

## Etude de la résistance *in vitro* à *Ralstonia solanacearum* chez six hybrides somatiques de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) et leurs parents

R. SIDIKOU DJERMAKOYE SEYNI<sup>1</sup>

Faculté des Sciences Université A.M. de Niamey, BP 12022, Niamey, Niger (Auteur et adresse postale pour les correspondances), E-mail : sramatou@ird.ne ou rsidikouseyni@yahoo.com, Tel : 00 (227) 26 58 44 ou 00 (227) 73 27 38 Fax : 00 (227) 73 30 72

D. SIHACHAKR<sup>2</sup> <sup>2</sup>Morphogénèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud – 91405 Orsay Cedex, France.

A.C. LE ROUX<sup>3</sup> <sup>3</sup>Unité Mixte de Recherches INRA/ENSAR BIO3P, Domaine de la Motte, BP 35327-F, 35650 Le Rheu Cedex, France.

A. SERVAES<sup>2</sup>, A. AMBROISE<sup>2</sup> <sup>2</sup>Morphogénèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud – 91405 Orsay Cedex, France.

B. JOUAN<sup>3</sup> <sup>3</sup>Unité Mixte de Recherches INRA/ENSAR BIO3P, Domaine de la Motte, BP 35327-F, 35650 Le Rheu Cedex, France.

D. ELLISSECHE<sup>4</sup> <sup>4</sup>INRA Station d'amélioration de la pomme de terre et des plantes à bulbes, Keraïber, 29260 Ploudaniel.

G. DUCREUX<sup>2</sup> <sup>2</sup>Morphogénèse Végétale Expérimentale, Bât. 360, Université Paris Sud – 91405 Orsay Cedex, France.

### RÉSUMÉ

Le flétrissement bactérien dû à la bactérie *Ralstonia solanacearum* est l'une des plus graves maladies de la pomme de terre intervenant dans de nombreux pays. La principale voie pour limiter l'incidence de cette maladie est la création de variétés tolérantes. L'hybridation somatique entre une variété diploïde sensible (BF15.2X) et des espèces sauvages (*Solanum stenotomum*, *Solanum phureja*) apparentées résistantes à la bactérie ont été menées dans l'optique d'un transfert de la résistance. Six des hybrides obtenus ont été évalués comparativement avec les trois parents sauvages et le témoin sensible BF15.4X. La souche de *Ralstonia solanacearum* utilisée, d'origine sahélienne, de la région de Sikasso au Mali, appartient au biovar 3 et à la division 1. Les degrés de résistance ou de sensibilité des hybrides BS33, BS37, BS44 (issus de la fusion BF15.2X + *Solanum stenotomum*) et BP3, BP4, BP15 (issus de la fusion BF15.2X + *Solanum phureja*) ont été évalués sur la base de tests de résistance. Ainsi, d'après les Indices de Maladie ( $IMr = \sum Ci Ni / \sum Ni$  de WINSTEAD et KELMAN, 1952), les hybrides avec *S. stenotomum* BS33, BS37, BS44 seraient résistants (avec des IMr respectifs de 0.16 – 0.16 – 0.17 à 3 semaines de culture), tandis que les hybrides avec *S. phureja* BP3, BP4, BP15 seraient tolérants (avec des IMr respectifs de 0.26 – 0.26 – 0.19). Ces résultats sont confirmés au niveau des parents où il a été trouvé que vis à vis de cette souche sahélienne de *R. solanacearum*, le parent sauvage *S. stenotomum* (SST) est plus résistant (IMr 0.14) que le parent sauvage *S. phureja* (PS) qui lui n'est que tolérant (IMr 0.38). Le témoin BF15.4X étant bien entendu toujours sensible (IMr 0.69) à *R. solanacearum*.

**Mots clés :** *S. tuberosum*, *R. solanacearum*, *S. stenotomum*, *S. phureja*, flétrissement bactérien, hybridation somatique, protoplastes.

**Abréviations :** MS – Milieu de base Murashigé et Skoog, ufc – unité formant la colonie

### ABSTRACT

Bacterial wilt due to *Ralstonia solanacearum* is one of the severest diseases of potatoes in many countries. The main way to limit the incidence of that disease is to create some tolerant varieties. Somatic hybridisation between a sensitive diploid variety (BF15.2X) and related wild species (*Solanum stenotomum*, *Solanum phureja*) resistant to the bacteria, has been done in order to transfer the resistance character. Six of the obtained hybrids have been evaluated comparatively to the 3 wild parents and the sensitive control BF15.2X. The strain of *R. solanacearum* used, originated from Sahelian region of Sikasso in Mali, belongs to biovar 3 and division 1. The resistance and sensitivity level of the hybrids BS33, BS37 BS44 (from the cross of BF15.2X + *S. stenotomum*.) and BP3, BP4, BP15 (from the cross of BF15.2X + *S. phureja*) have been assessed on a resistance test basis.

