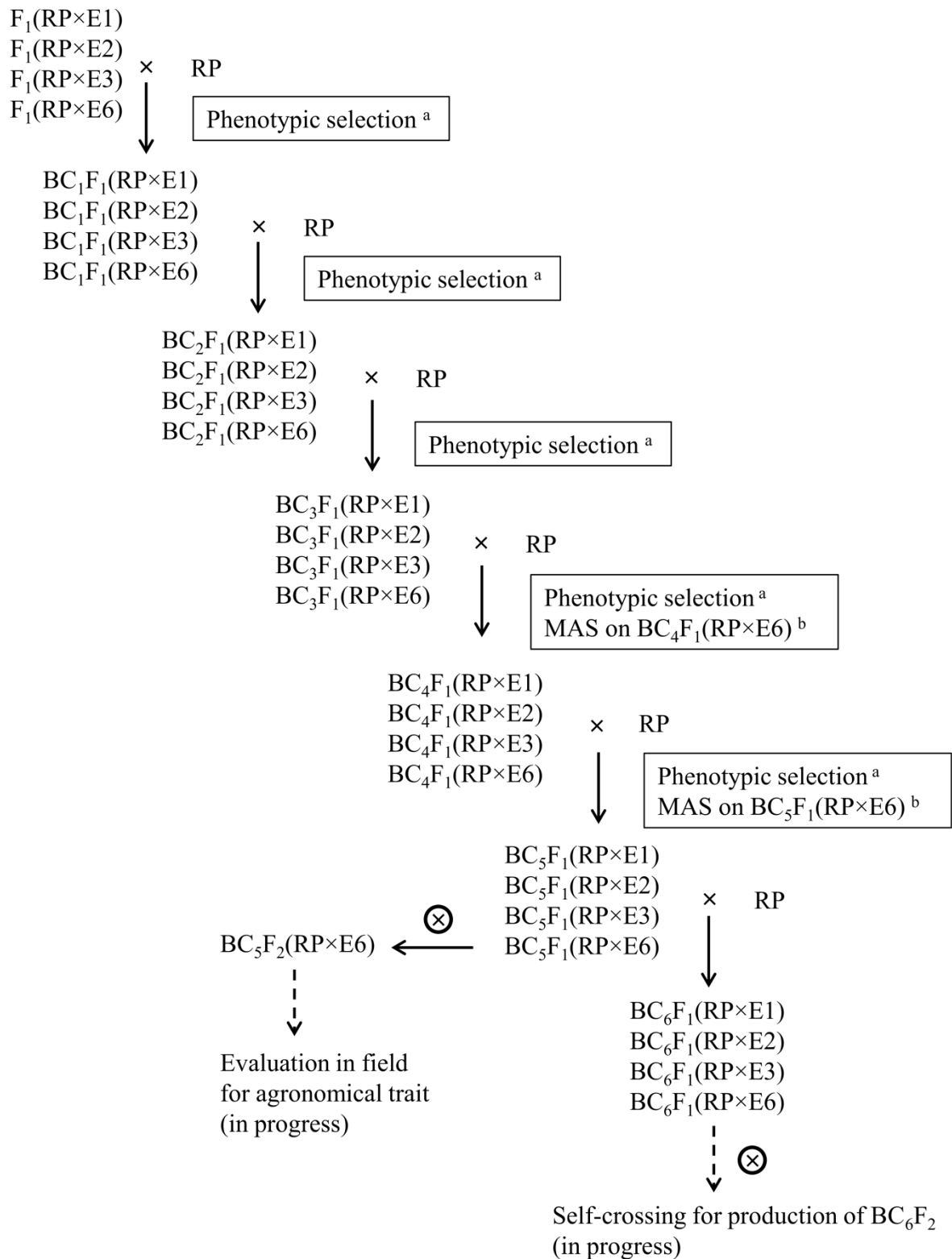


Fig. 1: Schematic representation of the breeding program; Introgression of BW resistance in the recipient parents (RP), "Bringelle rond" and "Bringelle saucisse".

^a Phenotypic selection is done after artificial inoculation and symptom evaluations. Plant selected do not present wilting symptoms and are free of latent infection.

^b Marker-assisted selection is done with marker ecm009 linked to *EBWR2* and s_903 linked to *EBWR9*.

4.2.3 Molecular marker analysis

Young leaves were harvested from each plantlet before the inoculation procedure and dried during one night at 28°C. Then, 20 mg of dried tissue were used to extract DNA with the Qiagen DNeasy plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified using NanoDrop 8000 spectrophotometer (Thermo Fisher) and diluted in sterile HPLC grade water to obtain a final concentration of 10 ng/μL. The SSR ecm009 marker linked to *EBWR2* QTL and the CAP s_903 marker in the physical interval of *EBWR9* QTL were used to select plants with resistant alleles from resistant AG91-25 accession. Primers for each marker are described in Table 1. PCR were performed in 20 μl of reaction mixture containing 40 ng template DNA, 1× reaction buffer (Green GoTaq Flexi Buffer, Promega Madison USA), 25 mM MgCl₂ (Promega), 6 mM dNTP mix (Promega), 2.5 μM of each forward and reverse primers. A quantity of 1 U and 0.5 U of GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (Promega) was used for ecm009 and s_903 markers, respectively. PCR were performed on 9700 GenAmp thermocycler (Applied BioSystems, Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

The program applied to ecm009 marker was as followed: (i) initial denaturation step at 94 °C for 5 min, (ii) 35 cycles of 94 °C for 30 s, 56 °C for 1 min, 72 °C for 1 min and (iii) 72 °C for 7 min. Then, electrophoreses was performed using the total PCR amplification volume on a 4 % agarose gel in 1× TAE buffer.

The program applied to s_903 marker was as followed: (i) initial denaturation step at 94 °C for 5 min, (ii) 35 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 45 s and (iii) 72 °C for 10 min. Then, digestion of the total PCR amplification volume (20 μl) was performed in 25 μl of reaction mixture containing 2.5 U of NcoI enzyme (Promega), 2.5 μg of acetylated BSA and 1× RE Buffer. The digestion was conducted at 37 °C during 4 H. Electrophoreses was performed with the total volume of digested PCR products on 3 % agarose gel in 1× TAE buffer. Gels were visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Table 1. Characteristics of markers used for BW resistance introgression

QTL	Chr. ^a	Donor parent	Linked marker	Forward primer	Reverse primer	Marker type	Digestion	Enzyme
<i>EBWR2</i>	E02	E6	ecm009 ^b	ATCTAGTACC ATCAAGTCTA AGCAGCA	GTTTAACAAC AGCTGAGGCC ATGAAA	SSR	no	-
<i>EBWR9</i>	E09	E6	s_903	CCCATTTCAC ACACAAGCAA	CTCTATTGCC ACCCCAAGTG	CAP	yes	NcoI

^aEggplant chromosome corresponding to detected QTL (Salgon et al. submitted)

^becm009 primers are published in Nunome et al. (2009)

4.2.4 Statistical analysis

Variables percentage of wilted plants (W) and percentage of colonized plants (CI) was computed using the R software environment version 3.3.1. Phenotypic segregation ratios of resistant and susceptible plants were evaluated in each backcross. A model with one dominant gene for BW resistance was tested according to the Mendelian segregation ratio expected in BCF₁ for this type of gene (Resistant:Susceptible = 1:1). Goodness of fit was assessed by a chi-square (χ^2) analysis. The association between the markers and the number of wilted or colonized plants were evaluated using a binomial generalized linear model (GLM) with canonical logit-link (glm function in R). Analyses of variances (ANOVA) were then conducted to test the significance of the associations.

4.3 Results

4.3.1 BW resistance segregation in backcross generations

In the first generation (BC₁F₁), the different backcrosses showed a high proportion of resistant plants. The highest incidence was obtained with the BC₁F₁(BS×E1) and the lowest incidence was obtained with the BC₁F₁(BR×E6) (Table 2). As positive controls were not included in this generation, we could not verify the inoculation success and further analysis were not conducted for the BC₁F₁.

In the second generation, the BW susceptible eggplant accession E8 and tomato cultivar farmers were added as positive control. The high incidence level observed on both controls highlighted the good success of inoculation (Table 2). BC₂F₁ from the E6 resistant donor were the more resistant with the majority of plants symptomless and without bacteria colonization.

The other backcrosses showed a high proportion of symptomless plants with colonization suggesting the implication of tolerance mechanism. Chi-square values indicated that the expected Mendelian 1:1(Resistant:Susceptible) ratio (for a model with one single dominant gene) was observed in the BC₂F₁(BR×E1), BC₂F₁(BS×E1) and BC₂F₁(BS×E2) generations (Table 3). However, the expected 1:1 ratio was not observed in the other backcrosses.

In the third generation, the low percentage of wilted plants of E8 and Farmers indicated that the inoculation pressure was not sufficient. Besides, the mean incidences in the different backcrosses were low, with a maximal W of 25.9 % in the BC₃F₁ (BR×E1) supporting the hypothesis of an insufficient inoculum pressure in this generation (Table 2). Thus, chi-square tests were not conducted in this generation of backcrosses.

In the fourth generation, the mean W and CI of controls indicated a sufficient inoculum pressure (Table 2). The BC₄F₁ issued from E6, exhibited the higher resistance. The other BC₄F₁ backcrosses issued from other sources of resistance were moderately resistant but exhibited a high proportion of symptomless plants with colonization. This high level of colonized plants was also observed previously in the BC₂F₁ crosses supporting the hypothesis of tolerance mechanism implications. Chi-square tests indicated that BC₄F₁(BR×E1), BC₄F₁(BR×E2), BC₄F₁(BS×E1), BC₄F₁(BS×E2) and BC₄F₁(BS×E3) followed a Mendelian 1:1 segregation ratio whereas the segregation in the other backcrosses strongly deviated from the expected ratio (Table 3).

In the final generation, only E8 were included as positive control. E8 reached a final incidence of 100% indicating that the inoculation pressure was high for this assay. For this final generation, BC₅F₁ issued from E6 were selected according to the genotypes at s_903 and ecm009 markers before transplantation in greenhouse. When possible, progenies homozygous for E6 alleles at both markers were selected. Otherwise, we selected progenies homozygous for E6 alleles at s_903 or at ecm009 markers. The mean incidences of these backcrosses were very low as expected with a pre-selection with markers. Among the other backcrosses, the BC₅F₁ issued from E3 had the highest resistance level. BC₅F₁ issued from E1 and E2 exhibited a high proportion of wilted and colonized plants. In this generation, only segregation in the BC₅F₁(BS×E1) followed the expected ratio. In all other backcrosses, observed ratio strongly deviated from the expected ratio (Table 3). Both BR and BS parental susceptible plants were intermediately susceptible with respective W of 35% and 50% and respective CI of 40 and 50%.

Table 2. Mean values for W and CI in each backcross generation and control obtained after inoculation with GMI1000 strain.

Backcross generation	Trait	BR×E1	BR×E2	BR×E3	BR×E6	BS×E1	BS×E2	BS×E3	BS×E6	E8 ^a	Farmer ^a	BR	BS
1	W (%)	11.7	8.3	3.3	0.0	21.7	13.3	6.2	5.0	-	-	-	-
	CI (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	W (%)	42.6	19.6	31.5	6.6	37.7	42.3	22.2	0.0	93.3	83.9	-	-
	CI (%)	83.3	23.5	81.5	11.5	81.1	76.9	71.7	5.0	100	100	-	-
3	W (%)	25.9	2.0	1.9	0.0	24.1	1.9	7.4	1.9	68.2	40.9	-	-
	CI (%)	40.7	6.1	1.9	0.0	35.2	1.9	11.1	1.9	68.2	68.2	-	-
4	W (%)	62.7	52.8	27.5	7.1	53.7	52.8	55.8	17.8	87.5	46.4	-	-
	CI (%)	88.2	58.3	60.8	11.9	83.3	71.7	82.7	33.3	91.7	82.1	-	-
5	W (%)	34.6	24.4	28.9	4.3	64.0	69.8	14.0	4.2	100	-	35	50
	CI (%)	42.3	41.5	35.6	4.3	70.0	79.2	24.0	4.2	100	-	40	50

^aEggplant cultivar E8 and tomato cultivar Farmer used as positive control.

Table 3. Segregation analysis in the second, the fourth and the fifth backcrosses for resistance to BW.

Cross	BC ₂ F ₁				BC ₄ F ₁				BC ₅ F ₁			
	R ^a	S ^b	χ ² ^c	p ^d	R	S	χ ²	p	R	S	χ ²	p
BR×E1	31	23	1.19	0.28	19	32	3.31	0.07	34	18	4.92	0.03
BR×E2	41	10	18.84	1.42e ⁻⁰⁵	17	19	0.11	0.74	31	10	10.76	1.04e ⁻⁰³
BR×E3	37	17	7.41	6.50e ⁻⁰³	37	14	10.37	1.28e ⁻⁰³	32	13	8.02	4.62e ⁻⁰³
BR×E6	57	4	46.05	1.15e ⁻¹¹	39	3	30.86	2.78e ⁻⁰⁸	22	1	19.17	1.19e ⁻⁰⁵
BS×E1	33	20	3.19	0.07	25	29	0.30	0.59	18	32	3.92	0.05
BS×E2	30	22	1.23	0.27	25	28	0.17	0.68	16	37	8.32	3.92e ⁻⁰³
BS×E3	42	12	16.67	4.46e ⁻⁰⁵	23	29	0.69	0.41	43	7	25.92	3.56e ⁻⁰⁷
BS×E6	60	0	59.99	9.49e ⁻¹⁵	37	8	18.69	1.54e ⁻⁰⁵	23	1	20.17	7.10e ⁻⁰⁶

^aNumber of non-wilted plants.

^bNumber of wilted plants.

^cQui-square value according to a 1:1 expected segregation ratio in BCF₁.

^dProbability that observed segregation ratio reflect the expected segregation ratio. For p < 0.05, deviations from the expected ratio are significant.

4.3.2 Introgression of *EBWR2* and *EBWR9* with molecular markers

Selection on molecular marker was done with the ecm009 SSR linked to *EBWR2* and the s_903 CAP designed in the physical interval of *EBWR9* (1.77Mbp). Ecm009 were polymorphic between the E6 and BR lines (Fig. 2A) and polymorphic between E6 and BS lines (Fig. 2B). Ecm009 amplification size for E6 was estimated to be 250 bp for E6 and 230 bp for BR and BS after comparison with the 100 bp DNA ladder. Among the BC₄F₁(BR×E6) generation, 47 lines were amplified. 13 plants were heterozygotes and 34 lines were homozygous for susceptible allele (Fig. 2A). Among the BC₄F₁(BS×E6) generation, 51 lines were amplified. Four lines were heterozygotes and 47 were homozygous for susceptible allele (Fig. 2B). s_903 amplification size for E6, BR and BS before digestion was estimated to be 200 bp. NcoI enzyme only digested amplicons from BR and BS giving two fragments of 90 and 110 bp approximate sizes (Fig. 3). Among the BC₄F₁(BR×E6) generation, 47 lines were amplified and digested. 42 lines were heterozygotes and five lines were homozygous for susceptible allele (Fig. 3A). Among the BC₄F₁(BS×E6) generation, 51 lines were amplified and digested. 30 lines were heterozygotes and 21 lines were homozygous for susceptible allele (Fig. 3B).

Among the BC₄F₁(BR×E6) generation, 11 lines contained the both ecm009 and s_903 resistant allele (Table 4). These lines were chosen in priority to produce the next backcross. Among the BC₄F₁(BS×E6) generation, we did not find lines with both ecm009 and s_903 resistant allele (Table 4). Thus, we selected lines with the s_903 resistant allele and homozygous for the ecm009 susceptible alleles and lines with the ecm009 resistant allele and homozygous for the s_903 susceptible alleles.

Markers analyses were conducted in the same way on the BC₅F₁ generation (data unshown).