Therefor according to the index of disease ( $IMr = \sum Ci Ni / \sum Ni$  of WINSTEAD and KELMAN, 1952), hybrids with *S. stenotomum*. BS33, BS37, BS44 were resistant (with IMr respectively of 0.16-0.16-0.17, 3 weeks after planting) while hybrids with *S. phureja* BP3, BP4, BP15 were tolerant (IMr respectively of 0.26-0.26-0.19). These results were confirmed with the parents, where it has been found that compared to the Sahelian strain of *R. solanacearum*, the wild parent *S. stenotomum* (SST) is more resistant (IMr 0.14) than the wild parent *S. phureja* (PS), which is only tolerant (IMr 0.38). The control BF15.2X is still sensitive to the *R. solanacearum* (IMr 0.69).

**Keys word :** *S. tuberosum*, *R. solanacearum*, *S. stenotomum*, *S. phureja*, bacterial wilt, somatic hybrids, protoplasts

**Abbreviations :** BF15.2X - Diploid cv Belle de Fontenay, Ci - Coefficient, CiNi - Number of diseased leaves, IMr - Index of disease, Ni - Number of leaves

### INTRODUCTION

Le flétrissement bactérien (encore appelé pourriture brune), dû à *Ralstonia solanacearum* est la plus importante phyto bactériose des Solanacées (RADTKE et RIECKMANN, 1993 ; KELMAN, 1998). Maladie endémique assez répandue dans le monde, son degré de gravité lui vaut d'être classée comme parasite de quarantaine (Arrêté du 11 Février 1999, YABUUCHI et al., 1999).

En Afrique subsaharienne, les conditions climatiques et la rusticité des techniques culturales inadaptées font que les phytopathogènes comme *R. solanacearum*, très favorisés par la chaleur (25°C en moyenne) et l'humidité, trouvent des conditions favorables pour mieux se développer (PRIOR et al., 1994). Contrairement aux maladies des cultures pérennes tropicales (MARIAU, 1999) et des grandes cultures vivrières céréalières tropicales, les maladies des cultures maraichères

tropicales sont peu étudiées, et les méthodes classiques de lutte restent peu efficaces (NSIKA MIKOKO *et al.*, 2000). Au niveau de la culture de pomme de terre et des espèces voisines (tomate, aubergine), l'accent est mis sur la lutte génétique par la caractérisation des pathogènes et la sélection de matériel végétal résistant (HAYWARD, 1991 ; HARTMAN et ELPHINSTONE, 1994 ; CHARRIER *et al.*, 1997 ; COLLONIER *et al.*, 2001).

Diverses sources de résistance ont été trouvées chez les espèces sauvages apparentées à *Solanum tuberosum* L. Certaines de ces espèces sont reconnues pour leurs résistances particulières à plusieurs agents pathogènes dont celui du flétrissement bactérien, la bactérie *R. solanacearum* (BOWMAN et SEQUEIRA, 1982). L'hybridation somatique offre la possibilité d'introduction de ces résistances en s'affranchissant des barrières sexuelles. La pomme de terre a déjà été l'objet de nombreuses hybridations somatiques aussi bien intraspécifiques (AUSTIN *et al.*, 1985 ; CHAPUT *et al.*, 1990) qu'interspécifiques (EHLÉNFIELDT et HELGESON, 1987 ; FISH *et al.*, 1988 ; SERRAF *et al.*, 1991 ; SIHACHAKR, VEDEL et DUCREUX, 1991 ; MATTHEIJ et PUITE, 1992 ; SERRAF *et al.*, 1994 ; SIHACHAKR *et al.*, 1994 ; JADARI *et al.*, 1992, 1997 ; HOFFMANN *et al.*, 1999 ; GERUNGAN *et al.*, 2000) et l'introduction de caractères de résistance chez *S. tuberosum*, à partir d'espèces sauvages apparentées, a pu être effectuée.

Cependant, dans le domaine spécifique de l'introduction de résistance au flétrissement bactérien, assez peu de travaux ont été réalisés actuellement. C'est ainsi qu'on peut mentionner, en plus de l'obtention d'hybrides somatiques résistants à *R. solanacearum* entre *S. tuberosum* et *S. commersonii* (LAFERRIERE *et al.*, 1999) ; celles d'hybrides somatiques entre *S. tuberosum* et *S. stenotomum* ; entre *S. tuberosum* et *S. phureja* (FOCK *et al.*, 2000).