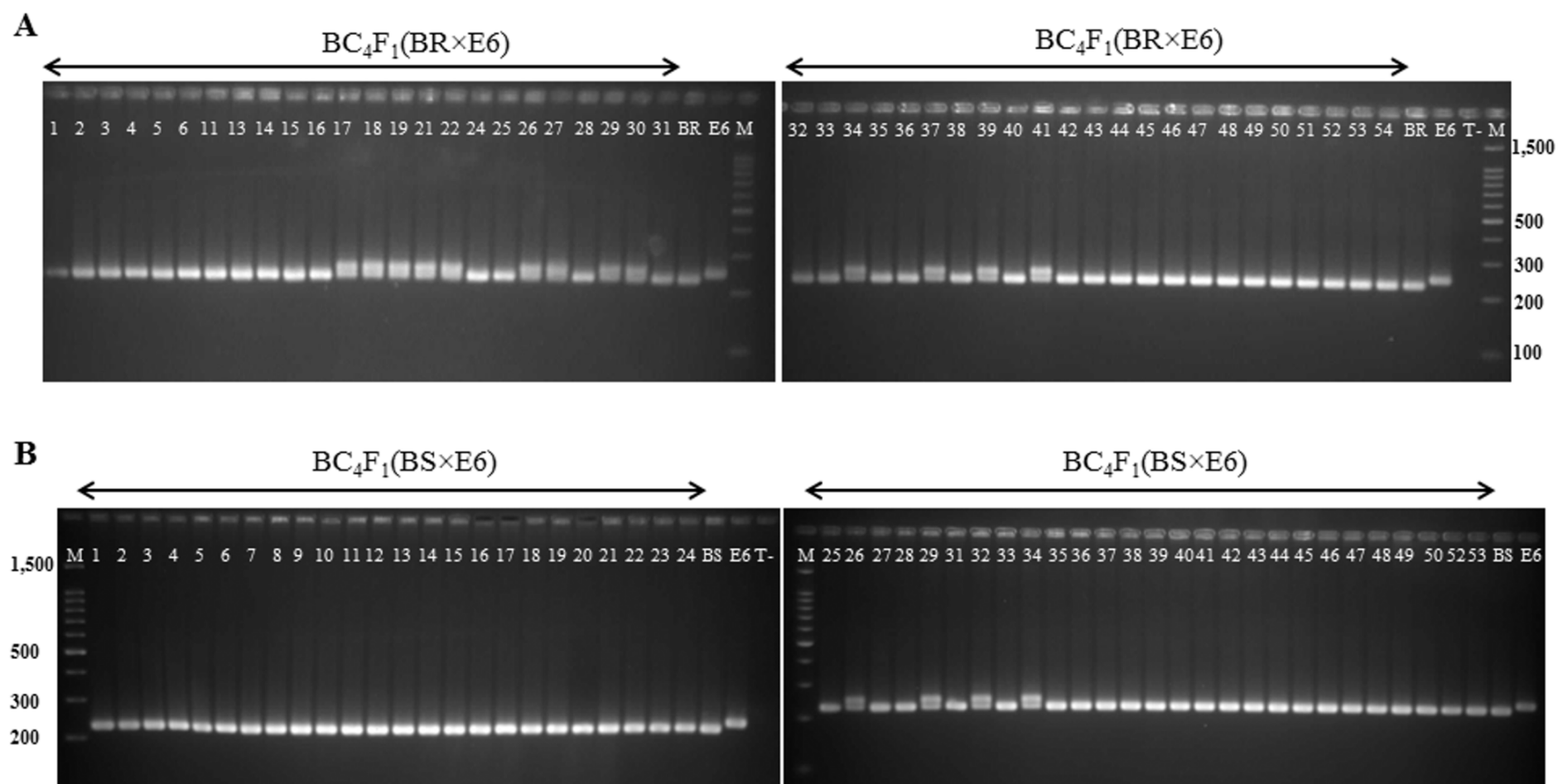


Fig 2. Agarose gel obtained after amplification with the ecm009 markers of the BC₄F₁(BR×E6) lines (A) and the BC₄F₁(BS×E6) lines (B). M: Ladder 100 bp; BR: ‘bringelle rond’ cultivar, susceptible recipient parent; BS: ‘bringelle saucisse’ cultivar, susceptible recipient parent; E6: AG91-25 accession, resistance donor parent; T- : negative control, PCR mixture reaction without DNA.

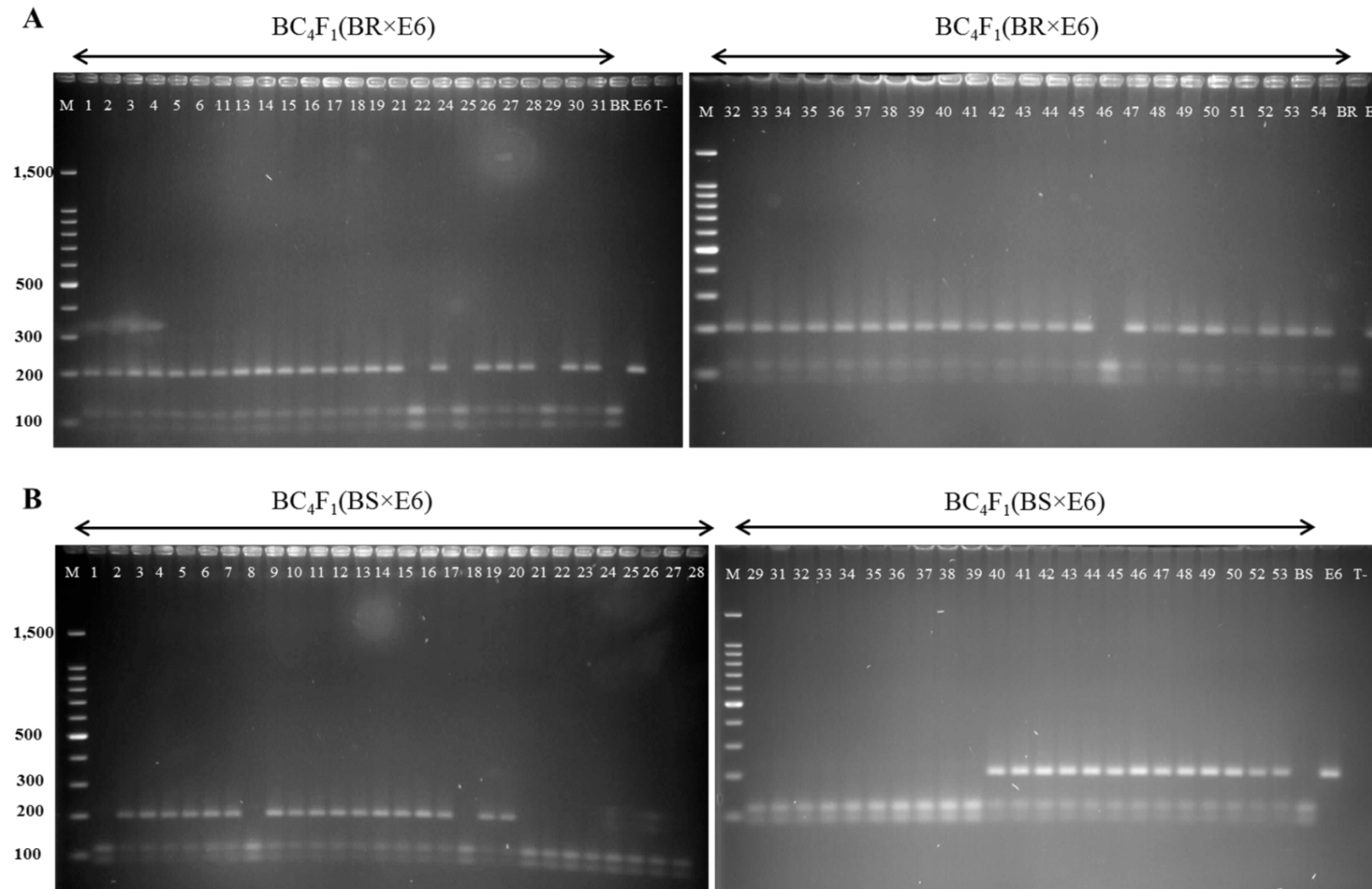


Fig 3. Agarose gel obtained after amplification with the s_903 markers of the BC₄F₁(BR×E6) lines (A) and the BC₄F₁(BS×E6) lines (B). M: Ladder 100 bp; BR: 'bringelle rond' cultivar, susceptible recipient parent; BS: 'bringelle saucisse' cultivar, susceptible recipient parent; E6: AG91-25 accession, resistance donor parent; T- : negative control, PCR mixture reaction without DNA.

Table 4. Segregation of the s_903 and ecm009 markers in BC₄F₁.

Backcross	BC ₄ F ₁ (BR×E6)				BC ₄ F ₁ (BS×E6)			
ecm009/s_903 ^a	AA/AA	AA/AB	AB/AA	AB/AB	AA/AA	AA/AB	AB/AA	AB/AB
Number	2	32	2	11	17	30	4	0

^aGenotype at ecm009/s_903; A = allele from BR or BS; B = allele from E6.

4.3.3 Markers linkage to BW resistance

Association between ecm009 and s_903 marker were tested in the BC₄F₁ backcrosses from E6 accession. Ecm009 was not linked to W or CI trait neither in individual backcrosses BC₄F₁(BR×E6) and BC₄F₁(BS×E6) nor in combined backcrosses with P-value > 0.05 (Table 5). S_903 was significantly associated to both W and CI trait in BC₄F₁(BS×E6) and combined backcrosses with P-value < 0.001 but no significant association was found in BC₄F₁(BR×E6).

Table 5. P-value for association of markers with BW resistance in BC₄F₁ backcrosses with E6. P-value < 0.05 indicates significant linkage between variable and marker.

Marker	Variable ^a	BR×E6 ^b	BS×E6 ^c	BR×E6 and BS×E6 ^d
ecm009	W	0.17	0.50	0.47
	CI	0.07	0.22	0.38
s_903	W	0.23	5.53e ⁻⁰⁵	2.94e ⁻⁰⁵
	CI	0.44	2.13e ⁻⁰⁷	7.25e ⁻⁰⁸

^aBinomial value for W(wilted/non wilted) and CI(colonized/non colonized).

^bBackcross BC₄F₁(BR×E6).

^cBackcross BC₄F₁(BS×E6).

^dCombined data of BC₄F₁(BR×E6) and BC₄F₁(BS×E6).

4.4 Discussion

Improving crops for disease resistance is a major goal of plant breeding. It is often the only effective way to control a pathogen. In the present work, resistance factors for resistance to the devastating RSSC phylotype I were introgressed in two susceptible eggplant cultivars. After 6 cycles of selection under artificial inoculation, we found resistant lines (without symptoms and colonization) in each backcross, whereas the E8 accession control was 100% wilted, indicating the success of artificial inoculation method. However, our results suggest that the recipient lines BR and BS are partially resistant, contrary to farmer's report in

Reunion Island. The higher-than-expected resistance level encountered in BR and BS cultivar could be due to the use of GMI1000 strain to select resistant lines. Actually, Reunion Island strains could be more virulent than the chosen GMI1000 phylotype I sequevar 18 strain. Recent extensive sampling of RSSC strains conducted in Reunion Island (789 strains in 41 sites) highlighted the predominance of the phylotype I sequevar 31 (Yahiaoui et al. 2016). In this same study, the phylotype I sequevar 31 was also largely found in Mauritius, Seychelles, Comoros and Mayotte island demonstrating the importance of this sequevar in the South-West Indian Ocean. Since we had no knowledge about Reunion Island strains when the breeding program began, we choose GMI1000 to represent the strains controlled by *EBWR9* QTL. However, in future work, selected lines in the different backcrosses should be tested in naturally infected field or in greenhouse with strains representative of the sequevar 31 group to confirm their resistance to BW.

QTL *EBWR9* together with the *RE-bw* cloned gene are the only known BW resistance factors in eggplant. Whereas *RE-bw* is the only one gene of resistance to be characterized in eggplant as well as in Solanaceous crops, its spectrum of resistance against the large genetic diversity of the RSSC remains unstudied. *EBWR9* is a locus located on the long arm of chromosome 9. Candidate genes have been found under the QTL interval but have not been characterized yet. However, its spectrum of resistance has been studied facing a collection of eight strains of phylotype I, IIA, IIB and III (Salgon et al. in prep). Thus, it represents an interesting factor of resistance as it can be judiciously used according to the phylotype repartition in infested areas. When the backcrossing scheme began, breeder friendly markers linked to the *EBWR9* were scarce. The CAPs marker s_903 was developed from the transcriptome of MM738 (Sarah et al. 2016). It has been designed from the singlet__89032 located on the Sme2.5_03583.1 contig. This contig was mapped at 108.5 cM in the map of the E8×E6 RIL population and the *EBWR9* locus position was estimated between 105.8 and 106.8 cM. The s_903 marker flanking the upper QTL interval limit is thus an interesting marker to use in MAS. However, markers flanking the lower interval limit and markers inside the confidence interval should be add in the MAS scheme in order to eliminate the risk of recombination events in *EBWR9* QTL. New markers design inside and around *EBWR9* QTL is in progress and will be applied for the fixation of BC₆F₁ generations.

Linkage of s_903 to BW resistance was verified in the BC₄F₁(BS×E6) but not in the BC₄F₁(BR×E6). This absence of linkage in the BC₄F₁(BR×E6) could be due to the small

number of plants homozygotes for susceptible “A” allele for the s_903 marker. Actually in this backcross the plants with the “AB” genotype were highly predominant (4 lines with “AA” genotypes and 43 lines with “AB” genotypes). This skewed segregation ratio was also observed in the BC₄F₁(BS×E6) but it was less pronounced. The predominance of lines heterozygotes in *EBWR9* locus was also observed in the BC₅F₁ lines (data unshown). The skewed ratio in favor of the resistant allele was previously observed in the RILs E8×E6 population. Severe segregation distortions of markers could be associated to male sterility or gametophytic and zygotic genetic factors (Falconer and Mackay 1996; Harushima et al. 2001). These results suggest that *EBWR9* locus is probably linked to this type of genetic factors resulting in a selective advantage of genotypes wearing the segments from E6 parental line. Presence of male sterility genes in *EBWR9* locus supports this hypothesis. Higher than expected frequencies of heterozygotes through backcross generations have also been reported in tomato (Fulton et al. 1997). In this study, the introgression of *S. lycopersicum peruvianum* (wild relative of tomato) genome into *S. lycopersicum esculentum* (tomato) was done through backcrossing and segregation was observed in each generation. Segregation distortion was observed for different part of chromosomes but the highest distorted markers were observed near the top telomeric region of chromosome 9. Markers in this region were highly skewed towards the wild allele. This region can correspond to the position of *EBWR9* locus which is also near the telomeric region of chromosome 9. Moreover, markers in *EBWR9* are skewed towards the resistant E6 parent which is an INRA line creation from successive cross between *S. melongena* and a wild eggplant relatives *S. aethiopicum* (Ano et al. 1991). These results suggest the presence in the chromosome 9 telomeric region of genes conferring a better fitness of both *S. lycopersicum peruvianum* and *S. aethiopicum* compared to their relative's tomato and eggplant species. Finally, these results indicate that *EBWR9* resistant allele can be easily introgressed in susceptible background even if MAS was not applied thank to the selective advantage of heterozygous plants. This indicates that inexpensive breeding program using only artificial inoculation selection on a limited number of plants can be applied. This is of particular interest in area where molecular genetics laboratories are not common.

Contrary to *EBWR9*, *EBWR2* was selected only on molecular markers as the strain used for artificial inoculation was not controlled by this QTL. As expected, the ecm009 marker was not linked to the W and CI variables observed with the GMI1000 strain. In order to check the success of this introgression, the BC₅F₂ plants should be tested in future work with strains for which a significant effect was found at this locus *EBWR2* (strains CFBP2957 phylotype IIA

and CFBP3059 phylotype III). However, *EBWR2* confers only partial resistance to strains of phylotype IIA and III and can only delay symptoms progression with virulent strains of phylotype I. Thus, the characterization of novel genetic factors of resistance against virulent RSSC strains will be necessary for breeding resistant broad-spectrum cultivar.