Parmi les hybrides ainsi créés, six ont fait l'objet de notre étude, avec les trois parents sauvages et le témoin sensible BF15.4X. Cette étude a consisté à effectuer des tests de résistance à une souche sahéenne de *R. solanacearum* en conditions *in vitro*, afin d'évaluer le degré de résistance ou de sensibilité des hybrides. En effet, la sélection de génotypes résistants ou tolérants nécessite une mise au point de tests rapides, simples et précis (MARIAU, 1999). Compte tenu de la grande variabilité de *R. solanacearum* et de sa grande virulence, il est indispensable que ces travaux soient conduits dans un environnement contrôlé (YABUUCHI *et al.*, 1999). Les tests de résistance *in vitro*, en plus de leur rapidité, de leur précision et de leur sûreté, permettent de s'affranchir des contraintes environnementales susceptibles de

modifier les réponses des plantes. De plus, la culture *in vitro* autorise l'utilisation en toute sécurité de souches bactériennes d'origines géographiques variées dont l'utilisation, même en conditions contrôlées, ferait peser le risque d'une introduction de variants ayant des capacités pathologiques différentes. L'étude du comportement *in vitro* de génotypes face à la bactérie pourrait contribuer à la lutte génétique contre ce fléau, donc au développement de la culture de pomme de terre en zone sahéenne (SIDIKOU, 1997 ; SIDIKOU *et al.*, 2000) et d'autres Solanacées par la même occasion.

## I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1.1. Matériel végétal

Différents génotypes d'hybrides somatiques tétraploïdes ( $2n=4x$ ) obtenus par électrofusion à partir de protoplastes ont été utilisés pour ces tests de résistance *in vitro* :

- § Deux groupes d'hybrides tétraploïdes, à raison de 3 génotypes par groupe de fusion :
  - o BS33, BS37, BS44 (issus de la fusion BF15.2X + *Solanum stenotomum*)
  - o BP3, BP4, BP15 (issus de la fusion BF15.2X + *Solanum phureja*).
- § Les trois parents diploïdes ( $2n=2x$ ) de ces hybrides :
  - L'espèce sauvage *Solanum stenotomum* (SST)
  - L'espèce sauvage *Solanum phureja* (P5)
  - Le diploïde sensible BF15.2X
- § Le témoin tétraploïde ( $2n=4x$ ) apparenté et sensible : BF15.4X

Les boutures utilisées ont été cultivées *in vitro*, à raison d'une bouture par tube à essai, sur 10 ml de milieu solide de type MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) avec 2% de saccharose, sans substance de croissance, pendant 4 semaines dans les conditions environnementales (photopériode de 14h, intensité lumineuse de  $55 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , 20°C, 60% d'humidité relative).

### 1.2. Matériel bactérien

La souche de *R. solanacearum* utilisée est une souche africaine du Mali (région de SIKASSO), isolée et purifiée à l'INRA de Rennes à partir de pourritures de tubercules de pomme de terre présentant des symptômes de la maladie. Les tests de caractérisation, effectués à l'UMR de l'INRA de Rennes (LE ROUX, 1996 ; BOUDAZIN *et al.*, 1999 ; SIDIKOU *et al.*, *in press*), ont permis de rattacher cette souche au biovar 3 et à la division 1.

### 1.3. Inoculation des vitroplants

La méthode d'inoculation utilisée est inspirée de différents travaux (ELPHINSTONE, 1994 ; LE ROUX, 1996 ; FOCK *et al.*, 2000 ; COLLONIER *et al.*, 2001). Les

bactéries, réactivées à partir d'une souche congelée à -80°C dans un milieu liquide « levure-peptone » glycérolé à 30%, sont cultivées sur milieu de Kelman modifié (KELMAN, 1954) à 26°C, pendant 72h. Des colonies bactériennes typiques et bien muqueuses, sont prélevées. Une suspension bactérienne est préparée avec de l'eau distillée stérile à partir d'une culture de 24 h. La concentration est ajustée à 10<sup>8</sup> ufc par ml par mesure spectrophotométrique de la DO à 650 nm (DO 650 = 0,125) (PRIOR *et al.*, 1990). Cette suspension est par la suite diluée de façon à avoir une concentration finale de 10<sup>7</sup> ufc/ml pour l'inoculation des vitroplants. L'âge des plants (4 semaines environ) et la concentration de l'inoculum (10<sup>6</sup> à 10<sup>7</sup> ufc/ml), qui ne doit en aucun cas être inférieure à 10<sup>5</sup> ufc/ml, sont des facteurs limitants (GONZALEZ *et al.*, 1973).