Due to its ability of recombination, its patterns of dissemination, its large host range and its virulence plasticity, the phylotype I of the RSSC have been found to possess the highest evolutionary potential (Wicker et al. 2012). Deployment of cultivar with single resistance genes against this type of pathogen is accompanied by the risk of resistance breakdown at more or less long term. In this work, we had anticipated the possibility of *EBWR9* breakdown by creating cultivars with resistance from four different accessions. Selection of backcrosses from resistant accessions E1, E2 and E3 were done only on phenotypic value without any knowledge of the type of resistance implicated. According to the chi-square analysis, backcrosses from BR×E1 and BS×E1 can fit the expected 1:1 (resistant/susceptible) ratio for a model with a single dominant gene. The single dominant gene model remains less clear in backcrosses from E2 and E3 for which we observed broad range of P-value. This deviation from the 1:1 ratio can results from the low effective of backcrosses (about 60 plants per backcrosses). In order to test gene models accordance, Chi-square tests should be re-conducted on larger backcrosses effectives. Besides, the deviation observed in segregation ratio can also results from different gene model with few major resistance genes (qualitative resistance) or several minor resistance genes (quantitative resistance). Study about resistance durability indicate that the most effective strategy to provide durable resistant cultivar was the pyramiding of genes that differ in their mechanism (Djian-Caporalino et al. 2014). However this strategy requires knowledge about the mechanisms of BW resistance. These mechanisms have been poorly studied in cultivated species and the lack of linked markers to resistance QTLs and genes hampers the creation of resistant durable material. Studying resistance mechanisms require the creation of segregating population which is labor expensive and time consuming. Another strategy to speed-up the screening of lines differing in their resistance mechanism is the use of bacterial type III effectors. These effectors are known to trigger a specific hypersensitive reaction in plants which have the corresponding R-Gene (Avr-R genes interaction). In this way the identification of *RipAX2* as the potential avirulence effector of *EBWR9* (previously called *ERs1*) (Guinard et al. 2016b) will help to verify if we have mechanisms redundancy in the four resistance parental donors.

4.5 Acknowledgements

We thank Arthur Broggio, Mathieu Duvignau, Steve Payet, Laure Etienne (ARMEFLHOR, Réunion, France), Didier Fontaine, Séverine Rivière and Marie Terville (CIRAD, Réunion, France) for their technical support. We thank Christopher Sauvage (INRA, Avignon, France) for providing the transcriptome of parent MM738 which was used to designed marker s_903 and Anne Frary and Sami Doganlar (IYTE, Izmir, Turkey) for helping in the marker development. We thank Cyril Jourda and Emmanuel Wicker for enriching discussions. We also thank Marie-Christine Daunay for providing the seeds of E1, E2, E3, E6 and E8 accessions. The authors greatly acknowledge the Plant Protection Platform (3P, IBISA). This research was financially supported by the Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole (ARMEFLHOR), by the Centre de Coopération internationale en Recherche agronomique pour le Développement (CIRAD), by the Ministry of Agriculture, Food, Fisheries, Rural Affairs and Spatial Planning through the “RESAUBER” project (CASDAR C-2013-09) and by the Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) through the CIFRE PhD. Grant No. 2013/1477 of S. Salgon. This work was also funded by the European regional development fund (ERDF), by the Conseil Régional de la Réunion and by the Conseil Général de la Réunion.

Conclusions du chapitre

Six backcross successifs ont été réalisés sur les deux lignées receveuses BR et BS après les croisements de départ avec les 4 donneurs de résistance. Huit générations BC_6F_1 ont ainsi été générées au cours de ce projet à partir des F_1 BS $\times$ E1, BS $\times$ E2, BS $\times$ E3, BS $\times$ E6, BR $\times$ E1, BR $\times$ E2, BR $\times$ E3, BR $\times$ E6. Dans chaque génération F_1 de ces backcross, des individus résistants ont été identifiés après inoculation artificielle des plants par la souche GMI1000. A partir de la 4^{ème} génération de backcross, nous avons complété cette sélection phénotypique par l'utilisation de marqueurs moléculaires, qui nous ont permis de confirmer (ou non) la présence de l'allèle dominant du QTL majeur *EBWR9* et/ou du QTL *EBWR2*. Ne disposant pas de marqueurs utilisables en SAM liés au QTL *EBWR14* (détecté avec les souches CFBP2957 et CFBP3059 des phylotypes IIA et III), ce QTL n'a pas pu être introgressé. Malgré la prévalence du phylotype I à la Réunion, la possible présence de souches des phylotypes II et III a également été signalée. Le développement de marqueurs « breeder friendly » liés à *EBWR14* est donc nécessaire afin d'espérer contrôler une majorité des souches présentes à La Réunion. Des BC_5F_2 ont été produits à partir des plants résistants sélectionnés dans les BC_5F_1 BS $\times$ E6 et BR $\times$ E6, cela afin de vérifier la fixation possible d'*EBWR9*. Ce travail sera fait également sur les individus résistants qui seront prochainement sélectionnés dans les BC_6F_1 . Ces versions de BR et BS reconverties pour la résistance représentent un matériel intéressant pour démarrer la sélection sur critères agronomiques. Des nouveaux marqueurs codominants issus des résultats présentés dans le chapitre 2 sont en cours de développement. Ces marqueurs, développés à partir des séquences flanquantes d'*EBWR9*, nous permettront de sélectionner plus sûrement ce dernier dans les générations BC_5F_2 et BC_6F_2 qui vont respectivement être testées et produites au cours de cette année. Les individus BC_5F_1 produits à partir des aubergines E1, E2 et E3 ont été sélectionnés uniquement sur leur niveau de résistance à la souche GMI1000. Depuis le début de ce projet, des populations DH issues de ces accessions ont été créées (E1 $\times$ E8, E2 $\times$ E8, E3 $\times$ E8). Ces populations pourront être utilisées pour cartographier les facteurs de résistance issus de ces accessions et développer des marqueurs liés aux éventuels QTLs détectés. Les marqueurs pourront ensuite être utilisés pour vérifier si les allèles résistants sont présents dans les BC_6F_1 . L'objectif à terme est de créer des cultivars locaux possédant des QTLs de résistance différents et pouvant être utilisés dans le contrôle durable des souches du phylotype I présentes à la Réunion.

Chapitre 5 – Discussion et perspectives

La sélection de variétés d'aubergine résistantes au BW nécessite d'identifier des gènes et QTLs de résistance et de définir leur efficacité et leur spécificité vis-à-vis des différentes espèces et souches de la bactérie. Cette thèse avait pour objectif académique de mieux connaître le spectre d'action et l'efficacité de la résistance présente chez AG91-25 (E6). En parallèle, des facteurs de résistance complémentaires impliqués dans le contrôle des souches virulentes contournant le facteur de résistance majeur *Ers1* ont été recherchés dans d'autres populations d'aubergines. Un objectif plus appliqué était de tester le transfert potentiel de cette résistance dans des cultivars sensibles à la Réunion.

Une majeure partie de cette thèse a consisté à poursuivre le travail de caractérisation de la résistance ségrégeant dans une population de RILs issues d'un croisement entre MM738 (S) et AG91-25 (R), travail entamé durant la thèse d'A. Lebeau (Lebeau 2010). La densification de la carte génétique initiale avec des SNPs issus de la technique GBS a permis de préciser la position du facteur majeur de résistance *ERs1*. Grâce à l'ancrage de notre carte génétique sur la carte physique de la tomate, *ERs1*, renommé *EBWR9*, a été positionné sur le chromosome 9 de l'aubergine dans une région correspondant à une zone physique comprise entre 69,4 et 71,2 Mb sur le chromosome 9 de la tomate. Ce QTL confère une forte résistance vis-à-vis de trois souches du phylotype I. Cette zone physique restreinte (1,8 Mb) portant 237 gènes, correspond à une portion synténique du chromosome T09 de la tomate. L'analyse du transcriptome des lignées parentales MM738 et AG91-25 de la population analysée a révélé la présence de 195 gènes exprimés dans cette zone, dont 46 % sont des gènes de fonction inconnue. Le clonage du ou des gènes résistants sous-jacents au QTL *EBWR9* nécessite donc une cartographie plus fine du locus. Pour cela, nous pourrions utiliser les 8 familles de RILs présentant une hétérozygotie résiduelle dans l'intervalle génétique de 1 cM d'*EBWR9*, (familles HIF, Heterogeneous inbred families) (Figure 24). Grâce aux transcriptomes des deux lignées parentales produits dans le cadre du projet ARCAD (<http://www.arcad-project.org/>), une recherche de gènes candidats a pu être conduite montrant la présence au locus *EBWR9* de 7 transcrits codant 5 RGA. Ces 7 transcrits présentent tous des allèles différents entre les deux parents et sont donc des gènes candidats intéressants.

Par ailleurs, les travaux de Lebeau et al. (2013) ont montré une possible spécificité d'*EBWR9* vis-à-vis de certaines souches du phylotype I (GMI1000, CMR134 et PSS366) et la présence de souches à l'intérieur de ce même phylotype capables de contourner *EBWR9* (PSS4). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons testé la population RILs MM738 x AG91-25 avec des souches appartenant aux phylotypes I (TO10), IIA (CFBP2957), IIB (CMR34) et III

(CFBP3059). *EBWR9* n'a pas été détecté dans ces essais avec aucune de ces souches. Ces résultats suggèrent donc bien une possible spécificité de la résistance, conférée par *EBWR9*, vis-à-vis de souches du phylotype I. Des QTLs de résistance ont par contre été détectés vis-à-vis de ces différentes souches: *EBWR2* détecté sur le chromosome 2 de l'aubergine est le QTL qui présente le spectre de résistance le plus large. Il est aussi le seul QTL détecté vis-à-vis des souches virulentes du phylotype I (PSS4, TO10), permettant de ralentir la progression de la maladie. Un second QTL, *EBWR14* est détecté sur le chromosome 5 de l'aubergine avec les souches CFBP2957 (IIA) et CFBP3059 (III). Les individus de la population possédant les allèles du parent résistant aux locus *EBWR2* et *EBWR14* présentent un niveau de résistance élevé vis-à-vis de ces souches. Ceci montre l'importance de ces deux QTLs pour l'amélioration variétale vis-à-vis de souches non contrôlées par *EBWR9*.

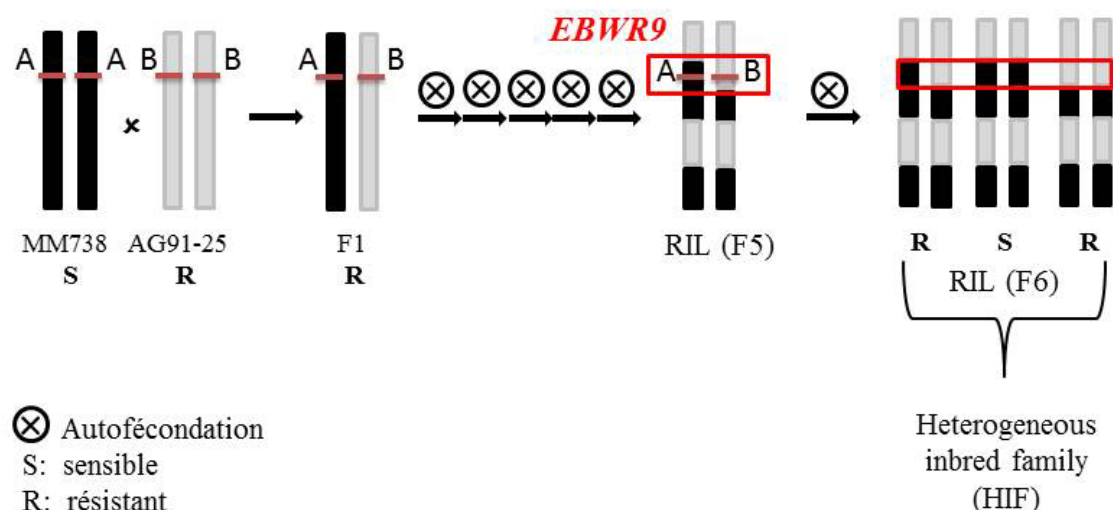


Figure 24: Représentation graphique de l'obtention des Familles HIF dans la population de RILs

Ces résultats montrent tout l'intérêt de l'accension AG91-25 comme source de résistance à spectre large pour contrôler une part de la diversité génétique du pathogène. Cependant, AG91-25 s'est montré relativement inefficace vis-à-vis de souches virulentes du phylotype I en Asie, mais aussi de souches du phylotype III en Afrique, comme l'ont montré les essais conduits au Cameroun par la société Technisem vis-à-vis de la souche R3598 (Stage Morgane Raynal, 2015). Il est donc important de rechercher des facteurs de résistance complémentaires

à ceux détectés dans l’accession AG91-25. C’est dans cette perspective que nous avons initié l’étude des résistances présentes dans les accessions MM152 (E3) et EG203 (E4), qui, avec l’accession S56B (E9), constituent les meilleures sources de résistance potentielles vis-à-vis de souches virulentes contournant le gène majeur telles que PSS4 (Lebeau et al. 2010). Les essais de cartographie conduits sur la population DH EG203 (R) × MM738 (S) ont mis en évidence un système de résistance polygénique vis-à-vis des souches PSS4 et R3598. Au total 11 QTLs ont été détectés pour la résistance à la souche PSS4 (ou seulement 9 si *ERPR6a*, *ERPR6b*, *ERPR6c* sont considérés comme faisant partie d’un seul et même locus *ERPR6*) et trois QTLs pour la résistance à la souche R3598 (dont *ERPR9* détecté sur une seule saison et une seule variable et qui reste donc très hypothétique). En raison de la difficulté de transférer simultanément de nombreux QTLs dans un même fond génétique, les efforts d’amélioration variétale pourraient se concentrer sur l’introgression des QTLs *ERPR2b*, *ERPR3a* et *ERPR6b*. En effet, des relations d’épistasie positives entre ces trois QTLs semblent être impliquées dans la résistance à PSS4. Les individus possédant les allèles du parent résistant aux trois locus ont un niveau de résistance plus élevé que ce qui est prévu d’après l’effet additif individuel de chaque QTL. Par ailleurs, *ERPR3a* est aussi détecté pour la résistance à la souche R3598. *ERPR6b* pourrait également être le même QTL qu’*ERPR6c* détecté pour la résistance à la souche R3598. Ces trois QTLs ainsi que *EBWR2*, *EBWR9* et *EBWR14* détectés dans la population MM738 × AG91-25 représentent donc des facteurs de résistance intéressants pour la création de variétés multirésistantes à *R. pseudosolanacearum* (phylotype I et III). Cependant, comme *ERPR2b* co-localise avec *EBWR2*, il faudra préalablement cartographier plus finement ces QTLs afin de déterminer s’il pourrait s’agir d’un même QTL de résistance conservé entre les accessions AG91-25 et EG203.

L’introgression de la résistance dans les variétés réunionnaises bringelle rond (BR) et bringelle saucisse (BS) visait en priorité à contrôler les souches de phylotype I majoritairement présentes dans les bassins de production de l’île. Lorsque ce schéma de transfert a été engagé, seul le facteur majeur de résistance *ERs1* et un QTL mineur (respectivement renommé *EBWR9* et *EBWR2* dans le chapitre 2) avaient été mis en évidence (Lebeau et al. 2013). Ces facteurs de résistance ont été introduits dans les variétés réunionnaises grâce à l’utilisation de deux marqueurs moléculaires (SSR et CAPS), dont l’un est lié à *EBWR9* et l’autre à *EBWR2*. En parallèle, à chaque rétrocroisement, les plants ont été sélectionnés pour leur résistance vis-à-vis de la souche GMI1000. Après 5 cycles de rétrocroisement, nous avons obtenus des plants BC₅F₁ qui possèdent l’allèle du parent

résistant AG91-25 au locus *EBWR9* et/ou *EBWR2* et qui montrent de hauts niveaux de résistance dans les essais de phénotypage avec la souche GMI1000. Nous avons aussi utilisé les accessions MM853 (E1), MM643 (E2) et MM152 (E3) comme parents résistants dans nos croisements avec BR et BS. Ces accessions ont été choisies car, à l'origine, elles avaient montré le meilleur niveau de résistance vis-à-vis des souches du phylotype I de la core-TEP (Lebeau et al. 2010). Le type de résistance impliquée dans ces accessions n'étant pas connu et aucun QTL de résistance n'étant disponible, nous avons, au départ, sélectionné les plants des backcross uniquement sur leur phénotype. Le phénotypage des BC₅F₁ a mis en évidence la présence de plants résistants dans chacun des backcross malgré un fort niveau d'infestation (flétrissement sur E8 = 100 %). Les individus résistants produits à l'issue de ces backcross successifs constitueront un matériel génétique de base pour ensuite poursuivre la sélection sur d'autres traits d'intérêt agronomique.