Pour chacun des génotypes et variétés testés, l'inoculation s'est faite selon le protocole suivant: 12 vitroplants, dont les racines sont coupées au tiers inférieur, sont mis à tremper pendant 20 min dans la suspension bactérienne à 10<sup>7</sup> cfu puis sont mis en culture dans 5 ml de milieu de croissance liquide de type MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962), dans les mêmes conditions environnementales que celles utilisées pour la micropropagation du matériel végétal. De la même manière, pour chaque génotype et variété, 6 vitroplants sont trempés pendant 20 min dans de l'eau stérile avant d'être mis en culture dans 5 ml de milieu liquide de type MS. Ces plantes constituent les témoins.

Une fois par semaine des notations (nombres de feuilles malades / nombre total de feuilles) sont effectuées pour chacun des vitroplants, pendant 5 semaines. Les plantes sont classées selon une échelle de notation comprenant 5 classes (CIAMPI *et al.*, 1980; HE *et al.*, 1983; SWANEPOEL, 1990):

Classes	% de maladie	Ci	Ni
0	0%	0	N0
1	< 5% (1 feuille flétrie)	0.025	N1
2	5 à 25%	0.150	N2
3	25 à 50%	0.375	N3
4	50 à 75%	0.625	N4
5	75 à 100%	0.875	N5

Un coefficient Ci est attribué à chaque classe et l'indice de maladie est calculé pour chaque génotype après chaque notation selon la formule suivante (WINSTEAD et KELMAN, 1952):

$$\text{Indice de Maladie} = \text{IMr} = \frac{\sum Ci Ni}{\sum Ni}$$

## II. RÉSULTATS ET DISCUSSION

À la fin de l'expérimentation, c'est à dire 35 jours (5 semaines) après l'inoculation, la plupart des vitroplants est plus ou moins flétrie, ou avec des feuilles et des tiges plus ou moins décolorées ou jaunies ou encore brunies. Trois semaines après l'inoculation, on peut définir 3 classes de comportement selon la valeur de l'Indice de Maladie (IMr) obtenue :

Tableau - Evolution des indices de maladies (IMr) chez les hybrides

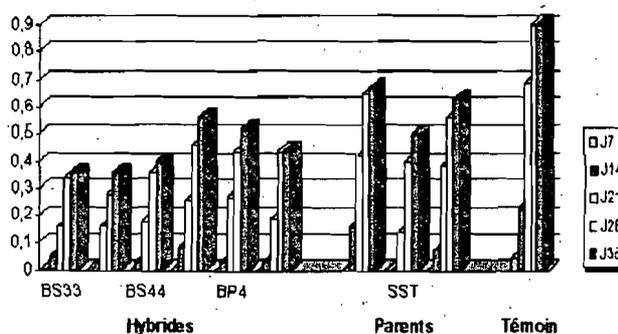
Durée de culture		J7	J14	J21	J28	J35	Comportement
HYBRIDES	BS33	0	0.05	0.16	0.34	0.36	Résistant
	BS37	0	0.01	0.16	0.28	0.36	Résistant
	BS44	0	0.03	0.18	0.36	0.4	Résistant
	BP3	0	0.08	0.26	0.46	0.56	Tolérant
	BP4	0	0.03	0.27	0.44	0.52	Tolérant
	BP15	0	0.03	0.19	0.44	0.44	Résistant
PARENTS	BF15.2X	0	0.16	0.42	0.65	0.67	Tolérant
	DES SST	0	0	0.14	0.4	0.5	Résistant
HYBRIDES	P5	0	0.07	0.38	0.56	0.63	Tolérant
TEMOIN	BF15.4X	0.04	0.23	0.69	0.9	0.9	Sensible

Légende - Classes de comportement 3 semaines (J21) après inoculation : Résistant : IMr < 0,2 Tolérant : 0,2 < IMr < 0,5 Sensible : IMr > 0,5

- Les génotypes ayant un IMr inférieur à 0.2 seraient résistants,
- Les génotypes ayant un IMr compris entre 0.2 et 0.5 seraient tolérants,
- Les génotypes ayant un IMr supérieur à 0.5 seraient sensibles.

D'après les indices de maladie calculés selon la formule de WINSTEAD et KELMAN (1952), les hybrides BS33, BS37, BS44 avec *S. stenotomum* seraient résistants (avec des IMr respectifs de 0.16, 0.16, 0.17 à 3 semaines de culture), tandis que les hybrides BP3, BP4, BP15 avec *S. phureja* seraient tolérants (avec des IMr respectifs de 0.26, 0.26, 0.19). Ces résultats sont confirmés au niveau des parents où il a été trouvé que vis à vis de cette souche sahélienne de *R. solanacearum*, le parent

Graphique : Indices de Maladie (IMr) chez les Hybrides somatiques et leurs Parents



sauvage *S. stenotomum* (SST) est plus résistant (IMr 0.14) que le parent sauvage *S. phureja* (P5) qui lui n'est que tolérant (IMr 0.38). Le témoin BF15.4X étant bien entendu toujours sensible (IMr 0.69) à *R. solanacearum*. Soulignons cependant que le degré de résistance des hybrides BS reste néanmoins légèrement inférieur à celui du parent sauvage *S. stenotomum* tandis que le degré de tolérance des hybrides BP s'est nettement amélioré par rapport à celui du parent sauvage *S. phureja* (Tableau et Graphique des IMr).

L'objectif de cette étude était de tester *in vitro* le comportement de nouveaux génotypes que sont des hybrides somatiques de pomme de terre et de celui de leurs parents en présence d'une souche sahélienne de *R. solanacearum*; et de vérifier si le transfert de résistance a bien été réalisé et dans quelles proportions.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent d'affirmer que le transfert de résistance a bien réussi lors des hybridations somatiques, puisque nous avons observé chez ces hybrides des phénomènes de résistance absents chez le témoin tétraploïde sensible et le parent diploïde sensible. Face à cette souche sahélienne, les parents sauvages et les hybrides issus de *S. stenotomum* sont plus résistants que ceux issus de *S. phureja*. Néanmoins, le transfert de caractères de résistance à partir de *S. phureja* reste avantageux dans la mesure où cette espèce sauvage est reconnue pour être résistante à d'autres pathogènes comme le *Phytophthora infestans* responsable du mildiou (HOFFMANN L., 1999), bien que ce champignon pathogène ne puisse se développer sous les climats chauds et secs des zones tropicales sahéliennes. Ces hybrides somatiques, obtenus et testés *in vitro* en présence d'une souche sahélienne de *R. solanacearum*, en attendant d'être évalués *in vivo* dans les conditions africaines et sahéliennes, en plus d'autres localités, constituent un potentiel très intéressant dans une perspective du développement de la culture de pomme de terre au Sahel.

Des études menées par FOCK *et al.*, (2000) sur le même matériel végétal que nous avons testé, mais par rapport à d'autres souches de *R. solanacearum*, ont abouti à des résultats voisins quant à *S. stenotomum*, avec néanmoins quelques différences. Ce qui permet d'affirmer que le phénomène de résistance, tout comme d'autres phénomènes biologiques, est un ensemble complexe dépendant de plusieurs facteurs, aussi bien endogènes (génotype du matériel végétal) qu'exogènes (type et origine de l'agent pathogène, conditions environnementales) (PRIOR, 1990; SIHACHAKR *et al.*, 1994; DUCREUX, 1995; PRIOR *et al.*,

1996). D'où la nécessité encore une fois réaffirmée, de mettre en place des schémas de production de semences adaptés aux conditions locales, incluant l'évaluation des variétés à l'égard des principaux pathogènes (JOUAN *et al.*, 1999).

D'autre part, l'évolution de la maladie au cours des 5 semaines d'expérimentation (la plupart des plants étant soit complètement flétrie pour les sensibles, soit à moitié jaunie pour les résistants), démontre que tous les génotypes, qu'ils soient sensibles, tolérants ou résistants, hébergent la bactérie. Ainsi, comme l'ont souligné plusieurs auteurs (PRIOR *et al.*, 1996; TRIGALET *et al.*, 1998), la résistance au flétrissement bactérien résulte non pas d'une résistance mécanique à la pénétration de la bactérie dans la plante, mais d'une moindre propagation de celle-ci dans les tissus vasculaires. Dans le même ordre d'idées, plusieurs espèces et génotypes résistants peuvent héberger l'agent pathogène sans manifester les symptômes (espèces voisines, espèces adventices), ce qui doit être pris en ligne de compte dans les programmes de lutte contre le flétrissement bactérien, programmes de lutte intégrée où la résistance variétale est une composante majeure.