5.1 Vers une compréhension des bases génétiques et moléculaires de la résistance chez AG91-25

5.1.1 La cartographie fine d'*EBWR9* : état des lieux et perspectives

Parmi les 8 HIF présentes dans la population MM738 × AG91-25, 4 d'entre elles sont particulièrement intéressantes, car potentiellement hétérozygotes dans l'intervalle physique re-délimité dans le chapitre 2 (1,8 Mb). Au stade F₆, ces familles sont déjà bien fixées sur la quasi-totalité du génome (hétérozygotie résiduelle théorique de 3 %). Nous faisons donc l'hypothèse que les variations de phénotype à l'intérieur de ces familles devraient donc être principalement corrélées aux variations de génotypes au locus *EBWR9*. Les haplotypes des quatre familles en question (RILs G148, G239, G271 et G360) hétérozygotes dans l'intervalle physique d'*EBWR9* ont été examinés, afin de vérifier le niveau d'homozygotie des individus sur les autres locus et notamment de s'assurer que les deux autres QTLs de résistance au BW (*EBWR2* et *EBWR14*) ne soient pas positionnés sur des zones hétérozygotes. Les haplotypes des quatre RILs sur l'ensemble des groupes de liaisons (LG1 à LG14) sont présentés dans la Figure 25. Dans chacune de ces HIF, *EBWR2* et *EBWR14* sont positionnés sur des locus fixés. Même si ces QTLs ne sont pas détectés avec les souches contrôlées par *EBWR9*, il est toutefois préférable que ces locus soient fixés dans les familles HIF afin que les NILs créées ségrégent uniquement au QTL *EBWR9*. On observe de nombreux locus hétérozygotes chez la RIL G239. Les autres familles de RILs présentent des niveaux d'hétérozygotie plus faible, en

particulier la RIL G271. La cartographie fine d'un QTL nécessite la création de NILs (Near Isogenic Lines) à partir de chacune des HIFs et implique un effectif élevé en individus issus de ces dernières. Par exemple, environ un millier d'individus issus d'une seule HIF ont été utilisés pour cartographier finement le QTL de résistance au BW *MtQRRS1* chez *Medicago Truncatula* dans l'étude menée par Ben et al. (2013). Afin de limiter le nombre de plants à génotyper et phénotyper, seule la RIL G271, qui présente le moins de zones hétérozygotes hors *EBWR9*, pourrait être utilisée dans un premier temps.

Même en utilisant une seule famille HIF, la cartographie fine, puis éventuellement le clonage d'*EBWR9*, représentent un travail de plusieurs années et nécessitent de manipuler des populations de plusieurs milliers d'individus. La recherche du gène *EBWR9* pourrait être facilitée par les récents résultats obtenus sur l'identification d'un effecteur de type III (ET3) potentiellement impliqué dans une interaction de type gène pour gène chez l'aubergine AG91-25. En effet, une première étude menée par Pensec et al. (2015) a mis en évidence une possible implication des effecteurs du RSSC RipAX2 (anciennement nommé Rip36) et RipP2 (PopP2) comme facteurs d'avirulence chez l'aubergine résistante AG91-25. Par la suite, des travaux menés en collaboration entre l'UMR PVBMT (La Réunion, St Pierre) et le LIPM (INRA, Toulouse) ont confirmé de façon spectaculaire l'implication de RipAX2 dans l'avirulence sur AG91-25 (Guinard 2015). Les plants d'AG91-25 inoculés avec des mutants Δ ripAX2 de la souche GMI1000 présentaient des taux de flétrissement très élevés alors que les plants d'AG91-25 inoculés dans les mêmes conditions avec la souche sauvage GMI1000 ne présentaient aucun symptôme de flétrissement. La complémentation des mutants Δ ripAX2 a permis de restaurer la virulence sur AG91-25. A ce jour, les gènes de plantes clonés et impliqués dans des systèmes R/Avr sont principalement de type NBS-LRR (Sekhwal et al. 2015). Etant donné le faible nombre de gènes NBS-LRR détectés au locus *EBWR9* dans les transcriptomes des lignées parentales de notre population, il apparaît intéressant d'essayer de valider leur interaction avec RipAX2. Pour cela, une approche double hybride dans la levure (Chien et al. 1991) pourrait être envisagée avec l'effecteur RipAX2 comme protéine appât et les deux protéines NBS-LRR dont les séquences ont été détectées dans les transcriptomes comme protéines cibles.

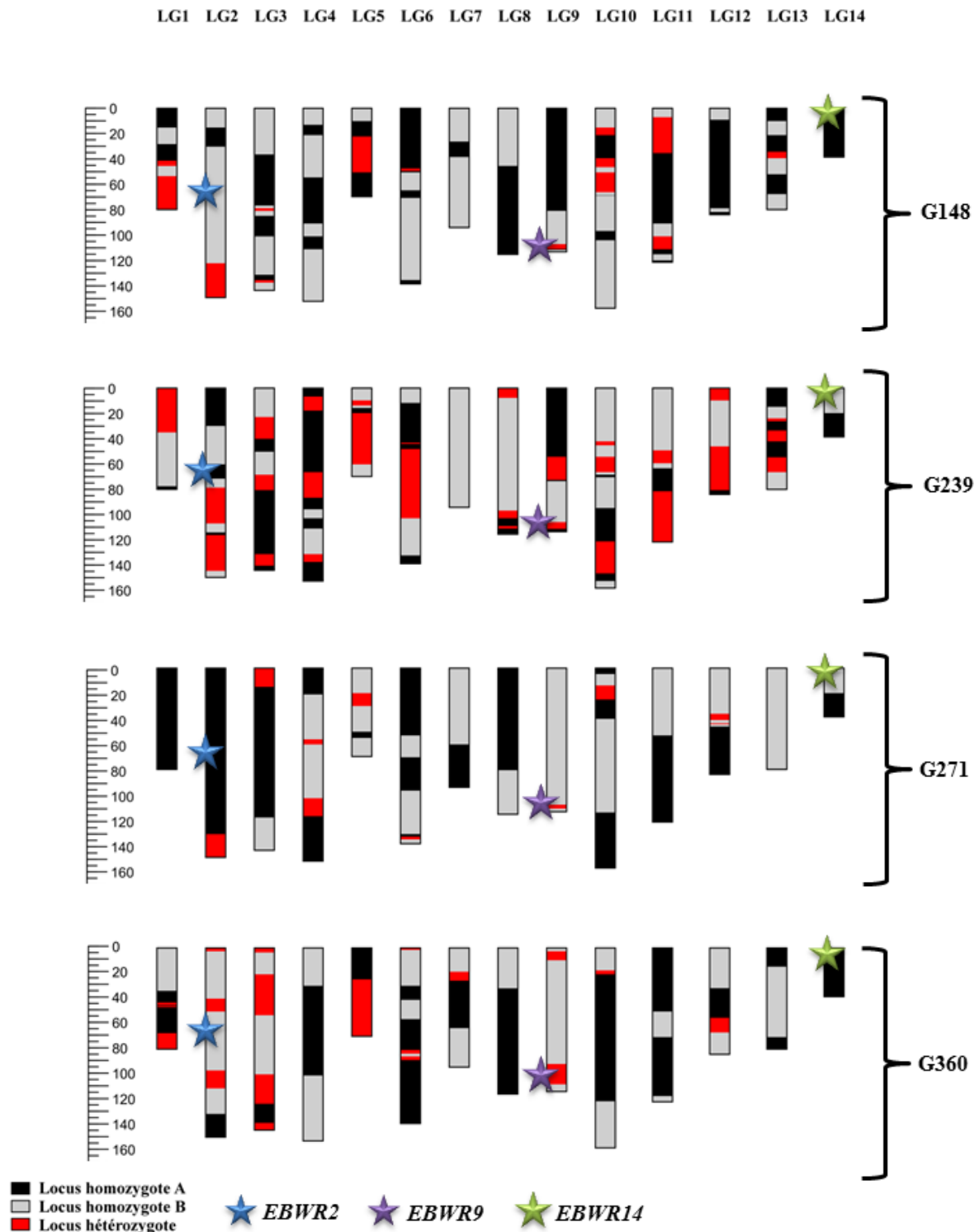


Figure 25 : Haplotypes des Familles HIF au locus *EBWR9* (RILs G148, G239, G271 et G360) sur l'ensemble des groupes de liaisons (LG). Les rectangles allongés représentent chaque LG des HIF. Les parties colorées en noir sont homozygotes pour l'allèle A du parent sensible, les parties colorées en gris sont homozygotes pour l'allèle B du parent résistant et les parties colorées en rouge sont potentiellement hétérozygotes (un mélange d'individus hétérozygotes et fixés au locus est attendu dans les familles de RILs).

5.1.2 *EBWR9* contrôle-t-il spécifiquement des souches de phylotype I ?

Les travaux de thèse d'A. Lebeau (2007-2010) ajoutés à ceux décrits dans le chapitre 2 ont abouti finalement au phénotypage de la population MM738 × AG91-25 vis-à-vis d'une gamme complète de souches « représentatives » de la diversité génétique du RSSC. Les souches du phylotype I sont les plus représentées dans notre étude avec 5 souches (GMI1000, PSS366, CMR134, PSS4 et TO10), alors qu'une seule souche des phylotypes IIA (CFBP2957), IIB (CMR34) et III (CFBP3059) ont été utilisées. *EBWR9* ayant été uniquement détecté avec des souches du phylotype I, nous avons supposé une possible spécificité de ce locus vis-à-vis des souches du phylotype I. Au vue de la faible proportion de souches des autres phylotypes utilisées dans notre étude, cette spécificité d'*EBWR9* reste incertaine et doit être confirmée. En considérant l'hypothèse d'une interaction R/Avr entre *EBWR9* et *RipAX2*, il serait évidemment essentiel de voir si *EBWR9* ne peut pas être détecté avec des souches de phylotypes II et III possédant l'effecteur *RipAX2*. D'après une étude conduite par Guinard et al. (2016b), *RipAX2* peut être présent dans les phylotypes I, IIA, IIB et III. L'allèle *RipAX2*_{GMI1000} (allèle impliqué dans l'avirulence sur le parent résistant AG91-25) a bien été observé dans des souches des phylotypes I, IIA et IIB, mais pas dans les souches du phylotype III. Etant donné le faible nombre de souches de phylotype III testées dans cette étude (6 souches), il n'est pas exclu que l'allèle *RipAX2*_{GMI1000} soit aussi présent dans des souches de phylotype III. Le séquençage de *RipAX2* dans de nouvelles souches du phylotype III pourrait aider à répondre à cette question. En considérant l'interaction *EBWR9/RipAX2* comme potentiellement responsable de la résistance chez AG91-25, la présence de *RipAX2* dans tous les phylotypes laisse supposer un spectre de résistance d'*EBWR9* plus large que celui décrit dans le chapitre 2. Afin de vérifier cela, il serait intéressant de sélectionner parmi les différents phylotypes du RSSC, quelques souches possédant l'allèle *RipAX2*_{GMI1000} et de phénotyper les extrêmes phénotypiques de la population RILs MM738 x AG91-25 avec ces souches. Le schéma proposé est décrit dans la Figure 26. Les souches du phylotype III présentent un intérêt particulier car (i) elles font partie de la même espèce génomique (*R. pseudosolanacearum*) que le phylotype I, (ii) elles ont une gamme d'hôtes très proche du phylotype I, ce qui suggère des mécanismes d'infestation similaires, (iii) elles sont tout comme le phylotype I originaires de l'ancien monde où elles ont potentiellement coévolué avec l'aubergine également originaire de l'ancien monde.

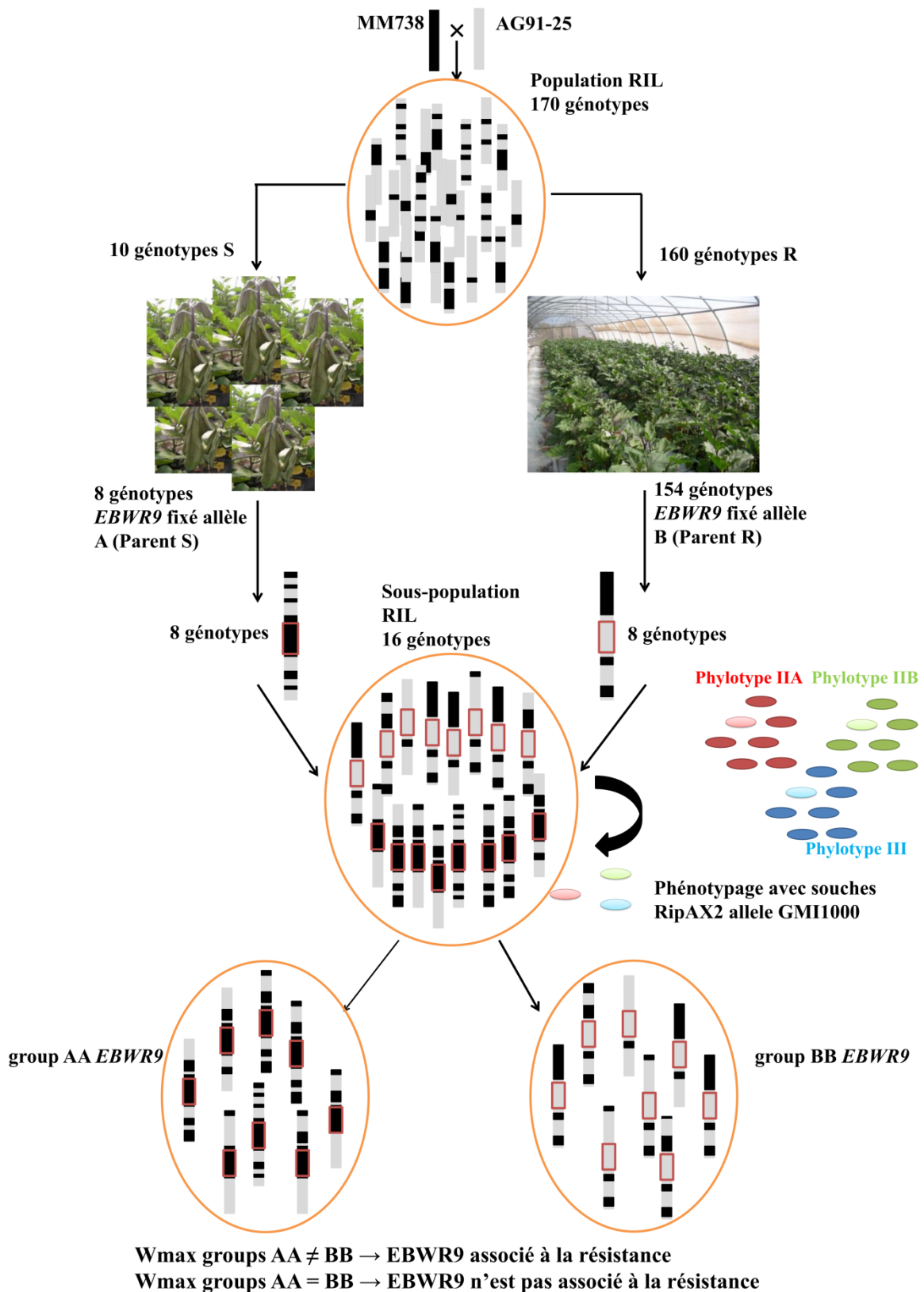


Figure 26: Proposition de protocole permettant de déterminer le spectre de résistance d'*EBWR9* vis-à-vis des souches possédant l'allèle *RipAX2*_{GMI1000}.

5.2 L'identification de gènes et QTLs complémentaires à *EBWR9* : une nécessité pour contrôler les souches virulentes du RSSC et pour la création de variétés à large spectre de résistance

Nous avons démontré l'existence dans les aubergines AG91-25 et EG203 de divers facteurs de résistance potentiellement exploitables dans des programmes d'amélioration variétale. Cependant les stratégies de déploiement de cultivars résistants doivent prendre en compte la situation épidémiologique des zones de production où les cultivars vont être commercialisés. Cela nécessite de disposer de gènes et QTLs de résistance permettant de contrôler une majorité de la diversité génétique du pathogène. Dans cette partie, nous ferons un point sur la situation épidémiologique des zones de cultures de l'aubergine et nous discuterons de l'utilité des facteurs de résistance dont nous disposons et de la nécessité de rechercher des facteurs de résistance supplémentaires dans d'autres accessions d'aubergines cultivées ou sauvages.