#### CONCLUSION

L'utilisation de techniques d'hybridation somatique par fusion de protoplastes en biotechnologies végétales est une approche intéressante pour l'amélioration de la pomme de terre (JADARI *et al.*, 1997). Le fait de partir de protoplastes permet de s'affranchir des barrières sexuelles, de pouvoir combiner des génomes parfois incompatibles et de raccourcir la durée d'obtention d'hybrides par rapport aux méthodes conventionnelles (MILLAM *et al.*, 1995). Le seul obstacle (toutefois non insurmontable) dans l'hybridation somatique chez *Solanum tuberosum* et d'autres Solanacées résidant dans la difficile différenciation de bourgeons foliaires à partir des cals issus de fusion (SIHACHAKR *et al.*, 2000), nous avons essayé d'explorer la voie de régénération par embryogenèse somatique. Malheureusement, cette voie, bien que réalisable chez d'autres espèces (SIDIKOU *et al.*, 1992), n'est restée qu'éventuellement prometteuse (O'HAIR *et al.*, 1987). Les sources de résistance étant multiples et la pomme de terre se prêtant bien à l'hybridation somatique, la régénération par embryogenèse somatique serait d'une grande contribution dans les programmes d'amélioration variétale chez cette espèce d'intérêt économique mondial qu'est *S. tuberosum*, particulièrement en ce qui concerne l'apport des biotechnologies végétales à la sécurité alimentaire en zones sahéliennes.

**Remerciements**

Ces études ont été possibles grâce à la collaboration de l'INRA de Rennes pour la souche bactérienne et du laboratoire MVE de l'Université Paris XI d'Orsay pour le matériel végétal et la mise à disposition des moyens nécessaires à la conduite des travaux en conditions *in vitro*.

**BIBLIOGRAPHIE**

1. AUSTIN S., BAER M., KAZMIERCZAK P.J., HELGESON J.P., 1985. Intraspecific fusions in *S. tuberosum*. Theor Appl Genet, 71, 172-175.
2. BOUDAZING G., LEROUX A.C., JOSIK., LABARRE P., JOUAN B., 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. European Journal of Plant Pathology, 105, 373-380.
3. BOWMAN J.E., SEQUEIRA L., 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: Infectivity titrations in relation to multiplication and spread of the pathogen. American Potato Journal, 59, 155-164.
4. CHAPUT M.H., SIHACHAKR D., DUCREUX G., MARIE D., BARGHI N., 1990. Somatic hybrid plants produced by electrofusion between dihaploid potatoes: BF15 (H1), Aminca (H6) and Cardinal (h3). Plant Cell Rep., 9, 411-414.
5. CHARRIER A., JACQUOT M., HAMON S., NICOLAS D., 1997. L'amélioration des plantes tropicales. CIRAD - ORSTOM. Collection Repères, 623p.
6. CIAMPI L., SEQUEIRA L. FRENCH E.R., 1980. Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. Am Potato J, 57, 377-386.
7. COLLONIER C., KARDEN M., FOCKI., MARISKAI., SERVAES A., VEDEL F., SILJAK-YAKOVLEV S., SOUVANNOVONG V., DUCREUX G., SIHACHAKR D., 2001. Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. Plant Science, 160, 301-313.
8. DUCREUX G., 1995. Propos sur la tubérisation. Acta bot. Gallica, 142 (4), 285-288.
9. EHLENFELDT M.K., HELGESON J.P., 1987. Fertility of somatic hybrids from protoplast fusion of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. Theor Appl Genet, 73, 395-402.
10. ELPHINSTONE J. G., 1994. Virulence of Isolates of *Pseudomonas solanacearum* from worldwide sources on resistant and susceptible tomato cultivars. Plant Pathogenic Bacteria, Versailles (France), June 9-12 Ed. INRA, Paris, Les Colloques, n°66, 599-604.