5.2.1 Les souches des phylotypes II et III : un risque pour la culture de l'aubergine ?

L'aubergine est majoritairement cultivée en Asie où les souches du phylotype I sont prévalentes (Ivey et al. 2007; Xu et al. 2009; Xue et al. 2011; Sagar et al. 2014; Sakthivel et al. 2016). Ce phylotype est aussi largement répandu en dehors de son aire géographique d'origine. Alors que le phylotype III est seulement présent en Afrique et dans la zone du Sud-Ouest de l'Océan Indien, des études récentes ont démontré la forte implantation du phylotype I au Cameroun, au Nigeria, en Côte d'Ivoire et à Madagascar (Mahbou Somo Toukam et al. 2009; N'Guessan et al. 2012; Popoola et al. 2015; Ravelomanantsoa 2016). Les travaux de Yahiaoui et al. (2016) ont récemment mis en évidence la prévalence du phylotype I également dans la zone Océan Indien (Ile de la Réunion, Ile Maurice, Les Comores, Les Seychelles). Ainsi, l'amélioration variétale vis-à-vis des souches du phylotype I apparaît prioritaire notamment vis-à-vis des souches virulentes du type PSS4. L'incidence du phylotype III dans de nombreux pays d'Afrique reste néanmoins peu étudiée. Par exemple, la présence du RSSC a été rapportée en Afrique du Sud, au Congo, en Angola, au Mali, en Tanzanie, au Zimbabwe, au Benin, en Ethiopie et au Kenya (<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution>), mais la distribution et la phylogénie de ces souches n'ont pas été décrites. Le phylotype II, originaire des Amériques, présente lui aussi une aire de répartition assez large. Il est majoritairement

retrouvé à haute altitude dans les zones de culture de la pomme de terre. Ce phylotype est aussi majoritairement présent au Brésil, notamment dans le sud sur les cultures de pomme de terre (phylotype IIB) et dans les régions plus chaudes du Nord, Nord-Est et Nord-Ouest, où on retrouve à la fois du phylotype IIA et I (Morais et al. 2015). Au Guatemala, des prélèvements effectués sur pomme de terre, bananier, tomate et aubergine ont montré une prédominance des souches du phylotype I dans les cultures de tomate et d'aubergine du plateau central, alors que le phylotype IIB prédomine dans les cultures de géranium et de pomme de terre à haute altitude, le phylotype IIA prédominant lui dans les plantations de bananiers (Sanchez Perez et al. 2008). Aux Antilles et en Guyane française, les phylotypes I, IIA et IIB sont présents et causent des dommages importants sur les cultures depuis de nombreuses années, mais récemment, une lignée particulière de ce phylotype (souche émergente IIB-4NPB ; NPB = nonpathogenic on banana) plus virulente et présentant un spectre d'hôte plus large a été détectée (Wicker et al. 2007; Wicker et al. 2009; Ramsubhag et al. 2012; Deberdt et al. 2014). La Core-TEP a été testée vis-à-vis d'une souche de ce même sequevar, confirmant sa très forte virulence sur Solanacées (Lebeau et al. 2010).

Même si leur répartition reste plus restreinte que celle du phylotype I, les phylotypes IIA, IIB et III sont donc bien présents dans de nombreuses régions productrices de cultures maraîchères, nécessitant ainsi la poursuite des recherches de facteurs de résistance permettant de les contrôler efficacement. Par ailleurs, l'introduction de variétés au spectre de résistance limité au phylotype I pourrait avoir un effet sur la dynamique des populations en place. En effet, des travaux conduits par Huerta et al. (2015) ont mis en évidence une compétition entre les souches du RSSC via la production de bactériocines. Parmi les trois souches étudiées (GMI1000 phylotype I, K60 phylotype IIA et UW551 phylotype IIB), seules GMI1000 et K60 produisent des bactériocines et ont une fitness plus élevée que UW551 à température chaude, à la fois en culture *in vitro* et *in vivo*. Ceci pourrait expliquer l'absence du phylotype IIB à basse altitude, alors que ces souches sont capables d'infecter la tomate aussi bien à température fraîche (de 19 à 24 °C) qu'à température chaude (28 °C). En effet, les deux autres souches, qui produisent des bactériocines, sont moins bien adaptées aux conditions fraîches, laissant ainsi une niche écologique libre au phylotype IIB. En introduisant des variétés d'aubergine dont la résistance est spécifique au phylotype I, les populations du phylotype I pourraient diminuer, laissant ainsi libre une nouvelle niche écologique aux souches du phylotype IIB présentes dans la même zone géographique. Afin d'éviter un déplacement des populations et un contournement rapide de la résistance, il est préférable d'envisager la

création de variétés possédants à la fois des gènes R spécifiques (*EBWR9* et *RE-bw*) et des QTLs de résistance à spectre plus large (*EBWR2*, *EBWR14*, *ERPR3a* et *ERPR6* par exemple).

5.2.2 Efficacité et limites des QTLs *EBWR2* et *EBWR14* : Nécessité de poursuivre la recherche de QTLs majeurs dans la diversité génétique de l'aubergine

Les travaux du chapitre 2 ont mis en évidence la présence des QTLs supposés à large spectre *EBWR2* et *EBWR14*. Les lignées RILs qui possèdent les allèles résistants aux deux locus présentent un niveau moyen de résistance élevé vis-à-vis des souches CFBP2957 (Waudpc = 10,4 %) et CFBP3059 (Waudpc=13,3 %), suggérant un contrôle plutôt efficace par ces QTL. De plus, les conditions de tests en serre étant propice au développement de la maladie (scarification des racines, quantité d'inoculum très élevée, climat chaud et humide), il est permis d'espérer des niveaux de résistance au moins aussi élevés en conditions d'infestation naturelle dans les cultures. Néanmoins, afin d'introgresser efficacement ces QTLs dans des variétés commerciales, la position de ces QTLs devra être précisée auparavant. En effet, contrairement au locus *EBWR9* qui comprend une densité de marqueurs très forte (31 marqueurs par cM), les locus *EBWR2* et *EBWR14* présentent une densité beaucoup plus faible (0,4 marqueur et 0,9 marqueur par cM respectivement pour *EBWR2* et *EBWR14*). Les locus *EBWR2* et *EBWR14* contiennent respectivement 732 et 184 transcrits dans lesquels des SNPs pourront être recherchés et utilisés pour densifier ces zones de la carte génétique et produire des marqueurs utilisables en SAM. Ces QTLs, en raison de leur effet important à la fois sur la réduction des symptômes et de la colonisation bactérienne vis-à-vis des souches CFBP2957 et CFBP3059, sont potentiellement très intéressants pour l'amélioration variétale. AG91-25 a aussi montré un haut niveau de résistance vis-à-vis d'autres souches des phylotypes III et IIA non utilisées dans nos essais, CMR32 (III-29) et CMR39 (IIA-41). Par conséquent, il serait intéressant de tester notre population avec ces deux souches afin de vérifier si on détecte les mêmes QTLs *EBWR2* et *EBWR14*, ou si d'autres facteurs de résistance spécifiques sont impliqués. En parallèle, la densification en marqueurs des deux locus pourrait permettre de préciser la position des QTLs et éventuellement déboucher sur un clonage des gènes sous-jacents. Aucun QTL de résistance au BW n'ayant été cloné jusqu'à présent, cela apporterait des réponses importantes pour la compréhension des interactions plantes/RSSC. Par ailleurs, il est intéressant de noter la présence du gène *Pti1* (*Pto*-interacting 1) (Zhou et al. 1995; Pedley and Martin 2003) dans la région physique synténique du locus *EBWR14* (chr 12 de la tomate entre 64,4 et 66,9 Mb). Ce gène, impliqué dans la résistance à

Pseudomonas syringae chez la tomate, est localisé sur le chr 12 à 66,3 Mb et partage 96 % de similarité avec le transcrit Contig1641 présent dans les transcriptomes des lignées parentales de notre population.

Les souches du phylotype I qui contournent *EBWR9* sont déjà présentes dans certains bassins de production de l’aubergine en Asie et en Afrique (N’Guessan et al. 2012; Lebeau et al. 2013). Chez AG91-25, seul le QTL généraliste *EBWR2* montre une action significative mais insuffisante sur les 2 souches virulentes PSS4 et TO10 utilisées dans nos essais. Les lignées qui possèdent les allèles du parent résistant à ce locus présentent en effet une progression de la maladie ralentie, sachant que le niveau de flétrissement atteint au final est néanmoins celui d’un génotype sensible. Le contrôle de ces souches virulentes impose de rechercher d’autres facteurs de résistance plus efficaces dans d’autres accessions ayant montré un haut niveau de résistance. L’étude de la population d’haploïdes doublés issue du croisement EG203 (Surya/E4) × MM738 (E8) a montré la présence d’un système polygénique complexe contrôlant partiellement la souche virulente PSS4. Certains QTLs (en particulier *ERPR2b*, *ERPR3a* et *ERPR6*) sont également à envisager pour l’amélioration variétale, mais pour cela leurs positions devront être confirmées et précisées. Par ailleurs, en raison de possibles interactions épistatiques, leur effet dans un fond génétique différent est difficile à prédire. Pour le sélectionneur, la création de variétés possédant un niveau de résistance suffisant vis-à-vis de ces souches implique plutôt l’identification de facteurs de résistance majeurs complémentaires facilement transférables. Enfin, aucun QTL, même mineur, n’a été détecté chez AG91-25 face à la souche CMR34 (IIB-1). De plus, AG91-25 s’était montré aussi très sensible aux souches CMR15 (III-29), et CFBP6783 (phylotype IIB-4NPB) (Lebeau et al. 2010). En raison du danger que représentent ces souches (notamment les souches du groupe IIB-4NPB aux Antilles et en Amérique du Sud), il est donc nécessaire d’explorer de nouvelles sources de résistance.

5.2.3 La diversité génétique de l’aubergine et de ses apparentés sauvages : un réservoir de gènes et QTLs de résistance à explorer et exploiter

La diversité génétique naturelle de l’aubergine, représentée par la core-collection d’accessions que nous avons testées, est un réservoir potentiel de facteurs de résistance permettant de contrôler une grande part de la diversité du pathogène (Lebeau et al, 2010). Les trois sources de résistance qui ont fait l’objet des études menées au cours de cette thèse ont

révélé un certain nombre de facteurs majeurs mais ne permettent pas de contrôler toute la diversité du pathogène. Ainsi, trois autres accessions prometteuses, MM853 (E1), MM643 (E2) et S56B (E9), ont aussi été croisées avec la même accession sensible MM738 et des populations d’haploïdes doublés sont en cours de production (M-C Daunay, INRA Avignon, communication personnelle). Chacune de ces accessions présente un niveau de résistance très fort (réaction incompatible) vis-à-vis d’au moins une souche de la core-Rs2 (Lebeau et al. 2010). Par exemple, MM643 est la seule accession potentiellement résistante à des souches émergentes IIB-4NPB, extrêmement virulentes sur les Solanacées. Dans les essais menés sur l’ensemble de la core-TEP (tomate, aubergine et piment), MM643 était la seule accession à présenter une réaction incompatible avec la souche CFBP6783 (IIB-4NPB). Les accessions MM853 et S56B sont quant à elles des sources potentielles de résistance vis-à-vis des souches du type de CMR34 (IIB) pour lesquelles à ce jour aucun QTL de résistance n’a été détecté dans notre population RILs MM738 x AG91-25.

Pour l’instant, nous avons ciblé essentiellement des accessions de l’espèce *S. melongena*, mais les résistances potentielles présentes chez les espèces apparentées cultivées comme *S. aethiopicum*, *S. gboma* et également chez les espèces sauvages comme *S. incanum* n’ont pas été systématiquement exploitées. L’ancêtre de l’aubergine, *S. incanum* présenterait un intérêt particulier pour l’amélioration de la résistance au BW (Syfert et al. 2016). En effet, cette espèce pousse naturellement de Madagascar jusqu’au sud de l’Asie dans des zones infestées par le RSSC. Des études ont montré que, malgré l’absence de barrières reproductives avec *S. melongena*, *S. incanum* est génétiquement bien distincte de cette dernière. En outre, les populations de *S. incanum* géographiquement éloignées présentent une structuration génétique forte (Syfert et al. 2016). Dans des travaux futurs, il serait donc intéressant de collecter des plants de *S. incanum*, de créer une collection rassemblant une majorité de la diversité génétique et de caractériser le niveau de résistance au BW de cette espèce. *Solanum torvum* (‘bringellier marron’ à la Réunion), une espèce connue pour sa résistance à plusieurs maladies (Collonnier et al. 2001), présente aussi un intérêt particulier pour l’amélioration de la résistance au BW. Cette espèce est d’ailleurs utilisée dans certaines zones de culture, et notamment à La Réunion comme porte-greffe résistant au BW. Les croisements de *S. melongena* avec les membres de cette espèce s’avèrent difficiles mais restent possibles grâce aux techniques d’hybridation somatique et de sauvetage embryonnaire (Bletsos et al. 1998; Plazas et al. 2016). L’espèce *S. torvum* représente donc aussi un réservoir potentiel de gènes

et facteurs de résistance au BW avec l'inconvénient d'être moins facilement hybridable avec *S. melongena* que ne l'est *S. incanum*.

5.3 Sélection de « bringelles péi » résistantes au BW

5.3.1 La SAM, un outil efficace pour l'introgression des facteurs de résistance au BW : limites et perspectives

Une partie de cette thèse a été consacrée à l'amélioration du niveau de résistance au BW des « bringelles péi » (chapitre 4). Après 6 cycles de croisements avec les parents récurrents BR et BS, nous avons obtenu huit familles de backcross ($BR \times E1$, $BR \times E2$, $BR \times E3$, $BR \times E6$, $BS \times E1$, $BS \times E2$, $BS \times E3$ et $BS \times E6$) qui peuvent constituer un matériel de base pour mettre au point des nouvelles variétés. Durant les 6 cycles de rétrocroisement, les plants ont été sélectionnés uniquement sur le critère de résistance au BW. Dans de nombreux schémas de sélection variétale, les plants sont aussi sélectionnés par rapport à leur fond génétique, aussi appelé en anglais « background selection ». En raison de l'absence de marqueurs disponibles pour sélectionner les fonds génétiques de BR et BS, nous n'avons pas pu appliquer ce type de sélection. Cependant, au stade de croisement des backcross obtenus (BC_6F_1), les plants portent en théorie près de 98 % du génome du parent récurrent (BR ou BS dans notre cas). En théorie, les backcross devraient donc présenter des caractères agronomiques proches des variétés réunionnaises BR et BS. Néanmoins le potentiel agronomique de nos backcross devra être vérifié au champ. A partir du 4^{ème} backcross, un schéma très simple de SAM a été appliqué aux descendances issues des croisements avec E6 afin d'aider à sélectionner les QTLs *EBWR2* et *EBWR9*. Ce schéma était basé sur seulement deux marqueurs disponibles à ce stade, l'un lié à *EBWR2* et l'autre lié à *EBWR9*. Dans les cycles d'autofécondations qui vont commencer, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux marqueurs liés aux QTL chez AG91-25, cela pour sélectionner précisément les locus de résistance. On pourra pour cela utiliser les marqueurs SNPs cartographiés dans la population MM738 $\times$ AG91-25. Les marqueurs qui encadrent *EBWR9* (n88110 à 69,4 Mb et n52528 à 71,1Mb) pourraient ainsi être utilisés pour faciliter la sélection des individus porteurs de l'allèle résistant dans les prochains cycles. De la même manière, le développement de marqueurs encadrant le locus *EBWR2* pourrait être envisagé. Cependant la position de ce QTL est, à ce jour, assez imprécise et varie, comme nous l'avons vu, en fonction de la souche

bactérienne utilisée. Avant d'envisager la sélection de ce QTL dans les prochains cycles de sélection, il faudrait donc préalablement préciser sa position. Par ailleurs, l'intérêt de ce QTL pour le contrôle des souches réunionnaises n'a pas été démontré. L'introgression d'*EBWR2* n'est donc pas une priorité dans le schéma de sélection actuel.

5.3.2 Stratégies de déploiement des cultivars résistants dans la zone Océan Indien

A chaque cycle de croisement les plants ont été sélectionnés pour leur résistance à la souche GMI1000 qui est contrôlée par *EBWR9*. Au début de ce projet, les connaissances sur la diversité des souches du RSSC présentes à La Réunion étaient restreintes. Des études menées au début des années 90 avaient déjà mis en évidence la présence des phylotypes I, II et III sur le territoire réunionnais avec une prédominance du phylotype I dans les zones de production des tomates et aubergines (Girard et al. 1993). À la vue de ces données, nous avons donc décidé d'améliorer la résistance des « bringelles péi » vis-à-vis du phylotype I en considérant la souche GMI1000 comme représentative des souches réunionnaises. Très récemment, des nouvelles études sur la diversité des souches présentes sur les îles de l'Océan Indien ont mis en évidence une très forte prévalence du phylotype I (Yahiaoui et al. 2016). Toutes les souches du phylotype I présentes à la Réunion appartiennent à un groupe particulier (sequevar 31) et ce même groupe est aussi prédominant dans les autres îles de l'Océan Indien. Dans le processus de création de nouvelles variétés locales résistantes, il sera donc essentiel de vérifier leur niveau de résistance vis-à-vis d'une collection de souches réunionnaises du groupe I-31. Par ailleurs, le déploiement des variétés issues des croisements avec AG91-25 (E6) pourra être raisonné en fonction de la présence de l'effecteur *RipAX2* dans les souches réunionnaises. En effet, *RipAX2* est un effecteur ET3 associé à l'avirulence sur E6 (Guinard 2015). Les souches qui possèdent le même allèle *RipAX2* que la souche GMI1000 sont très majoritairement avirulentes sur E6, alors que les souches qui ne possèdent pas l'effecteur, ou qui ont une protéine tronquée, sont elles virulentes sur E6. Si une interaction entre *RipAX2* et *EBWR9* est confirmée, le séquençage de ce gène pourrait permettre de prévoir l'efficacité de nos variétés résistantes en fonction des populations bactériennes présentes dans une zone donnée. Le séquençage de 4 souches de ce groupe (RUN3012, RUN3013 et RUN3014 originaires de la Réunion et RUN1744 originaire de Côte d'Ivoire) a mis en évidence la présence d'un seul et même allèle du gène *RipAX2*. Malgré la présence du même allèle, ces souches présentent des profils de virulence variés : RUN3012, RUN3013 et RUN3014 sont avirulentes et RUN1744 est très virulente sur E6 (Guinard 2015; Guinard et al. 2016a).

L'environnement génomique de la souche RUN1744 autour de *RipAX2* est en cours d'analyse et pourrait apporter éventuellement une explication à ces différences de virulence observées. Finalement, l'acquisition de connaissances à la fois sur la distribution et la diversité des souches du RSSC dans l'Océan Indien (thèse N. Yahaoui) et sur les mécanismes de virulence de ces souches (Thèse J. Guinard et travaux en cours au LIPM) sont indispensables et pourraient à terme aider à choisir les variétés d'aubergines les mieux adaptées aux différentes zones de production de l'Océan Indien. Les 8 backcross BC₆F₁ issus des 4 sources de résistance ciblées au départ et créés durant cette thèse représentent une première base génétique pour la création de variétés résistantes au BW à la Réunion mais aussi dans les autres îles de l'Océan Indien.

Références bibliographiques

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, et al (2012) Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis* 96:1204–1209.
- Álvarez B, Vasse J, Le-Courtois V, et al (2008) Comparative behavior of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in diverse plant species. *Phytopathology* 98:59–68.
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, et al (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19:535–544.
- Andolfo G, Jupe F, Witek K, et al (2014) Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. *BMC Plant Biol* 14:120. doi: 10.1186/1471-2229-14-120
- Andrews S (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Ano G, Anais G, Chidiac A (2002) Creation de variétés résistantes aux maladies en Guadeloupe. *Elements indispensables de diversification agricole. PHYTOMA* 36–37.
- Ano G, Hebert Y, Prior P, Messiaen C (1991) A new source of resistance to bacterial wilt of eggplants obtained from a cross: *Solanum aethiopicum* L $\times$ *Solanum melongena* L. *Agronomie* 11:555–560. doi: 10.1051/agro:19910703
- Arumuganathan K, Earle ED (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Report* 9:208–218. doi: 10.1007/BF02672069
- Aubriot X, Singh P, Knapp S (2016) Tropical Asian species show that the Old World clade of “spiny solanums” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum* pro parte : Solanaceae) is not monophyletic. 199–223.
- Bae C, Han SW, Song YR, et al (2015) Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor Appl Genet* 128:1219–1229. doi: 10.1007/s00122-015-2521-1
- Baird NA, Etter PD, Atwood TS, et al (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS One* 3:e3376. doi: 10.1371/journal.pone.0003376
- Barbary A, Djian-Caporalino C, Marteu N, et al (2016) Plant genetic background increasing the efficiency and durability of major resistance genes to root-knot nematodes can be resolved into a few resistance QTLs. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00632
- Barbary A, Palloix A, Fazari A, et al (2014) The plant genetic background affects the efficiency of the pepper major nematode resistance genes *Me1* and *Me3*. *Theor Appl Genet* 127:499–507.
- Barnabás B, Obert B, Kovács G (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured in anthero. *Plant Cell Rep* 18:858–862.
- Bastiaanse H, Bassett HCM, Kirk C, et al (2016) Scab resistance in “Geneva” apple is conditioned by a resistance gene cluster with complex genetic control. doi: 10.1111/mpp.12269
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.
- Behera TK, Singh N (2002) Inter-specific crosses between eggplant (*Solanum melongena* L.) with related *Solanum* species. *Sci Hortic (Amsterdam)* 95:165–172. doi: 10.1016/S0304-4238(02)00019-5
- Ben C, Debelle F, Berges H, et al (2013) *MtQRRS1*, an R-locus required for *Medicago truncatula*

- quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum*. *New Phytol* 199:758–772. doi: 10.1111/nph.12299
- Bernatzky R, Tanksley SD (1986) Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887–898.
- Bernot A, Périlleux E (2000) L'analyse des génomes: cartographie, séquençage, identification des gènes, Dunot. Nathan, Paris
- Bernoux M, Timmers T, Jauneau A, et al (2008) RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *The Plant cell* 20:2252–2264. doi: 10.1105/tpc.108.058685
- Berthouly-Salazar C, Mariac C, Couderc M, et al (2016) Genotyping-by-sequencing SNP identification for crops without a reference genome: using transcriptome based mapping as an alternative strategy. *Front Plant Sci* 7:777. doi: 10.3389/FPLS.2016.00777
- Bletsos FA, Roupakias DG, Tsaktsira ML, et al (1998) Interspecific hybrids between three eggplant (*Solanum melongena* L.) cultivars and two wild species (*Solanum torvum* Sw. and *Solanum sisymbriifolium* Lam.). *Plant Breed* 117:159–164.
- Bohs L, Weese TL, Bohs L (2016) Eggplant origins : Out of Africa , into the Orient Eggplant origins : Out of Africa , into the Orient. doi: 10.2307/27757050
- Boller T, He SY (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* (80-) 324:742–744.
- Boshou L (2005) A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum* species complex. Saint Paul, Minnesota, pp 225–238
- Boucher CA, Van Gijsegem F, Barberis P, Arlat AM, Zischek C (1987) *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology* 169:5626–5632.
- Branham SE, Levi A, Farnham MW, Patrick Wechter W (2017) A GBS-SNP-based linkage map and quantitative trait loci (QTL) associated with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 identified in *Citrullus lanatus* var. *citroides*. *Theor Appl Genet* 130:319–330. doi: 10.1007/s00122-016-2813-0
- Breiman L (2001) Random Forests. *Mach Learning* 45:5–32. doi: 10.1023/A:1010933404324
- Broman K, Speed T (1999) A review of methods for identifying QTLs in experimental crosses. *Lect Notes-Monograph Ser* 33:114–142. doi: 10.1214/lnms/1215455550
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890. doi: 10.1093/bioinformatics/btg112
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177–186.
- Brouwer DJ, Clair DAS (2004) Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theor Appl Genet* 108:628–638.
- Brun H, Chèvre AM, Fitt BD, et al (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol* 185:285–299. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x
- Büttner D, Bonas U (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr*

- Opin Plant Biol 6:312–319.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al (2009) BLAST+: architecture and applications. BMC Bioinformatics 10:1. doi: 10.1186/1471-2105-10-421
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. J Agric Food Chem 44:3426–3431. doi: 10.1021/jf9602535
- Cao Y, Tian B, Liu Y, et al (2013) Genome sequencing of *Ralstonia solanacearum* FQY_4, isolated from a bacterial wilt nursery used for breeding crop resistance. Genome Announc 1:e00125-13.
- Carmeille A, Caranta C, Dintinger J, et al (2006) Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. Theor Appl Genet 113:110–121. doi: 10.1007/s00122-006-0277-3
- Catchen J, Hohenlohe PA, Bassham S, et al (2013) Stacks: An analysis tool set for population genomics. Mol Ecol 22:3124–3140. doi: 10.1111/mec.12354
- Catchen JM, Amores a., Hohenlohe P, et al (2011) Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. Genes|Genomes|Genetics 1:171–182. doi: 10.1534/g3.111.000240
- Causse M, Chaïb J, Lecomte L, Buret M (2007) Both additivity and epistasis control the genetic variation for fruit quality traits in tomato. Theor Appl Genet 115:429–442.
- Cellier G, Prior P (2010) Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. Phytopathology 100:1250–1261. doi: 10.1094/PHYTO-02-10-0059
- Chakravarti A, Lasher LK, Reefer JE (1991) A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. Genetics 128:175–182.
- Chen Y, Yan F, Chai Y, et al (2013) Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ Microbiol 15:848–864.
- Chien C-T, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc Natl Acad Sci 88:9578–9582.
- Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138:963–971.
- Ciampi-Panno L, Fernandez C, Bustamante P, et al (1989) Biological control of bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. Am J Potato Res 66:315–332.
- Ciampi L, Sequeira L (1980) Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. Am J Potato Res 57:307–317.
- Clain C, Da Silva D, Fock I, et al (2004) RAPD genetic homogeneity and high levels of bacterial wilt tolerance in *Solanum torvum* Sw.(Solanaceae) accessions from Reunion Island. Plant Sci 166:1533–1540.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica 142:169–196. doi: 10.1007/s10681-005-1681-5
- Collard BCY, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philos Trans R Soc B Biol Sci 363:557–572.
- Collonnier C, Fock I, Kashyap V, et al (2001) Applications of biotechnology in eggplant. Plant Cell

- Tissue Organ Cult 65:91–107.
- Cook D, Barlow E, Sequeira L (1989) Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. Mol Plant-Microbe Interact 1:113–121.
- Coutinho T.A (2005) Introduction and prospectus on the survival of *R. solanacearum*. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex., APS press. American Phytopathological Society (APS Press), Saint Paul, Minnesota, pp 29–39
- Danesh D, Aarons S, McGill GE, Young ND (1993) Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. Mol plant-microbe Interact MPMI 7:464–471.
- Daunay M-C (2008) Eggplant. In: Prohens J, Nuez F (eds) Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. Springer, New York, USA, pp 163–220
- Daunay M, Janick J (2007) History and Iconography of Eggplant. Chron Horti 47:16–22.
- Daunay MC, Lester RN, Laterrot H (1991) The use of wild species for the genetic improvement of Brinjal eggplant (*Solanum melongena*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*). Solanaceae III Taxon Chem Evol 27:389–413.
- Deberdt P, Guyot J, Coranson-Beaudu R, et al (2014) Diversity of *Ralstonia solanacearum* in French Guiana expands knowledge of the “emerging ecotype.” Phytopathology 104:586–596. doi: 10.1094/PHYTO-09-13-0264-R
- Deberdt P, Quénéhervé P, Darrasse A, Prior P (1999) Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the *Mi* gene in resistance to nematodes and bacterial wilt. Plant Pathol 48:408–414.
- Denancé N, Ranocha P, Oria N, et al (2013) *Arabidopsis* *wat1* (walls are thin1) mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. Plant J 73:225–239. doi: 10.1111/tj.12027
- Denny TP (2006) Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Gnanamanickam (ed) Plant-associated Bacteria, Dordrecht: Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands, pp 573–644
- Deslandes L, Olivier J, Peeters N, et al (2003) Physical interaction between *RRS1-R*, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and *PopP2*, a type III effector targeted to the plant nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A 100:8024–8029. doi: 10.1073/pnas.1230660100
- Deslandes L, Olivier J, Theulières F, et al (2002) Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. Proc Natl Acad Sci 99:2404–2409. doi: 10.1073/pnas.032485099
- Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, et al (1998) Genetic characterization of *RRS1*, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. Mol plant-microbe Interact 11:659–667. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.7.659
- Djian-Caporalino C, Palloix A, Fazari A, et al (2014) Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. BMC Plant Biol 14:53. doi: 10.1186/1471-2229-14-53
- Doerge RW, Churchill GA (1996) Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. Genetics 142:285–294.
- Doganlar S, Frary A, Daunay M, et al (2002) A Comparative Genetic Linkage Map of Eggplant (

- Solanum melongena*) and Its Implications for Genome Evolution in the Solanaceae. 1711:1697–1711.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15.
- Duvick JP, Sequeira L (1984) Interaction of *Pseudomonas solanacearum* lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide with agglutinin from potato tubers. *Appl Environ Microbiol* 48:192–198.
- Eggen A (2003) Les approches génomiques pour l'identification de gènes d'intérêt économique: outils, applications et perspectives.
- El-Abyad MS, El-Sayed MA, El-Shanshoury AR, El-Batanouny NH (1996) Effect of culture conditions on the antimicrobial activities of UV-mutants of *Streptomyces corchorusii* and *S. spiroverticillatus* against bean and banana wilt pathogens. *Microbiol Res* 151:201–211.
- Elphinstone JG (2005) The current bacterial wilt situation: A global overview. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, St Paul, Minnesota, U.S.A., pp 9–28
- Elphinstone JG (1996) Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Potato Res* 39:403–410.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, et al (2011) A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One* 6:1. doi: 10.1371/journal.pone.0019379
- Erickson DL, Fenster CB, Stenøien HK, Price D (2004) Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Mol Ecol* 13:2505–2522.
- Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*.
- Fegan MA, Prior PB (2006) Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. 93–101.
- Fegan M, Prior P (2005) How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. APS Press, Minnesota, pp 449–461
- Fishman L, Kelly AJ, Morgan E, Willis JH (2001) A genetic map in the *Mimulus guttatus* species complex reveals transmission ratio distortion due to heterospecific interactions. *Genetics* 159:1701–1716.
- Forster BP, Thomas WTB (2005) Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* 25:57–88.
- Fujiwara A, Fujisawa M, Hamasaki R, et al (2011) Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 77:4155–4162.
- Fulton TM, Nelson JC, Tanksley SD (1997) Introgression and DNA marker analysis of *Lycopersicon peruvianum*, a wild relative of the cultivated tomato, into *Lycopersicon esculentum*, followed through three successive backcross generations. *Theor Appl Genet* 95:895–902. doi: 10.1007/s001220050640
- Galán JE, Collmer A (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* (80-) 284:1322–1328.
- Gallais A (2011) *Méthodes de création de variétés en amélioration des plantes*. Editions Quae

- Ganal MW, Altmann T, Röder MS (2009) SNP identification in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* 12:211–217. doi: 10.1016/j.pbi.2008.12.009
- Genin S, Boucher C (2002) *Ralstonia solanacearum*: secrets of a major pathogen unveiled by analysis of its genome. *Mol Plant Pathol* 3:111–118.
- Genin S, Gough CL, Zischek C, Boucher CA (1992) Evidence that the *HrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Microbiology* 6:3065–3076.
- Genin S, Denny TP (2012) Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol* 50:67–89. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173000
- Gillings MR, Fahy P (1994) Genomic fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. In: Hayward AC, Hartman GL (eds) *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB INTERNATIONAL, Wallingford, Oxon, England, pp 95–112
- Girard J-C, Nicole JF, Cheron J-J, et al (1993) Bacterial wilt due to *Pseudomonas solanacearum* in Reunion: general situation and current research. In: ACIAR PROCEEDINGS. AUSTRALIAN CENTRE FOR INTERNATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH, p 343
- Glaubitz JC, Casstevens TM, Lu F, et al (2014) TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0090346
- Godiard L, Sauviac L, Torii KU, et al (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J* 36:353–365. doi: 10.1046/j.1365-3113.2003.01877.x
- Gousset C, Collonnier C, Mulya K, et al (2005) *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). *Plant Sci* 168:319–327. doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.034
- Gramazio P, Blanca J, Ziarsolo P, et al (2016) Transcriptome analysis and molecular marker discovery in *Solanum incanum* and *S. aethiopicum*, two close relatives of the common eggplant (*Solanum melongena*) with interest for breeding. *BMC genomics* 17:1. doi: 10.1186/s12864-016-2631-4
- Granada GA, Sequeira L (1983) A new selective medium for *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis* 67:1084–1088.
- Grimault V, Prior P (1993) Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol* 42:589–594.
- Grubben GJH (2004a) Légumes. PROTA
- Grubben GJH (2004b) Plant Resources of Tropical Africa (PROTA). Prota
- Guidot A, Prior P, Schoenfeld J, et al (2007) Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J Bacteriol* 189:377–387.
- Guinard J (2015) Dynamique évolutive de *Ralstonia solanacearum* en réponse aux pressions de sélection de l'aubergine résistante: approche populationnelle, de génétique évolutive et fonctionnelle de la durabilité de la résistance. [PhD Thesis], Université de la Réunion.
- Guinard J, Vinatzer BA, Poussier S, et al (2016a) Draft genome sequences of nine strains of *Ralstonia solanacearum* differing in virulence to eggplant (*Solanum melongena*). *Genome Announc* 4:e01415-15.