11. FISH N., KARP A., JONES M.G.K., 1988. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. Theor Appl Genet, 76, 260-266.
12. FOCK I., COLLONIER C., PURWITO A., LUISETTI J., SOUVANNOVONG V., VEDEL F., SERVAES A., AMBROISE A., KODJA H., DUCREUX G., SIHACHAKR D., 2000. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. Plant Science 160, 165-176.
13. GERUNGAN R.F.I., JADARI R., COLLONIER C., FOCK I., LIAN Y., AMBROISE A., SERVAES A., LAVERGNE D., DUCREUX G., SIHACHAKR D., 2000. Hybridation somatique pour le transfert de caractères de résistance au *verticillium* à partir de *Solanum tarijense* dans la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). VII<sup>es</sup> Journées Scientifiques. AUPELF-UREF p 107.
14. GONZALEZ L. C., SEQUEIRA L., ROWE P. R., 1973. A root inoculation technique to screen potato seedings for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Am. Potato J. Vol. 50, 96-104.
15. HARTMAN G. L., ELPHINSTONE J. G., 1994. Advances in the control of *Pseudomonas solanacearum* race 1 in major food crops. In: Hayward A. C., Hartman G. L. (eds). Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, CAB International, 157-177.
16. HAYWARD A. C., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu Rev Phytopathol, 29, 65-87.
17. HE L.Y., SEQUEIRA L., KELMAN A., 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. Plant Disease 67, 1357-61.
18. HOFFMANN L., 1999. Bases biotechnologiques et génétiques de la résistance de la pomme de terre au mildiou. Phytopathologie, biologie moléculaire. Centre International de la Pomme de Terre (CIP) (Pérou), pp 8-9.
19. JADARI R., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G., 1992. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *S. torvum* SW into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. Euphytica, 64, 39-47.
20. JADARI R., GERUNGAN RFI, MUSSIO I., ELLOUZ O., LAKHOVA L., AMBROISE A., SERVAES A., DUCREUX G., SIHACHAKR D., 1997. Transfert de caractères de résistance au *Verticillium* chez la Pomme de terre par fusion interspécifique de protoplastes avec *S. tarijense* Hawkes. 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques. AUPELF-UREF, Orsay, 265-271.
21. JOUAN B., RIQUIER X., VANDERHOFSTADT B., 1999. Mali, Burkina Faso et Niger - Projet de Développement de la Pomme de Terre - La Pomme de Terre Française, N°511, 52-56.
22. KELMAN A., 1954. The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology, 44, 393-395.
23. KELMAN A., 1998. One hundred and one years of research on bacterial wilt. In: Prior P., Allen C., Elphinstone J. (eds). Bacterial Wilt Disease: molecular and ecological aspects. Springer-Verlag, Berlin, 1-5.
24. LAFERRIERE L.T., HELGESON J.P., CALLEN C., 1999. Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*, Theor. Appl. Genet., 98, 1272-1278.
25. LE ROUX A C., 1996. Etude de la résistance de variétés et de génotypes de pomme de terre à *Ralstonia solanacearum*, Dans: Production de réactifs sérologiques pour la détection de *Ralstonia solanacearum*. Rapport d'Activités INRA - FNPPPT, 27-31.
26. MARIAU D., Editeur scientifique, 1999. Les maladies des cultures pérennes tropicales. Ed. CIRAD. Collection Repères, 287p.