- Guinard J, Wang K, Lonjon F, et al (2016b) The type III effector RipAX2 confers avirulence of *Ralstonia solanacearum* to the eggplant AG91-25, carrying the resistance gene *Ers1*. In: International Bacterial Wilt Symposium.
- Gundry CN, Vandersteen JG, Reed GH, et al (2003) Amplicon melting analysis with labeled primers: A closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clin Chem* 49:396–406. doi: 10.1373/49.3.396
- Guo J-H, Qi H-Y, Guo Y-H, et al (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol Control* 29:66–72.
- Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, et al (1999) An integrated high-density RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* F2 populations. *Theor Appl Genet* 99:254–271.
- Hadfield JD (2010) MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. *J Stat Softw* 33:1–22.
- Haldane JBS (1919) The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* 8:299–309.
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity (Edinb)* 69:315–24. doi: 10.1038/hdy.1992.131
- Hallauer AR, Miranda JB (1981) Quantitative Genetics in Maize Breeding. Iowa State University Press, Ames, IA
- Harushima Y, Nakagahra M, Yano M, et al (2001) A genome-wide survey of reproductive barriers in an intraspecific hybrid. *Genetics* 159:883–892.
- Hayter AJ (1986) The maximum familywise error rate of Fisher’s least significant difference test. *J Am Stat Assoc* 81:1000–1004.
- Hayward AC (1991) Bacterial Wilt Caused By *Pseudomonas solanacearum*. *J Plant Pathol* 95:237–245.
- He J, Zhao X, Laroche A, et al (2014) Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front Plant Sci* 5:484. doi: 10.3389/fpls.2014.00484
- He P, Li JZ, Zheng XW, et al (2001) Comparison of molecular linkage maps and agronomic trait loci between DH and RIL populations derived from the same rice cross. *Crop Sci* 41:1240–1246.
- Heath MC (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 3:315–319.
- Hirakawa H, Shirasawa K, Miyatake K, et al (2014) Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative *solanum* species indigenous to the old world. *DNA Res* 21:649–60. doi: 10.1093/dnares/dsu027
- Holland JB (2001) Epistasis and plant breeding. *Plant Breed Rev* 21:27–92.
- Huerta AI, Milling A, Allen C (2015) Tropical strains of *Ralstonia solanacearum* outcompete race 3 biovar 2 strains at lowland tropical temperatures. *Appl Environ Microbiol* 81:3542–51. doi: 10.1128/AEM.04123-14
- Huet G (2014) Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* 5:715. doi: 10.3389/fpls.2014.00715
- Ivey MLL, Gardener BBM, Opina N, Miller SA (2007) Diversity of *Ralstonia solanacearum* infecting

- eggplant in the Philippines. *Phytopathology* 97:1467–1475. doi: 10.1094/PHYTO-97-11-1467
- Janse JD (1996) Potato brown rot in Western Europe—history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *EPPO Bull* 26:679–695.
- Jeong Y, Kim J, Kang Y, et al (2007) Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis* 91:1277–1287. doi: 10.1094/PDIS-91-10-1277
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- Kaushik P, Prohens J, Vilanova S, et al (2016) Phenotyping of Eggplant Wild Relatives and Interspecific Hybrids with Conventional and Phenomics Descriptors Provides Insight for Their Potential Utilization in Breeding. *Front Plant Sci* 7:677. doi: 10.3389/fpls.2016.00677
- Kelman A (1954) The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium. *Phytopathology* 44:693–695.
- Kim B-S, French E, Caldwell D, et al (2016) Bacterial wilt disease: Host resistance and pathogen virulence mechanisms. *Physiol Mol Plant Pathol* 95:37–43.
- Knapp S (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J Exp Bot* 53:2001–2022.
- Kosambi DD (1943) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12:172–175.
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S (2016) Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. *CRC Crit Rev Plant Sci* 35:38–55.
- Lahaye T (2004) Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance ; *Arabidopsis thaliana* *RRS1-R* and its interaction with *Ralstonia solanacearum* *popP2*. *Trends Plant Sci* 9:1–4. doi: 10.1016/j.tplants.2003.11.002
- Lande R, Thompson R (1998) Efficiency of multistage marker-assisted selection in the improvement of multiple quantitative traits. *Heredity (Edinb)* 80 (Pt 4):489–498. doi: 10.1046/j.1365-2540.1998.00308.x
- Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185–199.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, et al (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:1. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25
- Lebeau A (2010) Résistance de la tomate, l’aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum*: interactions entre les gènes de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l’aubergine. [PhD Thesis], Université de la Réunion.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, et al (2010) Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Phytopathology* 101:154–165. doi: 10.1094/phyto-02-10-0048
- Lebeau A, Gouy M, Daunay MC, et al (2013) Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor Appl Genet* 126:143–158. doi:

10.1007/s00122-012-1969-5

- Lester RN, Hasan SMZ (1991) Origin and domestication of the brinjal eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum*, in Africa and Asia. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada N (eds) Solanaceae III. Taxonomy, chemistry, evolution., Roy. Bot. pp 369–387
- Levy M, Edelbaum O, Sela I (2004) Tobacco Mosaic Virus Regulates the Expression of Its Own Resistance Gene *N*. Plant Physiol 135:2392–2397. doi: 10.1104/pp.104.044859.2392
- Li H, Durbin R (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics 25:1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li H, Hearne S, Banziger M, et al (2010) Statistical properties of QTL linkage mapping in biparental genetic populations. Hered 105:257–267. doi: 10.1038/hdy.2010.56
- Li Y, He M (2014) Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in *Pinctada fucata* Using Restriction-Site Associated DNA Sequencing. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0111707
- Li Z, Wu S, Bai X, et al (2011) Genome sequence of the tobacco bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. J Bacteriol 193:6088–6089.
- Lipka U, Fuchs R, Lipka V (2008) *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. Curr Opin Plant Biol 11:404–411.
- Mahbou-Somo-Toukam G (2010) Diversité de *Ralstonia Solanacearum* au Cameroun et bases génétiques de la résistance chez le piment (*Capsicum Annuum*) et les Solanacées. [PhD Thesis], Agro Paris Tech, Paris.
- Mahbou Somo Toukam G, Cellier G, Wicker E, et al (2009) Broad diversity of *Ralstonia solanacearum* strains in Cameroon. Plant Dis 93:1123–1130.
- Malinovskiy FG, Fangel JU, Willats WGT (2014) The role of the cell wall in plant immunity. Front Plant Sci 5:178. doi: 10.3389/fpls.2014.00178
- Mangin B, Thoquet P, Olivier J, Grimsley NH (1999) Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. Genetics 151:1165–1172.
- Manichaikul A, Moon JY, Sen S, et al (2009) A model selection approach for the identification of quantitative trait loci in experimental crosses, allowing epistasis. Genetics 181:1077–1086. doi: 10.1534/genetics.108.094565
- Mansfield J, Genin S, Magori S, et al (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol 13:614–629. doi: 10.1111/J.1364-3703.2012.00804.X
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet 17:1. doi: http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200
- Martinez O, Curnow RN (1992) Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. Theor Appl Genet 85:480–488. doi: 10.1007/BF00222330
- McAvoy T, Freeman JH, Rideout SL, et al (2012) Evaluation of grafting using hybrid rootstocks for management of bacterial wilt in field tomato production. HortScience 47:621–625.
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. Annu Rev Phytopathol 40:349–379.
- McKenna A, Hanna M, Banks E, et al (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework

- for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- Miedaner T (2016) Breeding strategies for improving plant resistance to diseases. In: *Advances in Plant Breeding Strategies: Agronomic, Abiotic and Biotic Stress Traits*. Springer, pp 561–599
- Mimura Y, Inoue T, Minamiyama Y, Kubo N (2012) An SSR-based genetic map of pepper (*Capsicum annuum* L.) serves as an anchor for the alignment of major pepper maps. *Breed Sci* 62:93–98.
- Mimura Y, Kageyama T, Minamiyama Y, Hirai M (2009) QTL analysis for resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Capsicum* accession “LS2341.” *J Japan Soc Hort Sci* 78:307–313. doi: 10.2503/jjshs1.78.307
- Monaghan J, Zipfel C (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Curr Opin Plant Biol* 15:349–357.
- Montarry J, Cartier E, Jacquemond M, et al (2012) Virus adaptation to quantitative plant resistance: erosion or breakdown? *J Evol Biol* 25:2242–2252.
- Morais TP, Lopes CA, Tebaldi ND, Luz JMQ (2015) Occurrence and diversity of *Ralstonia solanacearum* populations in Brazil. *Biosci J* 31:1722–1737.
- Myles S (2013) Improving fruit and wine: What does genomics have to offer? *Trends Genet* 29:190–196. doi: 10.1016/j.tig.2013.01.006
- N’Guessan CA, Abo K, Fondio L, et al (2012) So Near and Yet so Far: The Specific Case of *Ralstonia solanacearum* Populations from Côte d’Ivoire in Africa. *Phytopathology* 102:733–740. doi: 10.1094/PHYTO-11-11-0300
- Nahar K, Matsumoto I, Taguchi F, et al (2014) *Ralstonia solanacearum* type III secretion system effector Rip36 induces a hypersensitive response in the nonhost wild eggplant *Solanum torvum*. *Mol Plant Pathol* 15:297–303. doi: 10.1111/mpp.12079
- Nakaho K, Inoue H, Takayama T, Miyagawa H (2004) Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *J Gen Plant Pathol* 70:115–119.
- Narusaka M, Shirasu K, Noutoshi Y, et al (2009) *RRS1* and *RPS4* provide a dual Resistance- gene system against fungal and bacterial pathogens. *Plant J* 60:218–226. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03949.x
- Nilsson NO, Hansen M, Panagopoulos AH, et al (1999) QTL analysis of *Cercospora* leaf spot resistance in sugar beet. *Plant Breed* 118:327–334. doi: 10.1046/j.1439-0523.1999.00390.x
- Niño-Medina G, Muy-Rangel D, Gardea-Béjar A, et al (2014) Nutritional and nutraceutical components of commercial eggplant types grown in Sinaloa, Mexico. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* 42:538–544. doi: 10.1583/nbha4229573
- Nunome T, Ishiguro K, Yoshida T, Hirai M (2001) Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. *Breed Sci* 51:19–26.
- Nunome T, Negoro S, Kono I, et al (2009) Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theor Appl Genet* 119:1143–1153. doi: 10.1007/s00122-009-1116-0
- Panthee DR, Gardner RG, Ibrahim R, Anderson C (2015) Molecular Markers Associated with *Ph-3* Gene Conferring Late Blight Resistance in Tomato. *Am J Plant Sci* 6:2144–2150. doi:

10.4236/ajps.2015.613216

- Pedley KF, Martin GB (2003) Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* 41:215–243.
- Peeters N, Carrère S, Anisimova M, et al (2013a) Répertoire , unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex Répertoire , unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* s.
- Peeters N, Guidot A, Vailleau F, Valls M (2013b) *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol* 14:651–662.
- Pensec F, Lebeau A, Daunay MC, et al (2015) Towards the Identification of Type III Effectors Associated with *Ralstonia solanacearum* Virulence on Tomato and Eggplant. *Phytopathology* 105:1529–1544. doi: 10.1094/PHYTO-06-15-0140-R
- Plazas M, Andújar I, Vilanova S, et al (2014) Conventional and phenomics characterization provides insight into the diversity and relationships of hypervariable scarlet (*Solanum aethiopicum* L .) and gboma (*S . macrocarpon* L .) eggplant complexes. 5:1–13. doi: 10.3389/fpls.2014.00318
- Plazas M, López-Gresa MP, Vilanova S, et al (2013) Diversity and relationships in key traits for functional and apparent quality in a collection of eggplant: Fruit phenolics content, antioxidant activity, polyphenol oxidase activity, and browning. *J Agric Food Chem* 61:8871–8879.
- Plazas M, Vilanova S, Gramazio P, et al (2016) Interspecific hybridization between eggplant and wild relatives from different gene pools. *J Am Soc Hortic Sci* 141:34–44.
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, et al (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci* 14:21–29. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.006
- Poland J, Endelman J, Dawson J, et al (2012) Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *Plant Genome* 5:103–113. doi: Doi 10.3835/Plantgenome2012.06.0006
- Popoola AR, Ganiyu SA, Enikuomelin OA, et al (2015) Isolation and Characterization of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Tomato in Nigeria. 29:1–10. doi: <http://dx.doi.org/10.4314/njb.v29i1.1>
- Poueymiro M, Cunnac S, Barberis P, et al (2009) Two Type III Secretion System Effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 Determine Host-Range Specificity on Tobacco. *Mol Plant-Microbe Interact* 22:538–550. doi: 10.1094/MPMI-22-5-0538
- Poussier S, Prior P, Luisetti J, et al (2000) Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst Appl Microbiol* 23:479–486.
- Premabati C, Munshi AD, Behera TK, et al (2015) Cross compatibility in interspecific hybridization of eggplant , *Solanum melongena* , with its wild relatives. *Sci Hortic (Amsterdam)* 193:353–358. doi: 10.1016/j.scienta.2015.07.024
- Prior P, Ailloud F, Dalsing BL, et al (2016) Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:1–11. doi: 10.1186/s12864-016-2413-z
- Prohens J, Rodríguez-Burruezo A, Raigón MD, Nuez F (2007) Total phenolic concentration and browning susceptibility in a collection of different varietal types and hybrids of eggplant: implications for breeding for higher nutritional quality and reduced browning. *J Am Soc Hortic Sci* 132:638–646.

- Qian Y liang, Wang X sheng, Wang D zhou, et al (2013) The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). *Euphytica* 192:259–266. doi: 10.1007/s10681-012-0846-2
- Qiu G-F, Xiong L-W, Liu Z-Q, et al (2016) A first generation microsatellite-based linkage map of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and its application in quantitative trait loci (QTL) detection. *Aquaculture* 451:223–231. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.09.018
- Quenouille J, Paulhiac E, Moury B, Palloix a (2014) Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity* (Edinb) 112:579–587. doi: 10.1038/hdy.2013.138
- R Core Team (2014) *R: A language and Environment for Statistical Computing* Vienna:R Foundation for Statistical Computing. Available at:<http://www.R-project.org/>.
- Ramesh R, Achari G, Asolkar T, et al (2016) Management of bacterial wilt of brinjal using wild brinjal (*Solanum torvum* Sw) as root stock.
- Ramsubhag A, Lawrence D, Cassie D, et al (2012) Wide genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains affecting tomato in Trinidad, West Indies. *Plant Pathol* 61:844–857. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02572.x
- Ravelomanantsoa S (2016) Biologie des populations du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* appliquée à l'épidémiologie du flétrissement bactérien de la pomme de terre à Madagascar. [Thesis]. Université de la Réunion/Université d'Antananarivo.
- Rebaï A (1997) Comparison of methods for regression interval mapping in QTL analysis with non-normal traits. *Genet Res* 69:69–74. doi: 10.1017/S0016672396002558
- Remenant B, Coupat-goutaland B, Guidot A, et al (2010) Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence.
- Remenant B, de Cambiaire JC, Cellier G, et al (2011) *Ralstonia syzygii*, the blood disease bacterium and some asian *R. solanacearum* strains form a single genomic species despite divergent lifestyles. *PLoS One* 6:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0024356
- Robinson RA (1976) Plant pathosystems. In: *Plant pathosystems*. Springer, pp 15–31
- Roux F, Voisin D, Badet T, et al (2014) Opinion piece Resistance to phytopathogens e tutti quanti : placing plant quantitative disease resistance on the map. 15:427–432. doi: 10.1111/mpp.12138
- Saddler GS (2005) Management of bacterial wilt disease. In: Allen C, Prior P, Hayward AC (eds) *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. American Phytopathological Society (APS Press), Saint Paul, Minnesota, pp 121–132
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, et al (2014) Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:3087–3103. doi: 10.1099/ij.s.0.066712-0
- Sagar V, Gurjar MS, Arjunan J, Bakade RR (2014) Phylotype analysis of *Ralstonia solanacearum* strains causing potato bacterial wilt in Karnataka in India. 8:1277–1281. doi: 10.5897/AJMR2014.6613
- Saile E, McGarvey JA, Schell MA, Denny TP (1997) Role of extracellular polysaccharide and

- endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 87:1264–1271.
- Sakthivel K, Gautam RK, Kumar K, Roy SD (2016) Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains on the Andaman Islands in India. 100:732–738.
- Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al (2002) Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415:497–502.
- Salgon S, Jourda C, Sauvage C, et al (submitted) Eggplant resistance to *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Frontiers in plant sciences*.
- Salvi S, Tuberosa R (2005) To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci* 10:297–304.
- Sanchez Perez A, Mejia L, Fegan M, Allen C (2008) Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol* 57:320–331. doi: 10.1111/j.1365-3059.2007.01769.x
- Sarah G, Homa F, Pointet S, et al (2016) A large set of 26 new reference transcriptomes dedicated to comparative population genomics in crops and wild relatives. *Mol Ecol Resour*. doi: 10.1111/1755-0998.12587
- Satagopan JM (1995) A Markov chain Monte Carlo approach to detect polygene loci for complex traits.
- Sato S, Tabata S, Hirakawa H, et al (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635–641. doi: 10.1038/nature11119
- Sękara A, Cebula S, Kunicki E (2007) Cultivated eggplants – origin , breeding objectives and genetic resources , a review. *World* 97–114.
- Sekhwil MK, Li P, Lam I, et al (2015) Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int J Mol Sci* 16:19248–19290.
- Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014) Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol Breed* 33:1–14. doi: 10.1007/s11032-013-9917-x
- Slater GSC, Birney E (2005) Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC bioinformatics* 6:31. doi: DOI: 10.1186/1471-2105-6-31
- Smýkal P, Varshney RK, Singh VK, et al (2016) From Mendel’s discovery on pea to today’s plant genetics and breeding. *Theor Appl Genet* 129:2267–2280.
- Sohn KH, Segonzac C, Rallapalli G, et al (2014) The nuclear immune receptor RPS4 is required for RRS1 SLH1-dependent constitutive defense activation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 10:e1004655. doi: 10.1371/journal.pgen.1004655
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 11:287–313.
- Stange M, Utz HF, Schrag TA, et al (2013) High-density genotyping: an overkill for QTL mapping? Lessons learned from a case study in maize and simulations. *Theor Appl Genet* 126:2563–2574. doi: 10.1007/s00122-013-2155-0
- Stekhoven DJ, Bühlmann P (2012) MissForest—non-parametric missing value imputation for mixed-

- type data. Bioinformatics 28:112–118. doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr597>
- Stommel JR, Whitaker BD (2003) Phenolic Acid Content and composition of eggplant fruit in a germplasm core subset. J Amer Soc Hort Sci 128:704–710.
- Stukenbrock EH, McDonald BA (2008) The origins of plant pathogens in agro-ecosystems. Annu Rev Phytopathol 46:75–100.
- Syfert MM, Castañeda-álvarez NP, Khoury CK, et al (2016) Crop wild relatives of the brinjal eggplant (*Solanum melongena*): Poorly represented in genebanks and many species at risk of extinction 1. Am J Bot 103:635–651. doi: 10.3732/ajb.1500539
- Tang J, Vosman B, Voorrips RE, et al (2006) QualitySNP: a pipeline for detecting single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in EST data from diploid and polyploid species. BMC Bioinformatics 7:438. doi: 10.1186/1471-2105-7-438
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, et al (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132:1141–1160.
- Tans-Kersten J, Huang H, Allen C (2001) *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. J Bacteriol 183:3597–3605.
- Tasset C, Bernoux M, Jauneau A, Pouzet C, Briere C, Kieffer-Jacquino S, Rivas S, marco Y, Deslandes L (2010) Autoacetylation of the *Ralstonia solanacearum* effector PopP2 targets a lysine residue essential for RRS1-R mediated immunity in Arabidopsis. Plos pathogens 6(11):01001202.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, et al (1996a) Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii7996.
- Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, et al (1996b) Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies.
- Toppino L, Barchi L, Valentino D, et al (2016) QTLs mapping for *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* resistance in eggplant (*Solanum melongena* L.). In: Ertsey-Peregi K, Füstös Z, Palotás G, Csilléry G (eds) Proceedings of the XVIth Eucarpia Capsicum and Eggplant Working Group Meeting. Diamond Congress Ltd, Budapest, pp 248–255
- Treangen TJ, Salzberg SL (2012) Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. Nat Rev Genet 13:36–46. doi: 10.1038/nrg3117
- Tuinstra MR, Ejeta G, Goldsbrough PB (1997) Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. Theor Appl Genet 95:1005–1011. doi: 10.1007/s001220050654
- Vailleau F, Sartorel E, Jardinaud M-F, et al (2007) Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. Mol Plant Microbe Interact 20:159–167. doi: 10.1094/MPMI-20-2-0159
- Van der Linden L, Bredenkamp J, Naidoo S, et al (2013) Gene-for-gene tolerance to bacterial wilt in *Arabidopsis*. Mol Plant Microbe Interact 26:398–406. doi: 10.1094/MPMI-07-12-0188-R
- Van Ooijen JW (2006) JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma BV, Wageningen 33:10–1371.
- Van Valen L (1973) A new evolutionary law. Evol theory 1:1–30.
- Verma RK, Shekhawat GS (1991) Effect of crop rotation and chemical soil treatment on bacterial wilt

- of potato. *Indian Phytopathol* 44:5–8.
- Vleeshouwers VGAA, Oliver RP (2014) Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 27:196–206. doi: 10.1094/MPMI-10-13-0313-IA
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77–78. doi: <https://doi.org/10.1093/jhered/93.1.77>
- Vorontsova M, Stern S, Bohs L, Knapp S (2013) African spiny *Solanum* (subgenus *Leptostemonum*, Solanaceae): a thorny phylogenetic tangle. *Bot J Linn Soc* 173:176–193.
- Wall D, Kaiser D (1999) Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32:1–10.
- Wang JF, Ho FI, Truong HTH, et al (2013) Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar “Hawaii 7996” to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241–252. doi: 10.1007/s10681-012-0830-x
- Wang JF, Olivier J, Thoquet P, et al (2000) Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol Plant Microbe Interact* 13:6–13. doi: 10.1094/MPMI.2000.13.1.6
- Wang S, Wong D, Forrest K, et al (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol J* 12:787–796.
- Weese TL, Bohs L (2010) Eggplant origins: out of Africa, into the Orient. *Taxon* 59:49–56. doi: 10.2307/27757050
- White SM, Bullock JM, Hooftman DAP, Chapman DS (2017) Modelling the spread and control of *Xylella fastidiosa* in the early stages of invasion in Apulia, Italy. *Biol Invasions* 1–13.
- Wicker E (2015) Mélodie en Sous-Sol-Ecologie, évolution et virulences de pathogènes telluriques [HDR Thesis] Université de la Réunion.
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al (2009) Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *ralstonia solanacearum* in martinique (French West Indies). *Plant Pathol* 58:853–861. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02098.x
- Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al (2007) *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl Environ Microbiol* 73:6790–6801. doi: 10.1128/AEM.00841-07
- Wicker E, Lefeuvre P, de Cambiaire J-C, et al (2012) Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. *ISME J* 6:961–974. doi: 10.1038/ismej.2011.160
- Wu F, Eannetta NT, Xu Y, Tanksley SD (2009) A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theor Appl Genet* 118:927–935. doi: 10.1007/s00122-008-0950-9
- Xi’ou X, Bihao C, Guannan L, et al (2014) Functional Characterization of a Putative Bacterial Wilt Resistance Gene (*RE-bw*) in Eggplant. *Plant Mol Biol Report* 33:1058–1073. doi: 10.1007/s11105-014-0814-1
- Xu J, Pan ZC, Prior P, et al (2009) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China. *Eur J Plant Pathol* 125:641–653. doi: 10.1007/s10658-009-9512-5
- Xu X, Pan S, Cheng S, et al (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*

- 475:189–195. doi: 10.1038/nature10158
- Xue QY, Yin YN, Yang W, et al (2011) Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China assessed by PCR-based fingerprints to unravel host plant- and site-dependent distribution patterns. *FEMS Microbiol Ecol* 75:507–519. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01026.x
- Yahiaoui N, Ravelomanantsoa S, Cheron JJ, et al (2016) How diverse is the *Ralstonia solanacearum* species complex in the South-West Indian Ocean ? In: 12èmes Rencontres Plantes-Bactéries. Aussois, France,
- Yamada T, Kawasaki T, Nagata S, et al (2007) New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiology* 153:2630–2639.
- Yeri SB, Shirasawa K, Pandey MK, et al (2014) Development of NILs from heterogeneous inbred families for validating the rust resistance QTL in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Breed* 133:80–85. doi: 10.1111/pbr.12130
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1663–1668. doi: 10.1073/pnas.95.4.1663
- Zeng Z, Kao C, Basten CJ (1999) Estimating the genetic architecture of quantitative traits. *Genet Res* 74:279–289.
- Zeng ZB (1994) Precision mapping of Quantitative Trait Loci. *Genetics* 136:1457–1468.
- Zhan J, Thrall PH, Papaix J, et al (2015) Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annu Rev Phytopathol* 53:19–43.
- Zhang C, Liu L, Wang X, et al (2014) The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans*. *Theor Appl Genet* 127:1353–1364. doi: 10.1007/s00122-014-2303-1
- Zhang C, Liu L, Zheng Z, et al (2013) Fine mapping of the *Ph-3* gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato. *Theor Appl Genet* 126:2643–2653. doi: 10.1007/s00122-013-2162-1
- Zhang L, Wang S, Li H, et al (2010) Effects of missing marker and segregation distortion on QTL mapping in F2 populations. *Theor Appl Genet* 121:1071–1082. doi: 10.1007/s00122-010-1372-z
- Zhang S, Yang H, Singh L (2003) Common Features of Segregation Distortion in Plants and Animals. *Genetica* 117:27–35. doi: 10.1023/A
- Zhou J, Loh YT, Bressan RA, Martin GB (1995) The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by *Pto* and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83:925–935. doi: 10.1016/0092-8674(95)90208-2

Genetic determinism of resistance to bacterial wilt in eggplant and applications in plant breeding

Abstract. Eggplant cultivation is confronted by the bacterial wilt (BW) disease caused by the *Ralstonia solanacearum* species complex (RSSC). Breeding resistant cultivars is the most effective strategy to control the disease but is limited by the pathogen's extensive genetic diversity. Thus, identifying the genetic bases of specific and non-specific resistance is a prerequisite to breed improvement. A major gene (*ERs1*) was previously mapped in eggplant from the cross of lines MM738 (S) x AG91-25 (R). *ERs1* was originally found to control three strains from phylotype I, while being totally ineffective against the strain PSS4 from the same phylotype. The objectives of this thesis was to (i) confirm and clarify the position of *ERs1* in MM738 x AG91-25 RIL population, (ii) define the spectrum of action of *ERs1*, (iii) found other broad-host or phylotype-specific resistance QTLs, promptly to control virulent strains and (iv) introgress some of the mapped QTLs, among them *ERs1*, into two susceptible cultivars from Reunion Island. For this purpose, 2 new populations of doubled haploid (DH) were created from the same susceptible MM738 lines and 2 other resistant lines (MM152 and EG203). Dense genetic maps were created with SNP markers for both RIL and DH populations. The RIL population was phenotyped with four additional RSSC strains belonging to phylotypes I, IIA, IIB and III and the two DH populations were phenotyped with virulent strains PSS4 from phylotype I and R3598 from phylotype III. QTL mapping confirmed the existence of major QTL *ERs1* (renamed *EBWR9* in our study), defined its position at the bottom of chromosome 9 and validated its specific control of three phylotype I strains. Five potential candidate R-genes were underlying the physical interval of *EBWR9*. Two other QTLs associated with partial, broad-spectrum resistance (*EBWR2* and *EBWR14*), were detected on chromosomes 2 and 5. QTL analysis did not reveal any reliable QTLs in resistant line MM152, whereas it reveals a polygenic system in resistant line EG203. Among QTLs found in EG203, *ERPR3a* and *ERPR6* were detected with both PSS4 and R3598 strains on chromosome 3 and 6 respectively. *ERPR6* was found in syntenic position with BW resistance QTL *Bwr-6* detected in tomato. Markers closely linked to QTLs detected in this thesis could help in introgressing these resistances into susceptible cultivars thanks to the MAS. The transfer of resistance into 2 local cultivars was initiated and showed the possibility of introgressing the major QTL *EBWR9* and the broad-spectrum QTL *EBWR2* through a backcross scheme. The first results of this work offer perspectives to breed broad-spectrum resistant cultivars and to potentially control an important part of the RSSC genetic diversity.

Key words: plant-pathogen interaction, eggplant, bacterial wilt, resistance, plant breeding

Déterminisme génétique de la résistance au flétrissement bactérien chez l'aubergine et applications en amélioration variétale

Résumé. La culture de l'aubergine est confrontée au flétrissement bactérien (BW), maladie causée par le complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* (RSSC). La résistance variétale est la méthode la plus efficace pour contrôler cette maladie, mais elle se heurte à la forte diversité génétique du pathogène. Ainsi, l'identification des bases génétiques des résistances spécifiques et non-spécifiques est essentielle pour améliorer la résistance des cultivars. Un facteur génétique majeur (*ERs1*) a, dans une étude précédente, été cartographié dans une population de lignées recombinantes (RILs) d'aubergine issue du croisement entre les lignées MM738 (S) et AG91-25 (R). Initialement, *ERs1* a été détecté vis-à-vis de 3 souches du phylotype I, alors qu'il était contourné par la souche PSS4 de ce même phylotype. Les objectifs de cette thèse étaient (i) de confirmer la présence et préciser la position d'*ERs1* dans la population RILs MM738 x AG91-25, (ii) de définir le spectre d'action d'*ERs1*, (iii) d'identifier d'autres QTLs potentiellement impliqués dans une résistance phylotype-spécifique ou à spectre plus large, afin notamment de contrôler les souches virulentes, et (iv) d'examiner la possibilité d'introgresser certains de ces facteurs de résistance, *ERs1* en priorité, dans des cultivars sensibles d'aubergine. Pour cela, nous avons produit 2 nouvelles populations d'haploïdes doublés (HD) issues d'un croisement entre la même lignée sensible MM738 et 2 autres lignées résistantes (MM152 et EG203). A partir de la population RILs et des 2 populations HD, nous avons produit 3 nouvelles cartes génétiques denses en marqueurs SNPs. La population RILs a été phénotypée avec 4 souches supplémentaires appartenant aux phylotypes I, IIA, IIB et III, tandis que les 2 populations HD l'ont été avec les souches virulentes PSS4 du phylotype I et R3598 du phylotype III. Nous avons ainsi confirmé l'existence du QTL majeur *ERs1* (renommé *EBWR9*), précisé sa position à l'extrémité du bras long du chromosome 9 et validé son contrôle spécifique de trois souches du phylotype I. Cinq candidats potentiels de type R ont été identifiés dans l'intervalle physique d'*EBWR9*. Deux autres QTLs ont été détectés et associés à de la résistance partielle à large spectre (*EBWR2* et *EBWR14*) respectivement sur le chromosome 2 et 5. Les analyses QTL sur les populations HD n'ont révélé aucun QTL statistiquement fiable chez la lignée résistante MM152, tandis qu'elles ont mis en évidence un système de résistance de type polygénique chez la lignée résistante EG203. Parmi les QTLs détectés chez EG203, *ERPR3a* et *ERPR6* ont été détectés à la fois vis-à-vis de la souche PSS4 et R3598 sur les chromosomes 3 et 6. *ERPR6* est en position synténique avec *bwr-6*, un QTL de résistance au BW détecté chez la tomate. Les marqueurs liés aux QTLs détectés au cours de cette thèse devraient faciliter le transfert de ces résistances dans des cultivars sensibles grâce à la SAM. Un schéma de transfert de la résistance dans 2 cultivars locaux a été initié et a montré la possibilité d'introgresser dans ceux-ci le QTL majeur *EBWR9* ainsi que le QTL généraliste *EBWR2*. Ces premiers résultats ouvrent d'importantes perspectives quant à la création de variétés résistantes et la possibilité à terme de contrôler une bonne part de la diversité génétique du RSSC.

Mots clés : interaction plante-pathogène, aubergine, flétrissement bactérien, résistance, amélioration variétale