27. MATTHEIJ W.M. & PUIE K.J., 1992. Tetraploid potato hybrids through protoplast fusions and analysis of their performance in the field. *Theor Appl Genet*, 83, 807-812.
28. MILLAM S., PAYNE L.A., MACKAY G.R., 1995. The integration of protoplast fusion-derived material into a potato breeding programme – a review of progress and problems. *Euphytica*, 85: 451-455.
29. NSIKA MIKOKO E., MAKITA MADZOU J.P., TSOUMOU GAVOUKA A., 2000. Introduction de la résistance des plantes aux maladies et biotechnologies: Le cas du flétrissement bactérien de la tomate au Congo. VII<sup>es</sup> Journées Scientifiques – AUPELF-UREF, p 79.
30. O'HAIR S.K., BAKER C.M., BRYAN H.H., 1987. Fluid Drilling of Embryos in Potato Improvement – A future Possibility. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 3: Potato* (ed. by Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 487-498.
31. PRIOR P., BERAMIS M., 1990. Induction de la résistance au flétrissement bactérien dû à *Pseudomonas solanacearum* EF Smith chez un cultivar de tomate réputé sensible. *Agronomie*, 10, 391-401.
32. PRIOR P., BERAMIS M., CHILLET M., SCHMIT J., 1990. Preliminary Studies for Tomato Bacterial Wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F.Sm.) Resistance Mechanisms. Balaban Publishers, Philadelphia/Rehovot. *Symbiosis*, 9, 393-400.
33. PRIOR P., 1990. Aggressiveness of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on Tomato. *The American Phytopathological Society. Plant Disease/Vol. 74, N° 12*, 962-965.
34. PRIOR P., GRIMAULT V., SCHMIT J., 1994. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Tomato: Present status and prospects. In: Hayward A. C., Hartman G. L. (eds). *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, CAB International, 209-223.
35. PRIOR P., BART S., LECLERCQ S., DRASSE A., ANAÏS G., 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burkholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathology*, 45, 720-726.
36. RADTKEW., RIECKMANN W., 1991. Maladies et ravageurs de la pomme de terre. Ed. Th. Mann. Gelsenkirchen-Buer, 168p.
37. SERRAF I., SIHACHAKR D., DUCREUX G., ROSSIGNOL L., 1991. Interspecific somatic hybridization in potato by electrofusion. *Plant Sci.*, 76, 115-126.
38. SERRAF I., TIZROUTINE S., CHAPUT M.H., ALLOT M., MUSSIO I., SIHACHAKR D., ROSSIGNOL L., DUCREUX G., 1994. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids through protoplast electrofusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *Lycopersicon pennellii*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 37, 137-144.
39. SIDIKOU SEYNI R., RAMBAUD C., DUBOIS J., VASSEUR J., 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of *Cichorium intybus* L. x *Cichorium endivia* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 29, 83-91.
40. SIDIKOU SEYNI R. D., 1997. Contribution des biotechnologies végétales à la sécurité alimentaire en zones sahéliennes. 6<sup>èmes</sup> Journées Scientifiques du Réseau Biotechnologies Végétales AUPELF-UREF, Orsay, 113-122.
41. SIDIKOU SEYNI R.D., SIRIFI S., VANDERHOFSTADT B., SIHACHAKR D., LAVERGNE D., NATO A., ELLISSECHE D., JOUANB., DUCREUX G., 2000. Apport des biotechnologies végétales au développement de la culture de pomme de terre au Sahel : Projet de production de plants à partir de minitubercules. VII<sup>es</sup> Journées Scientifiques AUPELF-UREF, p 76.
42. SIHACHAKR D., HAICOUR R., SERRAF I., BARRIENTOS E., DUCREUX G., ROSSIGNOL R., SOUVANNAVONG V., 1988. Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. *Plant Sci.*, 57, 215-223.
43. SIHACHAKR D., HAICOUR R., CHAPUT M.H., BARRIENTOS E., DUCREUX G., ROSSIGNOL L., 1989. Somatic hybrid plants produced by electrofusion between *Solanum melongena* L. and *Solanum torvum* S.W. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 1-6.
44. SIHACHAKR D., VEDEL F., DUCREUX G., 1991. Somatic hybridization by protoplast electrofusion: interest of the *Solanaceae*. *Plant Sci. today INRA*, 59, 285-286.
45. SIHACHAKR D., SERRAF I., ROSSIGNOL L., DUCREUX G., 1992. Hybridization by electrofusion. *Rice Biotechnology Quarterly*, 10, 43-44.
46. SIHACHAKR D., JADARI R., ROSSIGNOL L., DUCREUX G., 1994. Transfer of resistance by protoplast fusion. *Rice Biotechnology Quarterly*, 17, 28.
47. SIHACHAKR D., DAUNAY M.C., SERRAF I., CHAPUT M.H., MUSSIO I., HAÏCOUR R., ROSSIGNOL L., DUCREUX G., 1994. Somatic hybridization of eggplant (*Solanum melongena* L.) with its close and wild relatives. In: YPS Bajaj (cd) *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 27, Somatic hybridization in crop improvement I*, Springer-Verlag. Berlin, New York, 255-278.
48. SIHACHAKR D., JADARI R., KUNOTHAI-MUSHIN A., ROSSIGNOL L., HAÏCOUR R., DUCREUX G., 1996. *In-vitro* production of *Verticillium dahliae* – resistant potato plants. In: YPS Bajaj (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 36, Somaclonal variation in crop improvement II*, Springer-Verlag. Berlin, New York, 119-131.
49. SIHACHAKR D., COLLONIER C., FOCK I., SERVAES A., VEDEL F., LAVERGNE D., DUCREUX G., 2000. Systèmes de régénération nécessaires à l'application des biotechnologies chez la patate douce (*Ipomea batatas* L.) VII<sup>es</sup> Journées Scientifiques – AUPELF-UREF, p. 77.
50. SWANEPOEL A.E., 1990. The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. *Potato Res.*, 33, 287-90.
51. TRIGALET A., TRIGALET-DEMERY D., FEULLADE R., 1998. Aggressiveness of French isolates of *Ralstonia solanacearum* and their potential use in biocontrol. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 28, 101-107.
52. WINSTEAD N.N., KELMAN A., 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 42, 628-634.
53. YABUUCHI E. et al., 1999. Arrêté du 11 Février 1999 relatif à la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith). *JORF/LD N° 85 du 11 Avril 1999*, 5372-5387.